

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Farmácia**



**Pró-fármacos contendo álcoois de cadeia longa  
para tratamento da tuberculose. Investigação  
do mecanismo de ação.**

**Olha Antoniuk**

**Dissertação orientada pelo Professor Doutor Luís Filipe Vicente  
Constantino e coorientada pela Professora Doutora Ana Paula Gameiro  
Francisco**

**Mestrado em Química Medicinal e Biofarmacêutica**

**2022**

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



**Pró-fármacos contendo álcoois de cadeia longa  
para tratamento da tuberculose. Investigação  
do mecanismo de ação.**

**Atividade antimicrobacteriana de compostos contendo o  
grupo nitro.**

**Olha Antoniuk**

**Dissertação orientada pelo Professor Doutor Luís Filipe Vicente  
Constantino e coorientada pela Professora Doutora Ana Paula Gameiro  
Francisco**

**Mestrado em Química Medicinal e Biofarmacêutica**

**2022**

# Resumo

A tuberculose (TB) é uma doença transmissível persistindo atualmente como um importante problema de saúde pública. É causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Os tratamentos eficazes foram desenvolvidos pela primeira vez na década de 1940. No entanto, o *Mycobacterium tuberculosis*, desenvolveu várias resistências aos tratamentos existentes. Esta bactéria possui um envelope celular muito complexo, constituído por ácidos micólicos, que interfere na sensibilidade da bactéria aos antibióticos hidrofóbicos. Assim, são urgentemente necessários novos medicamentos ativos contra *M. tuberculosis* resistente a fármacos que possam ser usados em regimes terapêuticos curtos e em se possível em doses mais baixas do que o habitual.

Em trabalhos de investigação anteriores sobre a tuberculose, observou-se que alguns ácidos fracos tinham atividade significativa no *Mycobacterium tuberculosis* e que os álcoois de cadeia longa (LCA) usados em pró-fármacos como transportadores também tinham atividade relevante. Surgiu então a ideia de obter pró-fármacos mútuos contendo estas duas moléculas ativas unidas por uma ligação éster. Com a síntese destes pró-fármacos pretendia-se obter compostos que pudessem ter potencialmente uma ação sinérgica e melhor capacidade de entrada nas micobactérias devido à sua adequada lipofilia. A fim de obter compostos que pudessem sobreviver durante a fase de transporte, sintetizamos outros ésteres e as amidas lipofílicas derivados de ácidos fracos, estudamos a sua atividade contra *M. tuberculosis*, a sua estabilidade em tampão fosfato, no plasma e no homogenato micobacteriano.

De entre os derivados sintetizados no grupo os derivados de ácidos fracos contendo o grupo nitro foram especialmente interessantes em termos de atividade e toxicidade, havendo indicações que poderão funcionar por um mecanismo diferente dos compostos de partida. Por essa razão esta tese focou-se sobre compostos contendo grupos nitro e também incluiu obtenção de tioésteres e amidas ampliando a biblioteca de compostos já sintetizados no grupo e o estudo da sua atividade, estabilidade e ativação.

Os nitrocompostos são moléculas bioativas utilizadas como agentes antimicobacterianos. Nos últimos anos, essas moléculas têm sido amplamente estudadas em diversas áreas, como química medicinal, química orgânica, bioquímica, toxicologia e eletroquímica. O modo de ação da maioria dos nitrocompostos envolve a biotransformação do grupo nitro, libertando intermediários no processo redox. Alguns desses intermediários reagem com enzimas, membranas e DNA, fornecendo a base para a sua atividade biológica e efeitos adversos. Nesta dissertação são explorados alguns aspetos relativos à atividade biológica, mecanismo de ação e toxicidade dos nitrocompostos, objetivando a pesquisa de novos derivados bioativos com baixa toxicidade.

Para o efeito, sintetizámos os ésteres, tioésteres e as amidas derivados de ácido benzóico, ácido 4-nitrobenzóico, ácido 3,5-dinitrobenzóico e ácido 3-nitro-5-trifluorometilbenzóico, contendo comprimentos de cadeia linear de 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 átomos de carbono e caracterizámos os compostos quanto a sua estabilidade em tampão de fosfato, plasma humano e homogenato de micobactéria, e atividade sobre *Mycobacterium tuberculosis*. Os resultados obtidos permitem concluir que as nitroamidas lipofílicas são os compostos mais ativo, e que destas as amidas dinitrosubstituídas são as que possuem maior atividade.

**Palavras-chave:** Tuberculose, Pró-fármacos, Nitroamidas, Ácidos fracos, Estabilidade, Atividade

# Abstract

Tuberculosis (TB) is a spreading disease that is a major cause of public health problems. It is caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*. Effective drug treatments were first developed in the 1940s. However, *Mycobacterium tuberculosis* has developed resistance to existing treatments. Thus, new drugs that are active against drug-resistant *M. tuberculosis* and useful for short-term therapeutic regimens at the lowest necessary doses are urgently needed.

Following research on tuberculosis, it was found that some weak acids had significant activity in *Mycobacterium tuberculosis* and that the long-chain alcohols (ACL) used in prodrugs as carriers also had relevant activity. The idea of obtaining mutual prodrugs arises from the point that prodrugs containing the two promises linked by an ester bond these compounds can potentially have a synergistic action and an improvement in the penetration of mycobacteria due to their adequate lipophilia. However, the most promising compounds were quickly degraded in the presence of serum. In order to obtain compounds that could survive during the transport phase in blood, we synthesized the lipophilic esters and amides derived from weak acids, we studied their activity against *M. tuberculosis*, their stability in the phosphate buffer, in plasma and in the mycobacterial homogenate.

Due to the fact that derivatives of weak acids containing the nitro group were especially interesting in terms of activity and toxicity, this work will focus on obtaining esters and amides derived from weak acids containing nitro groups, expanding the range of derivatives already obtained, and study its activity, stability and activation and going further on the exploration of the mechanism of action of the compounds.

To assess our approach, we synthesized the esters, thioesters and the amides derived from benzoic acid, 4-nitrobenzoic acid and 3,5-dinitrobenzoic acid, containing linear chain lengths of 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16 carbon atoms and evaluate their stability in phosphate buffer, human plasma and mycobacteria homogenate. The results show that lipophilic amides are more active than the corresponding esters, and amongst dinitrosubstituted amides have greater activity.

**Keywords:** Tuberculosis, Prodrugs, Nitro compounds, Weak acids, Stability, Activity

# Agradecimentos

Ao concluir este trabalho, quero manifestar o meu agradecimento a todos aqueles que ao longo do tempo e a diferentes níveis, contribuíram decisivamente para a sua realização.

Assim, gostaria de salientar algumas pessoas que tiveram um papel fundamental e sem as quais não seria possível a concretização deste trabalho:

- Ao professor Luís Constantino pela sua orientação neste trabalho, apoio científico e pelas oportunidades que contribuíram para enriquecer o meu percurso académico e científico;

- À professora Ana Paula Francisco pela sua orientação e apoio no laboratório e pelo esclarecimento de todas as minhas dúvidas no decorrer deste trabalho;

- Um grande agradecimento ao Doutor João Pais pela orientação, apoio e interesse com que acompanhou sempre a elaboração deste trabalho;

- Um especial agradecimento à professora Vera Rosário;

- Os meus amigos e colegas de curso pelo companheirismo demonstrado;

- Um grande agradecimento à minha família, em especial aos meus filhos que sempre me acompanharam, pela sua paciência, pelo carinho e inspiração e à restante família pelo apoio.

## Abreviaturas

|  |   |
|--|---|
| <b>AB</b> – Ácido Benzóico   | <b>DprE1</b> - Decaprenilfosforil-beta-D-ribose epimerase                                       |
| <b>AChE</b> – Acetilcolinesterase  | <b>EMB</b> - Etambutol  |
| <b>ACN</b> - acetonitrila  | <b>ERNs</b> – Espécies reativas de nitrogénio   |
| <b>ACOT</b> - as acetil-CoA tioesterases   | <b>EROs</b> – Espécies reativas de oxigénio   |
| <b>ADMET</b> - absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade                                    | <b>ETH</b> – Etionamida   |
| <b>AG</b> – Arabinogalactano   | <b>FAAH</b> - amida hidrólase de ácido gordo  |
| <b>AGs</b> - Ácidos gordos   | <b>FAD</b> - Dinucleotídeo de flavina adenina   |
| <b>AIDS</b> - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês: <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> ) | <b>FDGI</b> - glucose-6-fosfato desidrogenase   |
| <b>ALDH2</b> - Álcool desidrogenase 2  | <b>FMN</b> - Mononucleotídeo de flavina   |
| <b>Arg</b> – Arginina  | <b>FQ</b> – Fluoroquinolonas  |
| <b>AS</b> - Amidases   | <b>IYD</b> - Iodotirosina desidrogenase   |
| <b>Asp</b> - Ácido aspártico   | <b>katG</b> - Catalase-peroxidase   |
| <b>BA</b> - Ácido benzóico   | <b>Glu</b> - Ácido glutâmico  |
| <b>BC</b> - Bacilo de Koch   | <b>HAT</b> - Tripanossomíase humana africana  |
| <b>BCG</b> - Bacillus Calmette–Guerin  | <b>His</b> - Histidina  |
| <b>BChE</b> - Butirilcolinesterase   | <b>HIV</b> - Vírus da imunodeficiência humana (do inglês: <i>Human immunodeficiency virus</i> ) |
| <b>BTZ</b> – Benzotiazinona  | <b>IAA</b> - Ácido indol-3-acético  |
| <b>CCF</b> - Cromatografia em camada fina  | <b>INH</b> – Isoniazida   |
| <b>CEs</b> – Carboxilesterases   | <b>T/A</b> - Índice toxicidade/atividade  |
| <b>CEHs</b> - Hidrolases de éster carboxílico  | <b>LAM</b> – Lipoarabinomanano  |
| <b>CL<sub>50</sub></b> - concentração letal a 50%  | <b>LCA</b> - Álcoois de cadeia longa  |
| <b>CS</b> - Cicloserina  | <b>LM</b> – Lipomanano  |
| <b>CYPs</b> - Isoenzimas do citocromo P450   | <b>mAGP</b> - O complexo micolil arabinogalactano-peptidoglicano                                |
| <b>Cys</b> - Cisteína  | <b>ME</b> - membrana externa  |
| <b>DC</b> - Doença de Chagas   | <b>MIT</b> - monoiodotirosina   |
| <b>DCM</b> - diclorometano   | <b><i>M. tuberculosis</i></b> – <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                               |
| <b>Ddn</b> - nitrorredutase dependente de deazaflavina   | <b>MTC</b> - Complexo Mycobacterium tuberculosis  |
| <b>DHFR</b> - Dihidrofolato redutase   | <b>NAD</b> - Dinucleótido de nicotinamida e adenina   |
| <b>DHFS</b> - Dihidrofolato sintase  | <b>NADH</b> - Nicotinamida adenina dinucleótido   |
| <b>DHPS</b> - Dihidropteroato sintase  | <b>NADPH</b> - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  |
| <b>DNA</b> - Ácido desoxirribonucleico   | <b>NRDs</b> - Nitroreductases   |
| <b>DPA</b> - decaprenil-fosforil-d-arabinose   | <b>NTM</b> - Micobactérias não tuberculosas   |
| <b>DPR</b> - decaprenil-fosforil-d-ribose  |   |

**PAS** - Ácido para-aminosalicílico

**PE** - esterases contendo domínios de prolina-glutamato

**PG** - Peptidoglicano

**PIMs** - Manosídeos de fosfatidilinositol

**Phe** – Fenilalanina

**POA** – Ácido pirazinoico

**PON** – Paraoxonase

**PPE** - esterases contendo domínios de prolina-prolina-glutamato

**PTH** – Protionamida

**PZA** – Pirazinamida

**RIF** - Rifampicina

**RNA** - Ácido ribonucleico

**SEA** - substituição eletrofilica aromática

**Ser** - Serina

**SIDA** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**SM** - Estreptomicina

**SOD** - Superóxido dismutase

**TAG** - Triacilglicerol

**TAZ** - Tiacetazona

**TB** - Tuberculose

**TB-MR** - Tuberculose multirresistente

**TB-RR** - Tuberculose resistente à rifampicina

**Thr** - Treonina

**VIH** - Vírus da imunodeficiência humana

## Índice:

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| 1.        | Introdução .....  | 1   |
| 1.1       | Tuberculose .....   | 4   |
| 1.1.1     | Epidemiologia .....   | 4   |
| 1.1.2     | Etiologia e Patogênese.....   | 4   |
| 1.1.3     | Micobactérias .....   | 6   |
| 1.1.3.1   | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....   | 7   |
| 1.1.3.1.1 | Estrutura da parede celular e permeabilidade aos fármacos .....                                     | 9   |
| 1.1.4     | Tratamento .....  | 11  |
| 1.2       | Pró-Fármacos.....   | 16  |
| 1.2.1     | Hidrólise.....  | 20  |
| 1.2.1.1   | Hidrólise Química.....  | 20  |
| 1.2.1.2   | Hidrólise Enzimática .....  | 22  |
| 1.2.2     | Ésteres como pró-fármacos .....   | 25  |
| 1.2.2.1   | Enzimas envolvidas na hidrólise de ésteres. ....  | 27  |
| 1.2.2.1.1 | Esterases <i>M. tuberculosis</i> .....  | 29  |
| 1.2.3     | Amidas como pró-fármacos .....  | 31  |
| 1.2.3.1   | Enzimas envolvidas na hidrólise de amidas.....  | 31  |
| 1.2.4     | Fármacos contendo grupo nitro. ....   | 34  |
| 1.2.4.1   | Bioativação dos compostos que contêm grupos nitro.....  | 35  |
| 1.2.4.1.1 | A capacidade de redução.....  | 35  |
| 1.2.4.1.2 | Nitrorredutases .....   | 36  |
| 1.2.4.1.3 | Mecanismo de redução por nitrorredutases.....   | 40  |
| 1.2.4.1.4 | Interação dos compostos que contêm grupo nitro com recetores.....                                   | 42  |
| 1.2.4.2   | Problemas de Toxicidade .....   | 43  |
| 1.2.4.3   | Agentes antituberculosos contendo grupos nitro .....  | 45  |
| 1.2.4.3.1 | Agentes antituberculosos ativados pelas nitrorreductases micobacterianas .                          | 45  |
| 1.2.4.3.2 | Agentes antituberculosos ativados pelo DprE1. ....  | 49  |
| 1.2.5     | Objetivo do trabalho .....  | 52  |
| 2         | Resultados e Discussão dos Resultados.....  | 54  |
| 2.1       | Compostos testados .....  | 54  |
| 2.2       | Síntese e Purificação dos Ésteres.....  | 55  |
| 2.2.1     | Ésteres de derivados do ácido benzóico.....   | 56  |
| 2.3       | Síntese e Purificação das Amidas.....   | 57  |
| 2.3.1     | Amidas de derivadas do ácido benzóico. ....   | 57  |
| 2.4       | Síntese e Purificação dos Tioésteres.....   | 58  |
| 2.4.1     | Tioésteres de derivados do ácido benzóico. ....   | 59  |
| 2.5       | Conclusões Gerais .....   | 59  |
| 2.6       | Caracterização por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....                             | 60  |
| 2.7       | Estudos de Estabilidade dos Ésteres, Tioésteres e Amidas de derivados de Ácido Benzóico             | 65  |
| 2.7.1     | Estabilidade em tampão de fosfato pH 7,4.....   | 67  |
| 2.7.1.1   | Efeito do pKa dos ácidos fracos. ....   | 70  |
| 2.7.2     | Estabilidade em plasma humano.....  | 72  |
| 2.7.3     | Estabilidade em homogenato de <i>M. smegmatis</i> .....   | 83  |
| 2.7.4     | A razão entre velocidades de degradação em plasma humano e em homogenato de <i>M. smegmatis</i> .92 |     |
| 2.8       | Ensaio de atividade in vitro.....   | 98  |
| 2.8.1     | Ensaio de atividade em <i>M. tuberculosis</i> .....   | 98  |
| 2.8.2     | Ensaio de atividade comparativo em várias estirpes micobacterianas. ....                            | 102 |
| 2.8.3     | Ensaio de atividade em macrófagos.....  | 104 |
| 2.9       | Ensaio de citotoxicidade .....  | 106 |
| 3         | Parte Experimental.....   | 109 |
| 3.1       | Síntese e Purificação dos Ésteres.....  | 109 |
| 3.1.1     | Método A .....  | 109 |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 3.1.1.1 | Procedimento geral de preparação de H-benzoatos, de 4-nitrobenzoatos, de 3,5-dinitrobenzoatos e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoatos – Método A1 .....                | 110 |
| 3.1.1.2 | Procedimento geral de preparação de H-benzoatos, de 4-nitrobenzoatos, de 3,5-dinitrobenzoatos e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoatos – Método A2.....                 | 110 |
| 3.1.2   | Método B.....  | 111 |
| 3.1.2.1 | Procedimento geral de preparação de H-benzoatos, de 4-nitrobenzoatos, de 3,5-dinitrobenzoatos e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoatos – Método B.....                  | 111 |
| 3.1.3   | Método C.....  | 112 |
| 3.1.3.1 | Procedimento geral de preparação de derivados de H-benzamidas, de 4-nitrobenzamidas, de 3,5-dinitrobenzamidas e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzamida – Método C1..... | 112 |
| 3.1.3.2 | Procedimento geral de preparação de derivados de H-benzamidas, de 4-nitrobenzamidas, de 3,5-dinitrobenzamidas e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzamida – Método C2..... | 113 |
| 3.1.4   | Método D .....   | 114 |
| 3.1.4.1 | Procedimento geral de preparação de H-tiobenzoatos, de 4-nitrotiobenzoatos, de 3,5-dinitrotiobenzoatos e 3-nitro-5-(trifluorometil)tiobenzoatos – Método D.....      | 114 |
| 3.2     | Análise e Identificação Estrutural.....  | 115 |
| 3.2.1   | Ressonância Magnética Nuclear.....   | 115 |
| 3.3     | Ensaio de estabilidade.....  | 122 |
| 3.3.1   | Estabilidade em tampão fosfato pH 7,4 .....  | 123 |
| 3.3.2   | Estabilidade em plasma humano .....  | 123 |
| 3.3.3   | Estabilidade em homogenato de <i>M. smegmatis</i> .....  | 124 |
| 3.4     | Estudos de atividade Antimicrobacteriana .....   | 125 |
| 3.4.1   | Infeção de macrófagos e atividade de morte intracelular ex vivo. ....  | 126 |
| 3.5     | Ensaio de citotoxicidade .....   | 126 |
|         | Conclusões.....  | 127 |
|         | Referências Bibliográficas.....  | 129 |
|         | Anexos.....  | 146 |
| A1.     | O que é um composto nitroaromático? .....  | 146 |
| A2.     | Mecanismos de síntese .....  | 146 |
| A3.     | Espectros de RMN obtidos para os vários compostos sintetizados.....  | 150 |
| A4.     | Curvas de Calibração em HPLC.....  | 187 |
| A5.     | Cálculo da degradação dos ésteres/amidas nos ensaios de estabilidade química e enzimática ....   | 189 |
| A6.     | Cromatogramas em HPLC .....  | 190 |
| A7.     | Atividade antimicrobiana intracelular de compostos testados contra <i>M. bovis</i> BCG infectando macrófagos humanos THP-1 .....                                     | 191 |

## Índice de Figuras:

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1  | Representação esquemática dos estágios de translocação do <i>M. tuberculosis</i> através da parede alveolar. <sup>15</sup> .....      | 5  |
| Figura 2  | <i>M. tuberculosis</i> observado por uma microscopia eletrónica. <sup>26</sup> .....  | 8  |
| Figura 3  | Colónias de <i>M. tuberculosis</i> em meio Lowenstein-Jensen. <sup>26</sup> .....   | 8  |
| Figura 4  | Representação esquemática do envelope celular do <i>M. tuberculosis</i> . ....  | 9  |
| Figura 5  | Estrutura dos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da tuberculose. ....  | 12 |
| Figura 6  | Estrutura dos fármacos de segunda linha utilizados no tratamento da tuberculose. ....   | 13 |
| Figura 7  | Estrutura dos fármacos de segunda linha utilizados no tratamento da tuberculose (fluoroquinolonas).....                               | 15 |
| Figura 8  | Fármacos antituberculose agrupados de acordo com os mecanismos de ação possíveis. <sup>44</sup> ....                                  | 16 |
| Figura 9  | Representação esquemática do conceito de pró-fármaco. <sup>74</sup> .....   | 17 |
| Figura 10 | Mecanismo de ação da PZA (8). ....  | 19 |
| Figura 11 | Metabolismo e ativação da isoniazida (3). <sup>44</sup> .....   | 19 |
| Figura 12 | Mecanismo de ação da etionamida (9). ....   | 20 |
| Figura 13 | Esquema de hidrólise química de ésteres: (a) catálise ácida (b) catálise básica. <sup>111</sup> .....                                 | 21 |
| Figura 14 | Esquema de hidrólise química de amidas: (a) catálise ácida (b) catálise básica. <sup>111</sup> .....                                  | 21 |
| Figura 15 | Grupos catalíticos comuns de hidrolases envolvidos na hidrólise da ligação éster. ....  | 22 |
| Figura 16 | Esquema simplificada para a hidrólise de ésteres com o exemplo da carboxilesterase1 (3.1.1.1) como um protótipo. <sup>117</sup> ..... | 23 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 17 Esquema detalhada para a hidrólise de amidas pela serina hidrólases com o exemplo da quimiotripsina peptidase (EC 3.4.21.1) como um protótipo. <sup>111</sup> .....   | 24 |
| Figura 18 Vias para clivagem de ligação de éster. <sup>63</sup> .....   | 25 |
| Figura 19 Apresentação esquemática da $\alpha/\beta$ - hidrólase. Folhas $\beta$ (1–8) são mostradas como setas azuis, hélices $\alpha$ (A – F) como colunas vermelhas. <sup>113</sup> .....  | 27 |
| Figura 20 Estrutura e função da esterase bacteriana. ....   | 29 |
| Figura 21 Estrutura e função da esterase bacteriana. ....   | 30 |
| Figura 22 Classificação de amidase. <sup>268</sup> .....  | 32 |
| Figura 23 Mecanismo proposto para a hidrólase de amida de ácido gordo (FAAH). <sup>274</sup> .....  | 33 |
| Figura 24 Mecanismo de reação de transferência do grupo acil de amida para hidrazina, hidroxilamina e água. ....  | 33 |
| Figura 25 Intervalo de variação do potencial de redução dos nitrocompostos e do oxigénio. <sup>165</sup> .....  | 36 |
| Figura 26 Árvore das nitrorredutases do tipo I ou insensíveis ao oxigénio. <sup>220</sup> .....   | 37 |
| Figura 27 Estrutura das nitrorredutases. <sup>167</sup> .....   | 38 |
| Figura 28 Estrutura das nitrorredutases. <sup>167</sup> .....   | 38 |
| Figura 29 Estrutura das nitrorredutases. <sup>167</sup> .....   | 39 |
| Figura 30 Mecanismo geral de redução por nitrorredutases .....  | 41 |
| Figura 31 Mecanismo biorredutivo de nitrocompostos. Rota anaeróbia. Continuação da Figura 30. ....  | 41 |
| Figura 32 Mecanismo biorredutivo de nitrocompostos. Rota aeróbica. Continuação da Figura 30. ....   | 42 |
| Figura 33 Interações de contacto entre grupo nitro e funcionais grupos no centro ativo da enzima. <sup>163</sup> .  | 43 |
| Figura 34 Mecanismos de ativação e ação de nitroimidazóis e nitrotienopirimidinas. <sup>77</sup> .....  | 46 |
| Figura 35 Agentes antituberculosos contendo grupos nitro. <sup>10</sup> .....   | 47 |
| Figura 36 Agentes antituberculosos contendo grupos nitro. <sup>10</sup> .....   | 47 |
| Figura 37 Agentes antituberculosos contendo grupos nitro. <sup>10</sup> .....   | 48 |
| Figura 38 Agentes antituberculosos contendo grupos nitro. Estrutura de TP053 .....  | 49 |
| Figura 39 Mecanismos de ativação e ação de benzotiazinonas. <sup>77</sup> .....   | 50 |
| Figura 40 Benzotiazinonas e heterociclos relacionados como pró-fármacos antituberculosos. <sup>10</sup> .....   | 51 |
| Figura 41 Benzotiazinonas e heterociclos relacionados como pró-fármacos antituberculosos. <sup>10</sup> .....   | 52 |
| Figura 42 Esquema geral das sínteses dos ésteres de derivados de ácidos fracos. ....  | 56 |
| Figura 43 Esquema geral das sínteses das amidas de derivadas de ácidos fracos. ....   | 57 |
| Figura 44 Esquema geral das sínteses dos tioésteres de derivados de ácidos fracos. ....   | 59 |
| Figura 45 Representação Estrutural dos ésteres sintetizados. ....   | 60 |
| Figura 46 Representação Estrutural das amidas sintetizadas. ....  | 62 |
| Figura 47 Representação Estrutural dos tioésteres sintetizados. ....  | 64 |
| Figura 48. Espectro UV obtido para o ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoato de butilo. ....  | 65 |
| Figura 49 Variação da concentração de éster 3a e ácido em tampão fosfato (pH = 7,4, T=37 °C).....   | 69 |
| Figura 50 Efeito do pKa dos ácidos fracos na velocidade de degradação dos ésteres derivados de ácido benzóico substituído com cadeia 4 átomos de carbono: H-benzoato de butilo (1a), 4-nitrobenzoato de butilo (2a), 3,5-dinitrobenzoato de butilo (3a) e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoato de butilo (4a). .... | 71 |
| Figura 51 Estudo da estabilidade enzimática comparativo dos ésteres e tioésteres de derivados de ácido benzóico substituído em plasma humano: .....   | 75 |
| Figura 52 Velocidade de degradação química e enzimática de H-benzoato de butilo (1a), 4-nitrobenzoato de butilo (2a), 3,5-dinitrobenzoato de butilo (3a) e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoato de butilo (4a): .....   | 77 |
| Figura 53 Estudo da estabilidade enzimática dos benzoatos em plasma humano em função do substituintes no anel aromático: .....  | 79 |
| Figura 54 Estudo da estabilidade enzimática dos tioésteres em plasma humano em função do substituintes no anel aromático: .....   | 80 |
| Figura 55 Estudo da estabilidade enzimática em plasma humano dependendo do comprimento de cadeia alquílica: .....   | 81 |
| Figura 56 Variação da concentração de éster e ácido durante o ensaio em plasma humano do composto 6a.....   | 83 |
| Figura 57 Estudo da estabilidade enzimática comparativo dos ésteres, tioésteres e amidas de derivados de ácido benzóico substituído em homogenato de <i>M. smegmatis</i> : .....  | 87 |
| Figura 58 Estudo da estabilidade enzimática em homogenato de <i>M. smegmatis</i> dependendo dos substituintes no anel aromático no exemplo dos ésteres: .....   | 89 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 59 Estudo da estabilidade enzimática em homogenato de <i>M. smegmatis</i> dependendo dos substituintes no anel aromático no exemplo dos tioésteres: .....  | 90  |
| Figura 60 Estudo da estabilidade enzimática em homogenato de <i>M. smegmatis</i> dependendo dos substituintes no anel aromático no exemplo das amidas: .....  | 90  |
| Figura 61 Estudo da estabilidade enzimática em homogenato de <i>M. smegmatis</i> dependendo do comprimento de cadeia alquílica: .....   | 92  |
| Figura 62 Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem de hidrólise dos ésteres em plasma humano e em homogenato de <i>M. smegmatis</i> normalizado em relação constante de velocidade de pseudo-primeira ordem para H-benzoato de butilo (1a) ( $k_{obs}/k_{obs}1a$ ) no mesmo meio biológico. 95     | 95  |
| Figura 63 Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem de hidrólise dos tioésteres em plasma humano e em homogenato de <i>M. smegmatis</i> normalizado em relação constante de velocidade de pseudo-primeira ordem para tiobenzoato de butilo (9a) ( $k_{obs}/k_{obs}9a$ ) no mesmo meio biológico. 97 | 97  |
| Figura 64 Atividade dos compostos dependendo do comprimento de cadeia alquílica apresentado em CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ): .....  | 101 |
| Figura 65 Atividade comparativa entre ésteres e amidas com diferentes cadeias alquílicas (de 4 a 14 átomos de carbono) apresentado em CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ): .....   | 102 |
| Figura 66 Atividade antimicrobiana intracelular de compostos testados contra <i>Mycobacterium bovis</i> BCG infectando macrófagos humanos THP-1. Os resultados apresentados em percentagem.....   | 105 |
| Figura 67 Comparação atividade/toxicidade das 3,5-dinitromenzamidas (7) com diferentes cadeias alquílicas (de 4 a 14 átomos de carbono) apresentado em $\mu\text{g/mL}$ .....   | 107 |
| Figura 68 Comparação atividade/toxicidade 3-nitro-5-(trifluorometil)benzamidas (8) com diferentes cadeias alquílicas (de 4 a 12 átomos de carbono) apresentado em $\mu\text{g/mL}$ . .....  | 108 |
| Figura 69 Síntese de ésteres de derivados de ácido benzóico substituído usando $\text{SOCl}_2$ . Método A1. 109   | 109 |
| Figura 70 Síntese de ésteres de derivados de ácido benzóico substituído usando $\text{SOCl}_2$ . Método A2. 109   | 109 |
| Figura 71 Síntese de ésteres de derivados de ácido benzóico substituído por catálise ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). 111   | 111 |
| Figura 72 Síntese das amidas de derivadas de ácido benzóico substituído usando $\text{SOCl}_2$ . Método C1. ....  | 112 |
| Figura 73 Síntese de amidas de derivados de ácido benzóico substituído usando $\text{SOCl}_2$ . Método C2. 112  | 112 |
| Figura 74 Síntese dos tioésteres de derivados de ácido benzóico substituído usando $\text{SOCl}_2$ . Método D. ....   | 114 |
| Figura 75 Representações alternativas de grupos nitro e exemplos de nitroaromáticos. <sup>162</sup> .....   | 146 |
| Figura 76 Mecanismo da formação do cloreto de ácido. <sup>112</sup> .....   | 147 |
| Figura 77 Mecanismo da formação do éster pela reação cloreto de ácido com o álcool. <sup>112</sup> .....  | 147 |
| Figura 78 Mecanismo da formação duma amida utilizando os reagentes cloreto de ácido e amina. <sup>112</sup> .....   | 148 |
| Figura 79 Mecanismo da formação dum éster utilizando ácido sulfúrico como catalisador (esterificação de Fisher). <sup>112</sup> .....   | 149 |
| Figura 80 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 1a.....  | 150 |
| Figura 81 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 1a.....   | 150 |
| Figura 82 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 1b .....   | 151 |
| Figura 83 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 1b .....  | 151 |
| Figura 84 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 1c.....  | 152 |
| Figura 85 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 1c.....   | 152 |
| Figura 86 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 1e.....  | 153 |
| Figura 87 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 1e.....   | 153 |
| Figura 88 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 2c.....  | 154 |
| Figura 89 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 2c.....   | 154 |
| Figura 90 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 3d .....   | 155 |
| Figura 91 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 3d .....  | 155 |
| Figura 92 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 3g .....   | 156 |
| Figura 93 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 3g .....  | 156 |
| Figura 94 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 4 <sup>a</sup> .....   | 157 |
| Figura 95 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 4a.....   | 157 |
| Figura 96 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 4b .....   | 158 |
| Figura 97 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 4b .....  | 158 |
| Figura 98 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 4c.....  | 159 |
| Figura 99 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 4c.....   | 159 |
| Figura 100 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 4d .....  | 160 |
| Figura 101 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 4d .....   | 160 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 102 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 4e.....  | 161 |
| Figura 103 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 4e.....   | 161 |
| Figura 104 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 5a.....  | 162 |
| Figura 105 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 5a.....   | 162 |
| Figura 106 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 5b.....  | 163 |
| Figura 107 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 5b.....   | 163 |
| Figura 108 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 5c.....  | 164 |
| Figura 109 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 5c.....   | 164 |
| Figura 110 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 5e.....  | 165 |
| Figura 111 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 5e.....   | 165 |
| Figura 112 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 6a.....  | 166 |
| Figura 113 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 6a.....   | 166 |
| Figura 114 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 6b.....  | 167 |
| Figura 115 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 6b.....   | 167 |
| Figura 116 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 6c.....  | 168 |
| Figura 117 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 6c.....   | 168 |
| Figura 118 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 6e.....  | 169 |
| Figura 119 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 6e.....   | 169 |
| Figura 120 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 7a.....  | 170 |
| Figura 121 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 7a.....   | 170 |
| Figura 122 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 7b.....  | 171 |
| Figura 123 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 7b.....   | 171 |
| Figura 124 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 7c.....  | 172 |
| Figura 125 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 7c.....   | 172 |
| Figura 126 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 7d.....  | 173 |
| Figura 127 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 7d.....   | 173 |
| Figura 128 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 7e.....  | 174 |
| Figura 129 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 7e.....   | 174 |
| Figura 130 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 7f.....  | 175 |
| Figura 131 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 7f.....   | 175 |
| Figura 132 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 7g.....  | 176 |
| Figura 133 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 7g.....   | 176 |
| Figura 134 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 8 <sup>a</sup> .....   | 177 |
| Figura 135 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 8a.....   | 177 |
| Figura 136 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 8b.....  | 178 |
| Figura 137 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 8b.....   | 178 |
| Figura 138 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 8c.....  | 179 |
| Figura 139 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 8c.....   | 179 |
| Figura 140 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 8d.....  | 180 |
| Figura 141 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 8d.....   | 180 |
| Figura 142 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 8e.....  | 181 |
| Figura 143 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 8e.....   | 181 |
| Figura 144 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 9a.....  | 182 |
| Figura 145 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 9a.....   | 182 |
| Figura 146 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 10a.....   | 183 |
| Figura 147 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 10a.....  | 183 |
| Figura 148 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 10c.....   | 184 |
| Figura 149 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 10c.....  | 184 |
| Figura 150 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 11a.....   | 185 |
| Figura 151 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 11a.....  | 185 |
| Figura 152 Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto 11b.....   | 186 |
| Figura 153 Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto 11b.....  | 186 |
| Figura 154 Representação gráfica da curva de calibração do composto 2c, usada na determinação da concentração do éster correspondente..... | 189 |
| Figura 155 Representação gráfica da curva de calibração do composto 6c, usada na determinação da concentração da amida correspondente..... | 189 |
| Figura 156 Cromatograma do composto 3.5-dinitrobenzoato de butilo, 3a, após 24h de reação de hidrólise química.....                        | 190 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 157 Cromatograma do composto N-butil-4-nitrobenzamida, 6a, após 54h de reação de hidrólise enzimática ..... | 191 |
|--|-----|

## Índice de Tabelas:

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 Classificação das espécies micobacterianas atendendo à sua patogenicidade para o Homem. <sup>25</sup> .....   | 6  |
| Tabela 2 Principais enzimas envolvidas na bioconversão de pró-fármacos à base de éster. ....   | 25 |
| Tabela 3 Estrutura molecular dos 20 ésteres, 20 amidas e 12 tioésteres de derivados dos ácidos fracos estudados.....   | 54 |
| Tabela 4 Sumário das características e rendimentos obtidos dos ésteres de derivados do ácido benzóico. ....  | 56 |
| Tabela 5 Sumário das características e rendimentos obtidos das amidas de derivadas do ácido benzóico. ....   | 58 |
| Tabela 6 Sumário das características e rendimentos obtidos dos tioésteres de derivados do ácido benzóico. ....   | 59 |
| Tabela 7 Sumários dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de prótão presentes nos espectros <sup>1</sup> H-RMN dos ésteres (s - singuleto alargado, d - duplete, t - tripleto, dd - duplete dupletos, dt - duplete tripletos, td –triplrto dupletos, m - multiplete).....   | 60 |
| Tabela 8 Sumários dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de carbono presentes nos espectros <sup>13</sup> C-RMN dos ésteres. ....  | 61 |
| Tabela 9 Sumários dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de prótão presentes nos espectros <sup>1</sup> H-RMN das amidas (s - singuleto alargado, d - duplete, t - tripleto, dd - duplete dupletos, dt - duplete tripletos, td – tripleto dupletos, m - multiplete). ....  | 62 |
| Tabela 10 Sumários dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de carbono presentes nos espectros <sup>13</sup> C-RMN das amidas. ....  | 63 |
| Tabela 11 Sumários dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de prótão presentes nos espectros <sup>1</sup> H-RMN dos tioésteres (s - singuleto alargado, d - duplete, t - tripleto, dd - duplete dupletos, dt - duplete tripletos, td – tripleto dupletos, m - multiplete). ....   | 64 |
| Tabela 12 Sumários dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de carbono presentes nos espectros <sup>13</sup> C-RMN dos tioésteres. ....  | 64 |
| Tabela 13 Tempos de retenção (tR) e comprimentos de onda de absorção (λ) dos compostos testados nos estudos de HPLC no eluente acetonitrilo: água (80:20) com dihidrogenofosfato de potássio (0,001 mol/dm <sup>3</sup> e 0,002% (v/v) de ácido fosfórico (85%)). tR em minutos e λ em nanômetros. ....  | 66 |
| Tabela 14 Resultados obtidos dos valores de percentagem de degradação do éster ou amida, ao fim de 14 dias, em tampão de fosfato pH 7,4. ....  | 68 |
| Tabela 15 Efeito do pKa dos ácidos fracos na percentagem de degradação ao fim de 354 horas dos ésteres derivados de ácido benzóico substituído com cadeia 4 átomos de carbono: benzoato de butilo (1a), 4-nitrobenzoato de butilo (2a), 3,5-dinitrobenzoato de butilo (3a) e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoato de butilo (4a).....  | 71 |
| Tabela 16 Estudo da hidrólise enzimática. Constantes de velocidade de reação e tempos de semivida de ésteres/tioésteres de derivados de ácido benzóico substituído em plasma humano à temperatura 37°C durante 72h. Concentração inicial de substrato (éster/tioéster) - 5x10 <sup>-4</sup> M com 2% de ACN. ....  | 73 |
| Tabela 17 Resultados obtidos dos valores de percentagem de degradação de ésteres/amidas, ao fim de 72 horas, em ensaio de estabilidade enzimática, plasma humano. ....   | 82 |
| Tabela 18 Estudo da hidrólise enzimática. Constantes de velocidade de reação e tempos de semivida de ésteres/amidas derivado de ácido benzóico substituído em homogenato de <i>M. smegmatis</i> à temperatura 37°C durante 48h. Concentração inicial de substrato (éster/amida) - 5x10 <sup>-4</sup> M com 2% de ACN. ....   | 85 |
| Tabela 19 Estudo da hidrólise enzimática. Percentagem de degradação de ésteres/amidas derivadas de ácido benzóico substituído em homogenato de <i>M. smegmatis</i> à temperatura 37°C durante 48h. Concentração inicial de substrato (éster/amida) - 5x10 <sup>-4</sup> M com 2% de ACN. ....  | 86 |
| Tabela 20 Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem (k <sub>obs</sub> × 100 h <sup>-1</sup> ) dos ésteres nos estudos de estabilidade enzimática em plasma humano e em homogenato de <i>M. smegmatis</i> e a razão entre as mesmas constantes (k <sub>obs</sub> ) e a constante de velocidade pseudo-primeira ordem para H-benzoato de butilo (1a) M <sub>(k<sub>obs</sub>/k<sub>obs1a</sub>)</sub> no mesmo meio biológico..... | 93 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 21 Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem ( $k_{obs} \times 100 \text{ h}^{-1}$ ) dos tioésteres nos estudos de estabilidade enzimática em plasma humano e em homogenato de <i>M. smegmatis</i> e a razão entre as mesmas constantes ( $k_{obs}$ ) e a constante de pseudo-primeira ordem para tiobenzoato de butilo (9a) ( $k_{obs}/k_{obs9a}$ ) no mesmo meio biológico. .... | 96  |
| Tabela 22 Resultados obtidos dos ensaios de atividade in vitro, em <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, dos valores obtidos de CIM em $\mu\text{g/mL}$ e dos valores obtidos de CBM em $\mu\text{g/mL}$ . ....   | 99  |
| Tabela 23 Resultados obtidos dos ensaios de atividade in vitro, em <i>M. avium</i> DSM 44156, <i>M. smegmatis</i> mc2 155, <i>M. bovis</i> BCG e <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, dos valores obtidos de CIM em $\mu\text{g/mL}$ e dos valores obtidos de CBM em $\mu\text{g/mL}$ . ....   | 104 |
| Tabela 24 Resultados obtidos dos ensaios de citotoxicidade, representados por $CL_{50}$ em $\mu\text{g/mL}$ , dos ensaios de atividade, representados por CIM, em $\mu\text{g/mL}$ e índice de toxicidade/atividade .....   | 107 |
| Tabela 25 Condições experimentais da síntese de ésteres derivados de ácido benzóico substituído pelo método A1.....   | 110 |
| Tabela 26 Condições experimentais da síntese de ésteres derivados de ácido benzóico substituído pelo método A2.....   | 111 |
| Tabela 27 Condições experimentais da síntese de amidas derivadas de ácido benzóico substituído pelo método C2.....  | 113 |
| Tabela 28 Condições experimentais da síntese de tioésteres derivados de ácido benzóico substituído pelo método D.....   | 115 |
| Tabela 29 Curvas de Calibração obtidas através da análise por HPLC das soluções com concentrações $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ , $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ , $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ , $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ e $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ . ....   | 188 |
| Tabela 30 Tempos de retenção do éster, 2c, e do ácido 4-nitrobenzóico.....  | 190 |
| Tabela 31 Tempos de retenção da amida, 6a, e do ácido 4-nitrobenzóico.....  | 191 |
| Tabela 32 Atividade antimicrobiana intracelular de compostos testados contra <i>Mycobacterium bovis</i> BCG infectando macrófagos humanos THP-1. Os resultados apresentados em CFU. ....  | 192 |

# 1. Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença antiga - estudos de esqueletos humanos mostram que ela afeta humanos há milhares de anos – mas a sua causa permaneceu desconhecida até 24 de março de 1882, quando o Dr. Robert Koch anunciou a descoberta do bacilo posteriormente denominado *M.tuberculosis*.

A TB é uma doença transmissível que é uma das principais causas de problemas de saúde, sendo referenciada como uma das principais causas de morte em todo o mundo (encontra-se entre as 10 primeiras) e a principal causa de morte por um único agente infeccioso (classificação acima de HIV/AIDS). É causada pelo bacilo *M. tuberculosis*, que se transmite quando as pessoas com tuberculose expõem bactérias para o ar; por exemplo, tossindo. Normalmente afeta os pulmões (TB pulmonar), mas também pode afetar outros locais (TB extrapulmonar). Cerca de um quarto da população mundial está infetada com *M. tuberculosis*, portanto, em risco de desenvolver tuberculose.<sup>1</sup>

Uma proporção relativamente pequena (5–10%) de pessoas das que se estima estarem infetadas (1,7 bilhões) com *M. tuberculosis* desenvolverão a doença durante a sua vida. No entanto, a probabilidade de desenvolver tuberculose é muito maior entre as pessoas infetadas com HIV; também é maior entre pessoas afetadas por outros fatores de risco como subnutrição, diabetes, tabagismo e consumo de álcool.<sup>1</sup>

Sem tratamento, a taxa de mortalidade por TB é alta. Estudos sobre a história natural da tuberculose na ausência de tratamento com medicamentos anti-TB (realizados antes que os tratamentos com medicamentos se tornassem disponíveis) mostraram que cerca de 70% dos indivíduos com tuberculose pulmonar com baciloscopia positiva morreram 10 anos após o diagnóstico.<sup>1</sup>

Os tratamentos eficazes com medicamentos foram desenvolvidos pela primeira vez na década de 1940. O *M. tuberculosis*, desenvolveu várias resistências aos tratamentos existentes. Essa bactéria possui um envelope celular muito complexo, constituído por ácidos micólicos, que interfere na sensibilidade da bactéria aos antibióticos hidrofóbicos. O tratamento atualmente recomendado para casos de TB suscetíveis a medicamentos é um regime de seis meses com quatro medicamentos de primeira linha: isoniazida (3), rifampicina (4), etambutol (7) e pirazinamida (8). No entanto, surgiram estirpes resistentes a alguns destes fármacos, dando origem a dois outros tipos da doença: a tuberculose multirresistente e a tuberculose extensivamente multirresistente. Nestes casos, o tratamento envolve outro tipo de fármaco de 2ª e 3ª linha. Estes medicamentos são mais caros com vários efeitos colaterais.<sup>1,8</sup>

O surgimento da tuberculose resistente e multirresistente justifica a necessidade urgente de descobrir fármacos que possam ser usados em regimes terapêuticos mais curtos e em doses mais

baixas do que os atualmente existentes.

Em trabalhos de investigação anteriores sobre a tuberculose<sup>2,3,4,5</sup>, observou-se que alguns ácidos fracos tinham atividade significativa no *M. tuberculosis* e que os álcoois de cadeia longa (LCA) usados em pró-fármacos como transportadores também tinham atividade relevante. Surgiu então a ideia de obter pró-fármacos mútuos contendo as duas partes ativas unidas por uma ligação éster. Esses compostos podem ter potencialmente uma ação sinérgica e uma melhor permeabilidade entrando mais facilmente nas micobactérias devido à sua adequada lipofilia.

Os pró-fármacos são compostos que não são biologicamente ativos, ou seja, precisam de ser ativados por meio de reações químicas ou enzimáticas. Esse tipo de composto é sintetizado quando a substância ativa apresenta propriedades indesejáveis, como baixa absorção, rápida degradação por enzimas, pouca permeabilidade nas células de micobactérias, entre outras.

Os pró-fármacos precisam de ser estáveis durante a fase de absorção e transporte, mas suficientemente lábeis com as esterases micobacterianas para serem ativados. Nesse sentido, é necessário sintetizar pró-fármacos estáveis à hidrólise por enzimas, plasma e fígado do hospedeiro, que penetram na membrana celular da bactéria, portanto lipofílicos e que são ativos contra a bactéria *M. tuberculosis*.

Como as micobactérias são ricas em atividade esterásica, é possível usar a esterase micobacteriana para libertar fármacos no local de ação. Estudos anteriores demonstraram que os ésteres são facilmente ativados por esterases micobacterianas, mas são estáveis na presença de plasma humano<sup>5</sup>. Diferentes compostos com atividade relevante na tuberculose foram também sintetizados: derivados do ácido benzóico<sup>6</sup>, ácido pirazinóico<sup>2,5</sup> ou o grupo das quinolonas<sup>7,8</sup>.

Visto que dados preliminares obtidos no nosso laboratório mostraram que ésteres de ácido benzóico se tornam mais resistentes à hidrólise no plasma à medida que o comprimento da cadeia do grupo alcoxi aumenta, decidimos testar se a mesma abordagem poderia ser usada para aumentar a estabilidade de pró-fármacos derivados de outros ácidos fracos. Paralelamente, e para além dos ésteres decidimos incluir no estudo as amidas. Além destas os tioésteres também foram incluídos para avaliar a sua atividade e estabilidade.

Devido ao fato de que derivados de ácidos fracos contendo o grupo nitro foram especialmente interessantes em termos de atividade e toxicidade<sup>9</sup>, esta tese irá concentrar-se na obtenção de derivados do LCA (aminas, tiois) e ácidos fracos contendo grupos nitro, ampliando a gama de compostos já obtidos, no estudo da sua atividade, estabilidade e ativação e na exploração do mecanismo de ação dos compostos.

Neste trabalho, derivados de ácido benzóico, ácido 4-nitrobenzóico, ácido 3,5-dinitrobenzóico e ácido 3-nitro-5-trifluorometilbenzóico foram sintetizados, contendo comprimentos de cadeia linear de 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 átomos de carbono. Os derivados sintetizados são ésteres, tioésteres

e amidas porque são mais lipofílicas, portanto, penetram nas micobactérias mais facilmente do que o ácido correspondente. Para que os compostos sejam ativos, é necessário que atinjam o local de ação sem sofrer alterações em sua estrutura. Assim, é necessário que esses compostos sejam resistentes à hidrólise por enzimas humanas.

O grupo nitro é considerado um grupo funcional versátil e único em química medicinal. Apesar de uma longa história de uso em terapêutica, o grupo nitro tem problemas de toxicidade e é frequentemente classificado como um alerta estrutural ou toxicóforo. Em geral, os fármacos contendo grupos nitro têm sido amplamente associados à mutagenicidade e genotoxicidade.<sup>10</sup> Nesse contexto, as relações estrutura-mutagenicidade ou estrutura-genotoxicidade têm sido estudadas.

Todos os derivados foram sintetizados partindo dos ácidos benzóicos substituídos correspondentes, os quais, após conversão nos respectivos cloretos de ácido ou após a protonação do ácido carboxílico reagiram com diferentes álcoois (tiois, aminas).

Os estudos de atividade foram realizados na estirpe H37Rv do *M. tuberculosis*. Nestes estudos, foram analisadas as concentrações mínimas necessárias para inibir 90% e pelo menos 50% do crescimento bacteriano. Observou-se aqui que as amidas lipofílicas são mais ativas do que os ésteres ou tioésteres derivados, entre as quais as amidas dinitrosubstituídas e 3-nitro-5-trifluorometilsubstituídas possuem maior atividade.

Os estudos de estabilidade foram realizados em homogenato de micobactéria, em plasma humano e em tampão fosfato pH 7,4. Os estudos em plasma humano permitiram observar se os compostos são suscetíveis à hidrólise enzimática por partes das enzimas presentes neste compartimento corporal. Os testes em tampão fosfato pH 7,4 foram realizados para avaliar a estabilidade química dos compostos. Os estudos em homogenato de micobactéria foram realizados para avaliar a reação de hidrólise enzimática em micobactéria.

Verificou-se que novos pró-fármacos com base em ésteres lipofílicos ativos contra *M. tuberculosis* suscetível têm estabilidade adequada na presença de plasma. As amidas são mais estáveis no plasma e têm maior atividade contra *M. tuberculosis*. A razão provavelmente está na velocidade de ativação de ambos os tipos de pró-fármacos; enquanto os ésteres são facilmente ativados por esterases micobacterianas, as amidas são resistentes à ativação e não se convertem em ácidos correspondentes a uma velocidade adequada. Avaliando a estabilidade e atividade de ambos os tipos de compostos surgiu ideia que os compostos não necessitam ativação enzimática para atuar.

Os tioésteres possuem atividade e estabilidade semelhante com ésteres.

Também foi feita uma comparação entre as constantes cinéticas de hidrólise enzimática e hidrólise química para avaliar se a hidrólise química tem impacto nos estudos de estabilidade em plasma humano. Verificou-se que para todos os compostos esse tipo de hidrólise não tem impacto.

Com base neste estudo, pretende-se desenvolver novos fármacos com atividade contra a tuberculose, a fim de combater estirpes resistentes aos tratamentos atuais.

Futuramente, serão necessários mais estudos com esse tipo de derivados, como testes de toxicidade, estudos de modelagem, estudos com homogenato de fígado, entre outros. Além disso, é necessário compreender o mecanismo que leva à inibição do crescimento bacteriano pelos derivados do ácido benzóico substituído.

## **1.1 Tuberculose**

### **1.1.1 Epidemiologia**

Em todo o mundo, cerca de 10 milhões de pessoas adoecem com tuberculose (TB) a cada ano. A maioria das pessoas que desenvolvem TB (cerca de 90%) são adultos. A proporção de homens para mulheres é de 2:1, e as taxas de casos a nível nacional variam de menos de 50 (Emirados Árabes Unidos) a mais de 5000 (África do Sul) por 1 milhão de habitantes por ano. Quase 90% dos casos a cada ano ocorrem em 30 países com alta taxa de TB. Estima-se que 1,7 bilhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas com *M. tuberculosis* e, portanto, em risco de desenvolver a doença.<sup>1,11</sup>

Com um diagnóstico e tratamento adequados com antibióticos de primeira linha durante 6 meses, a maioria das pessoas que desenvolvem TB podem ser curadas e a transmissão da infecção reduzida. O número de casos de TB que ocorrem a cada ano (portanto, o número de mortes relacionadas com TB) também pode ser diminuído pela redução da prevalência de fatores de risco (por exemplo, tabagismo, diabetes e infecção por HIV), fornecendo tratamento preventivo para pessoas com infecção latente e ação multissetorial sobre os determinantes mais amplos da infecção (como, por exemplo, pobreza, qualidade de vida e subnutrição).<sup>1</sup>

A tuberculose continua a ser um grave problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento, voltando a ocupar um papel de destaque entre as principais doenças infecciosas. Muitos foram os fatores que contribuíram para isso, podendo-se destacar a desigualdade social, os aglomerados populacionais, os movimentos migratórios, o envelhecimento da população, o aparecimento, cada vez mais comum de estirpes de bacilos resistentes aos fármacos conhecidos, e o surgimento, na década de 80, da “Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA)” ou “Acquired Immuno Deficiency Syndrome (AIDS)”.<sup>11</sup>

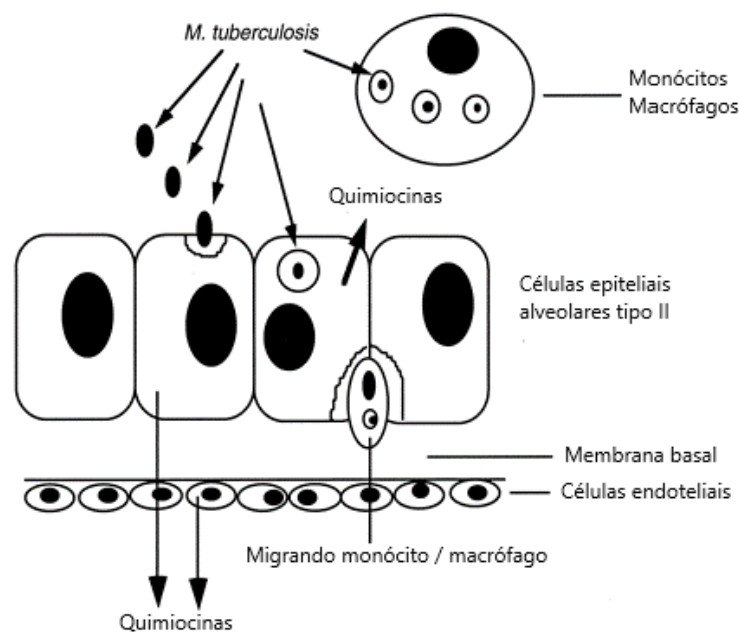
### **1.1.2 Etiologia e Patogênese**

A tuberculose surge quando um indivíduo saudável inala provenientes de pessoas com tuberculose ativa. As gotículas inaladas devido ao seu pequeno tamanho penetram nos alvéolos terminais dos pulmões, onde são fagocitadas por macrófagos pulmonares e células dendríticas. Se os macrófagos forem incapazes de destruir as micobactérias, elas continuam a multiplicar-se até à

ruptura dos mesmos. Os bacilos libertados são posteriormente ingeridos por macrófagos sanguíneos inativados e atraídos para o pulmão por fatores quimiotáticos.<sup>12</sup> Nos pulmões, o *M. tuberculosis* também pode infectar células endoteliais, células M e células epiteliais tipo 1 e 2, o que significa que *M. tuberculosis* pode infectar células não fagocíticas também.<sup>12,13</sup>

A forma extrapulmonar, que atinge outros órgãos que não o pulmão, ocorre mais frequentemente em pessoas infectadas com o HIV, especialmente entre aquelas com comprometimento imunológico.<sup>14</sup>

Na fase inicial da infecção, a bactéria internalizada atravessa a barreira epitelial-endotelial e a captação de *M. tuberculosis* pelas células epiteliais alveolares desencadeia a liberação de quimiocinas<sup>1</sup>, criando um gradiente responsável pela migração dos fagócitos mononucleares infectados. A liberação de quimiocinas (principalmente MCP-1) pelas células epiteliais alveolares cria um gradiente entre o lado alveolar e o lado endotelial, resultando na estimulação da migração de monócitos. A migração de monócitos através da barreira epitélio-endotelial alveolar depende não apenas da produção de quimiocinas, mas também da presença de moléculas de superfície tanto nas células epiteliais alveolares quanto nas células endoteliais. Figura 1 mostra um esquema da translocação de *M. tuberculosis* através da parede alveolar.<sup>15</sup>



**Figura 1 Representação esquemática dos estágios de translocação do *M. tuberculosis* através da parede alveolar.<sup>15</sup>**

<sup>1</sup> Quimiocinas ou citocinas quimiotáticas, são uma família de pequenas citocinas ou proteínas sinalizadoras secretadas por células que induzem o movimento direcional de leucócitos, bem como outros tipos de células, incluindo células endoteliais e epiteliais.

### 1.1.3 Micobactérias

As micobactérias são bacilos Gram-positivos finos (0,2 - 0,4 × 2 - 10 µm), imóveis, aeróbios e que não formam esporos. A parede celular contém peptidoglicano semelhante ao de outros organismos Gram-positivos. Ligado ao peptidoglicano está uma miríade de polissacarídeos de cadeia ramificada, proteínas e lípidos. Os ácidos gordos de cadeia longa chamados ácidos micólicos são de particular importância. Estes ácidos que dão nome às micobactérias, constituem mais de 60% da massa total da parede celular e são definidos para cada espécie.<sup>13</sup>

O género *Mycobacterium* compreende mais de cento e cinquenta espécies reconhecidas, a maioria das quais reside no meio ambiente e muitas podem ser patogênicas para mamíferos.<sup>16</sup>

Essas bactérias são divididas em 2 grupos: Micobactérias não tuberculosas (NTM) e complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC). A categoria das micobactérias não tuberculosas (NTM) inclui todas as micobactérias que podem causar outras doenças, mas não a tuberculose.<sup>17,18</sup> Espécies como *M. avium*, *M. smegmatis* e *M. ulcerans* pertencem a este grupo.<sup>19</sup> Por outro lado, as micobactérias pertencentes ao MTC são as que transmitem a doença da tuberculose. Este grupo inclui: *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. caprae*.<sup>8,20</sup> Além desta distinção, também se utiliza outra classificação baseada na velocidade de crescimento das bactérias. Assim estas podem ser classificadas em bactérias de crescimento rápido (como, por exemplo, *M. smegmatis*) e bactérias de crescimento lento (como, por exemplo, *M. bovis* e *M. tuberculosis*). As espécies de micobactérias com maior significado clínico estão descritas na Tabela 1.<sup>13,21</sup>

**Tabela 1 Classificação das espécies micobacterianas atendendo à sua patogenicidade para o Homem.**<sup>25</sup>

| Estritamente patogênicas | Potencialmente patogênicas   | Raramente patogênicas         |
|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <i>M. tuberculosis</i>   | <i>M. avium</i> (2)          | <i>M. goodii</i>              |
| <i>M. bovis</i> (1)      | <i>M. intracelulares</i> (2) | <i>M. terrae</i>              |
| <i>M. africanum</i> (1)  | <i>M. scrofulaceum</i>       | <i>M. triviale</i>            |
|                          | <i>M. kansasii</i>           | <i>M. nonchromogenicum</i>    |
| <i>M. leprae</i>         | <i>M. xenopi</i>             | <i>M. flavescens</i>          |
|                          | <i>M. marinum</i>            | <i>M. farcinogenes</i>        |
| <i>M. ulcerans</i>       | <i>M. simiae</i>             | <i>M. microti</i> (1)         |
| <i>M. haemophilum</i>    | <i>M. szulgai</i>            | <i>M. lepraemurium</i>        |
|                          | <i>M. paratuberculosis</i>   |                               |
|                          | <i>M. asiaticum</i>          | <i>M. smegmatis</i> *         |
|                          | <i>M. malmoense</i>          | <i>M. thermoresistibile</i> * |
|                          | <i>M. shimoidei</i>          | <i>M. fallax</i> *            |
|                          |                              | <i>M. phlei</i> *             |
|                          | <i>M. fortuitum</i> *        | <i>M. vaccae</i> *            |
|                          | <i>M. chelonae</i> *         | <i>M. parafortuitum</i> *     |
|                          |                              | <i>M. aurum</i> *             |
|                          |                              | <i>M. chitae</i> *            |
|                          |                              | <i>M. duvalii</i> *           |
|                          |                              | <i>M. gilvum</i> *            |
|                          |                              | <i>M. neoaurum</i> *          |
|                          |                              | <i>M. gadium</i> *            |
|                          |                              | <i>M. senegalense</i> *       |
|                          |                              | <i>M. komossense</i> *        |
|                          |                              | <i>M. sphagni</i> *           |
|                          |                              | <i>M. agri</i> *              |
|                          |                              | <i>M. aichiense</i> *         |

\*- Micobactérias de crescimento rápido; (1)-Micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*; (2)- Micobactérias pertencentes ao complexo *M. avium*.

As micobactérias incluem uma ampla gama de espécies patogênicas para humanos e animais. Algumas, como *M. tuberculosis*, ocorrem exclusivamente em humanos em condições naturais. Outras, como *M. intracellulare*, podem infectar vários hospedeiros, incluindo humanos, mas também existem no estado de vida livre. A maioria das espécies não patogênicas são muito abundantes no meio ambiente. As doenças causadas por micobactérias desenvolvem-se geralmente lentamente, seguem um curso crônico e provocam uma resposta granulomatosa. A infectividade de espécies patogênicas é bastante alta, mas a virulência para humanos saudáveis é baixa. As bactérias mais patogênicas desse gênero são o *M. tuberculosis*, causador da tuberculose, o *M. leprae*, causador da hanseníase, e o *M. ulcerans*, causador da úlcera, infecção superficial grave.<sup>13</sup>

O *M. smegmatis* pode ser encontrado principalmente no solo, água e plantas.<sup>166</sup> Em termos metabólicos, o *M. smegmatis* é um organismo aeróbio, que realiza a fosforilação oxidativa, de modo a obter a energia necessária para o seu crescimento. Este microorganismo é ainda quimiolitotrófico, utilizando compostos inorgânicos como o monóxido de carbono do solo, como fonte de carbono e energia.<sup>21,217</sup>

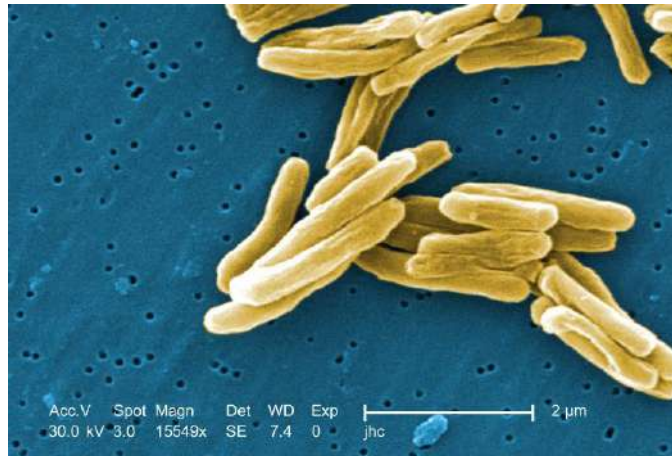
Esta micobactéria é frequentemente usada como modelo para o estudo da tuberculose, visto ser uma bactéria de crescimento rápido, não entrar em células epiteliais e não ser patogênica.<sup>217</sup>

O *M. bovis* é uma bactéria aeróbia, de crescimento lento e que causa a tuberculose em bovinos.<sup>218</sup> Esta micobactéria é semelhante ao *M. tuberculosis*, no que diz respeito ao metabolismo e estrutura celular.<sup>21</sup> Estirpes atenuadas de *M. bovis* têm sido utilizadas em vacinas antituberculose BCG desde a década de 1920.<sup>284</sup>

### **1.1.3.1 *Mycobacterium tuberculosis***

O *M. tuberculosis* é uma bactéria aeróbia e necessita de elevados níveis de oxigênio para sobreviver. A reativação geralmente ocorre em áreas do corpo com níveis de oxigênio relativamente altos e baixa drenagem linfática, mais frequentemente no ápice pulmonar.<sup>13</sup>

O bacilo *M. tuberculosis* pertence ao gênero *Mycobacterium*, família *Mycobacteriaceae*, sub-ordem *Corynebacteriaceae*, ordem *Actinomycetales*.<sup>23,24</sup> O *M. tuberculosis* é um bacilo (estrutura bacilar ou cocobacilar) reto ou ligeiramente curvo (Figura 2).<sup>24,25</sup>



**Figura 2** *M. tuberculosis* observado por uma microscopia eletrônica.<sup>26</sup>

As colônias dessas micobactérias ou apresentam uma coloração castanho-brilhante ou não são pigmentadas e dificilmente podem ser coradas pelo método de Gram. (Figura 3) No entanto, são consideradas como bactérias Gram-positivas pela estrutura básica da parede celular, que é típica destas bactérias: uma membrana plasmática interna recoberta por uma camada espessa de peptidoglicano e ausência de membrana externa.<sup>24,26,27</sup>

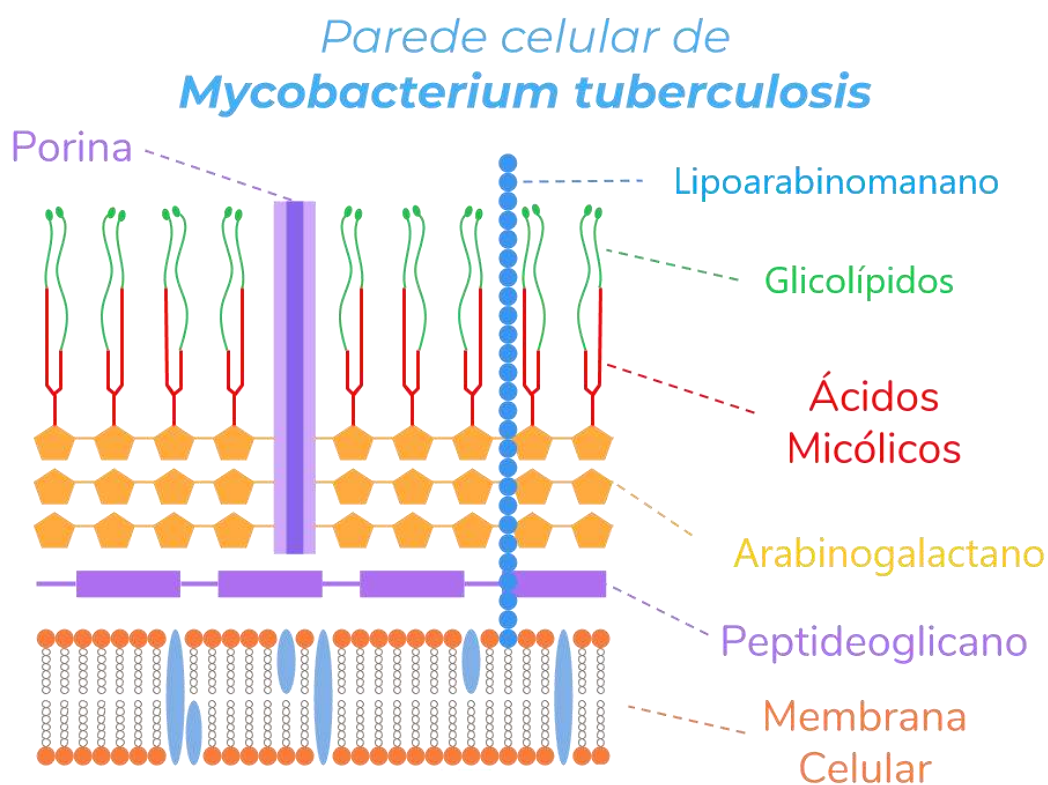


**Figura 3** Colônias de *M. tuberculosis* em meio Lowenstein-Jensen.<sup>26</sup>

Além destas características, as bactérias do complexo formam agrupamentos de ramos alongados e tortuosos mais conhecidos como “cordas”.<sup>24</sup> Os ácidos micólicos do envelope são lípidos alfa-ramificados únicos encontrando-se também na parede celular de *Corynebacterium*. Pensa-se que os ácidos micólicos sejam determinantes na virulência do *M. tuberculosis*. Provavelmente, eles previnem o ataque à micobactéria por

proteínas catiónicas<sup>2</sup>, lisozimas<sup>3</sup> e radicais de oxigénio no grânulo fagocítico.<sup>26,28</sup> O tempo de geração de *M. tuberculosis* em animais infetados é normalmente de 24h. O estado de latência em que o bacilo permanece inativo dentro do tecido infetado resulta da resposta imune mediada por células que não são capazes de erradicar a infeção. Para prevenir o crescimento do *M. tuberculosis* durante infeções persistentes, a estratégia utilizada pelo hospedeiro consiste na formação de granulomas (agregados de células imunes em redor dos tecidos infetados).<sup>285</sup> As micobactérias podem permanecer nesse estado de latência durante décadas e, posteriormente, uma falha do sistema imunológico pode permitir o seu renascimento e a ativação da doença.<sup>8, 29</sup>

### 1.1.3.1.1 Estrutura da parede celular e permeabilidade aos fármacos



**Figura 4** Representação esquemática do envelope celular do *M. tuberculosis*.

Como já mencionado, as micobactérias possuem uma parede celular com características bastante particulares, que influencia diretamente a permeabilidade a

<sup>2</sup> proteínas catiónicas - também conhecida como ribonuclease 3, é uma proteína básica localizada na matriz primária dos eosinófilos e possui atividades neurotóxicas, helminto-tóxicas e ribonucleolíticas.

<sup>3</sup> Lisozima é uma proteína que destrói o esqueleto glicosídico do peptidoglicano, ou seja, destrói a camada protetora de muitas bactérias.

alguns fármacos. A parede celular é altamente hidrofóbica o que diminui a permeabilidade a muitos compostos (Figura 4).<sup>22,31,37-39</sup> É composta por dois segmentos, superior e inferior. A camada seguinte é constituída por peptidoglicano (PG) ligado covalentemente ao arabinogalactano (AG), que por sua vez está ligado aos ácidos micólicos.<sup>32,34</sup> Este conjunto é denominado núcleo da parede celular do complexo micolil arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP). O segmento superior é fino e hidrofóbico, rico em ácidos micólicos e em ácidos gordos ramificados.<sup>32</sup> Os ácidos micólicos representam um terço (massa seca) desse envelope que para além destes também é constituído por ácidos gordos  $\beta$ -hidroxi  $\alpha$ -ramificados exceccionalmente longos (até 90 átomos de carbono).<sup>33</sup> O folheto externo dessa membrana consiste em lípidos menores e extraíveis.<sup>35</sup> A membrana externa apresenta baixa fluidez com temperaturas de transição de fase de até 70 ° C e é uma barreira de permeação extremamente eficiente protegendo a célula de compostos tóxicos.<sup>36</sup>

Os ácidos micólicos são de grande importância na estrutura e manutenção da parede celular, visto que constituem a zona interna da bicamada lipídica e possuem baixa fluidez, que contribui para a baixa permeabilidade da parede celular microbiana e para a sua resistência natural a fármacos.<sup>21,40</sup>

Estes micróbios produzem uma diversidade fascinante de lípidos. O elevado conteúdo lipídico da parede celular micobacteriana constitui uma barreira na difusão dos antimicrobianos. Por exemplo, a natureza hidrofóbica da parede celular e a sua constituição em ácidos micólicos e glicolípidos de cadeia longa, permite que fármacos hidrofóbicos se difundam com alguma facilidade.<sup>40</sup> No entanto, o mesmo não acontece com os antimicrobianos hidrofílicos. Para a absorção de pequenos nutrientes hidrofílicos, as micobactérias possuem canais especiais que cruzam a membrana externa, geralmente chamados porinas. As porinas podem ser definidas como canais proteicos que predominam na parede das micobactérias e que são responsáveis pelo influxo de solutos hidrofílicos, e antibióticos a uma baixa velocidade de absorção.<sup>30,40</sup> Além, de permitirem a passagem de substâncias, a existência de porinas também influencia o crescimento micobacteriano e a resistência a fármacos. A concentração de porina em *Mt* é baixa, o que provavelmente reduzirá a vulnerabilidade e a taxa de crescimento.<sup>22</sup> Deste modo, por vezes, o crescimento micobacteriano é perturbado devido à passagem lenta de solutos hidrofóbicos por difusão passiva.<sup>30</sup>

Tendo em consideração a arquitetura de parede celular, prevê-se que todas as micobactérias precisam de porinas para superar a barreira de permeabilidade de membrana externa (ME) a solutos hidrofílicos. Estas porinas são consideradas cruciais para a eficácia do fármaco porque os três fármacos importantes – isoniazida (3), etambutol (7) e pirazinamida (8) - são pequenas moléculas polares, que podem facilmente entrar dentro da micobactéria através do canal de porina.<sup>22,41</sup>

O *M. tuberculosis* e o *M. smegmatis* apresentam divergência na sequência das porinas o que pode realmente refletir diferenças estruturais e funcionais destas estruturas. As porinas são as primeiras portas da célula bacteriana e, como tal, devem permitir o influxo de nutrientes necessários ao crescimento e, ao mesmo tempo, proteger as células de concentrações potencialmente prejudiciais de compostos tóxicos.<sup>42</sup>

#### 1.1.4 Tratamento

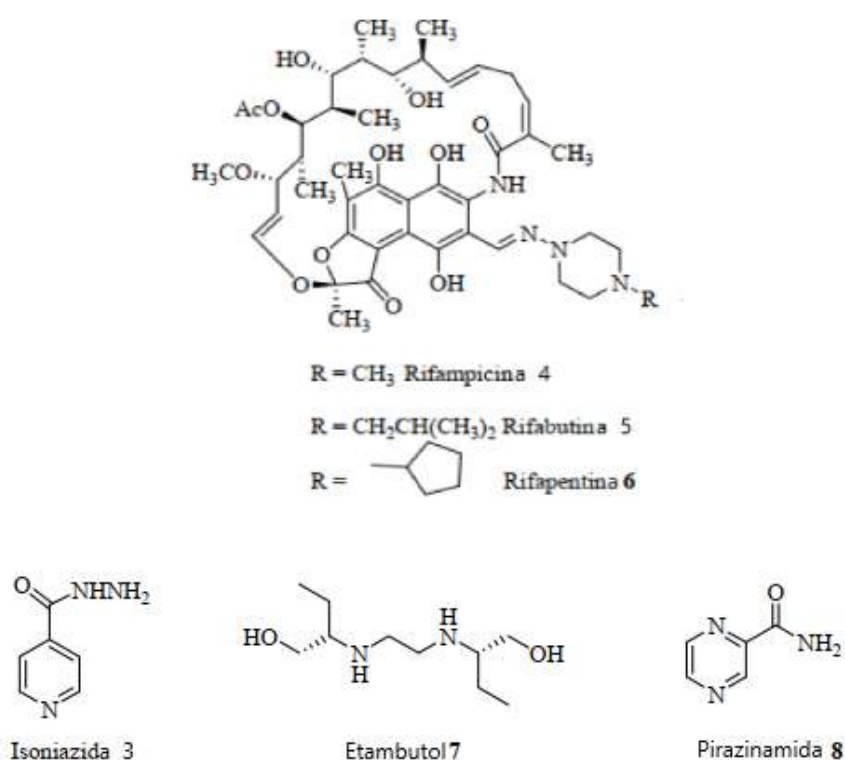
Os princípios básicos para o tratamento da tuberculose incluem a associação medicamentosa adequada, com doses corretas e uso por tempo suficiente, além da supervisão da toma dos medicamentos. Se o esquema terapêutico for seguido de forma adequada a cura é garantida em praticamente 100% dos casos assim como a redução do período de transmissibilidade da doença.<sup>23</sup>

As micobactérias responsáveis pela tuberculose são patógenos intracelulares. No interior dos macrófagos os bacilos multiplicam-se de forma lenta, já que as condições são desfavoráveis, devido ao pH ácido do meio, à ação enzimática da célula e à deficiente oferta de oxigênio.<sup>23</sup> Como crescem mais devagar do que outras bactérias, os antibióticos mais ativos contra as células de crescimento rápido mostram-se relativamente ineficazes. As células de micobactérias também podem ficar latentes e, assim, totalmente resistentes a muitos fármacos ou morrer de modo muito lento. A parede celular das micobactérias rica em lípidos é impermeável a muitos agentes. As espécies de micobactérias são patógenos intracelulares, e os organismos que residem dentro dos macrófagos são inacessíveis aos fármacos que penetram mal nessas células.<sup>43</sup> Dessa forma, no interior dos macrófagos, os fármacos mais ativos são os que se difundem em meio intracelular e atuam em pH ácido, que são: rifampicina (4), pirazinamida (8) e etambutol (7).<sup>23</sup>

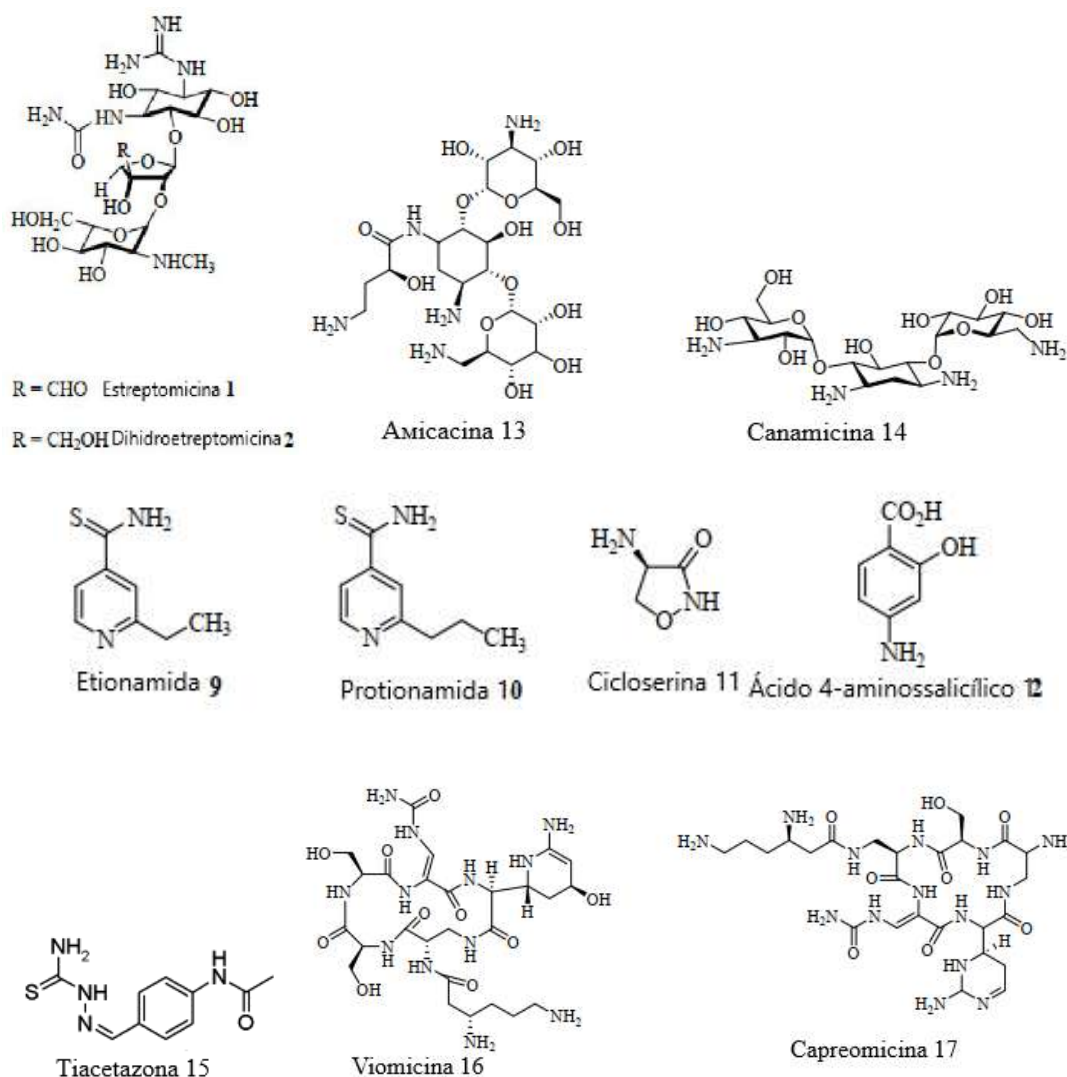
As micobactérias apresentam grande capacidade em desenvolver resistência. A prevalência de mutantes resistentes a isoniazida (3) é de cerca de 1 em 10<sup>6</sup> bacilos.

Como as cavidades de TB podem conter até  $10^7$  a  $10^9$  microorganismos, pode-se esperar resistência preexistente nas cavidades pulmonares de TB de pacientes não tratados. Esses mutantes espontâneos podem ser selecionados e amplificados pela monoterapia com isoniazida (3). Assim, para obviar o aparecimento de mutantes espontâneos são geralmente usados dois ou mais agentes. Como as mutações que resultam em resistência aos medicamentos são acontecimentos independentes, a probabilidade de resistência a dois agentes antimicobacterianos é pequena, cerca de 1 em  $10^{12}$  ( $1 \times 10^6 \times 10^6$ ), probabilidade baixa considerando o número de bacilos envolvidos.<sup>43,44</sup>

A quimioterapia da tuberculose iniciou-se em 1944 com introdução da estreptomicina (SM) (1), um antibiótico aminoglicosídeo efetivo no tratamento da tuberculose, que foi isolado de cultura de *Streptomyces griseus*.<sup>45,46</sup> Vários agentes foram descobertos desde então, incluindo o ácido para-aminossalicílico (PAS) (12), isoniazida (INH) (3), pirazinamida (PZA) (8), cicloserina (11), etionamida (9), rifampicina (RMP) (4) e etambutol (EMB) (7).<sup>47</sup>



**Figura 5** Estrutura dos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da tuberculose.



**Figura 6 Estrutura dos fármacos de segunda linha utilizados no tratamento da tuberculose.**

Por volta de 1955 adotou-se a combinação da estreptomicina (1) com isoniazida (3) e o ácido p-aminossalicílico (12), de modo a evitar possíveis resistências resultantes de monoterapias. Com o aparecimento de multi-resistências surgiu outro regime de tratamento envolvendo um primeiro tratamento durante dois meses com 4 fármacos:<sup>48</sup>

- etambutol (7), isoniazida (3), rifampicina (4) e pirazinamida (8).

seguido-se posteriormente um tratamento durante quatro meses com isoniazida (3) e rifampicina (4).<sup>48</sup>

Os pacientes que seguem esse esquema tornam-se não infecciosos após as primeiras semanas, mas os meses restantes são cruciais para erradicar uma fração de crescimento

lento dos bacilos e também para dar tempo para a ação do sistema imunológico do hospedeiro alcançar a cura clínica.<sup>48</sup>

A seleção dos fármacos a usar, o tempo de tratamento e eventuais procedimentos dependem da idade, das comorbidades, da possível resistência aos fármacos, da forma de tuberculose (latente ou ativa) e da localização da infecção no organismo.

As estirpes de tuberculose (TB) resistentes aos medicamentos (TB-DR) são mais difíceis de tratar do que as estirpes sensíveis aos medicamentos.

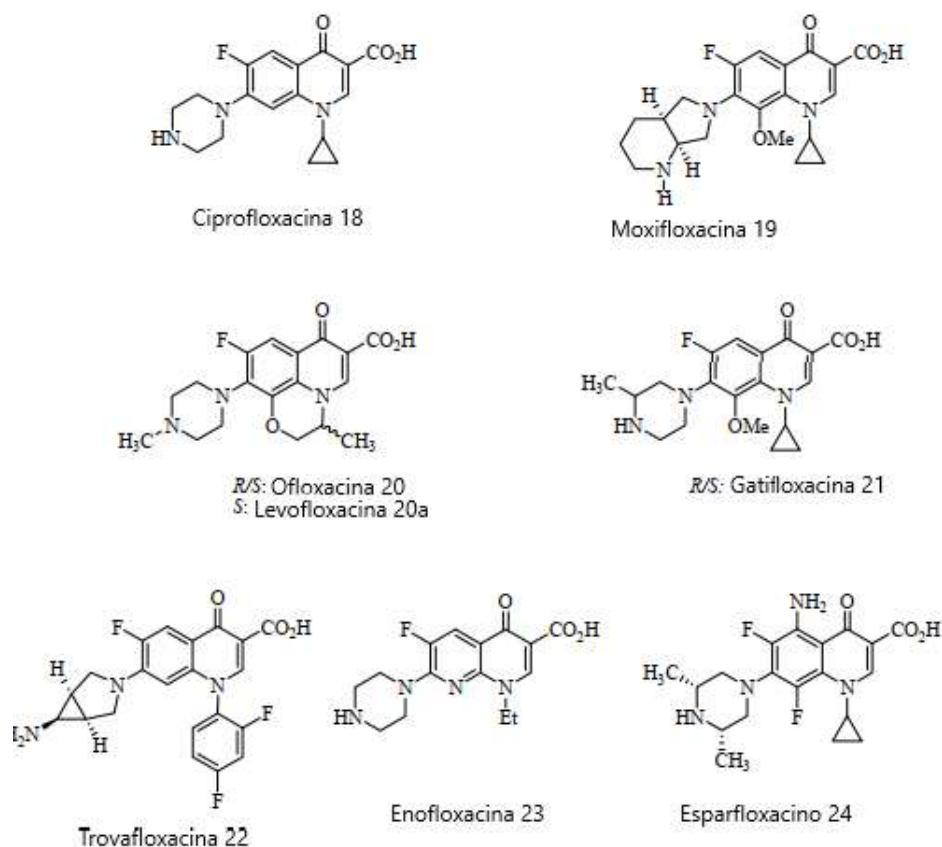
**Regime para tuberculose suscetível à rifampicina e resistente à isoniazida.** Em pacientes com tuberculose confirmada suscetível à rifampicina, resistente à isoniazida, o tratamento com rifampicina, etambutol, pirazinamida e levofloxacina é recomendado por um período de 6 meses.

**Regime mais curto contendo para TB-MR ou TB-RR.** Em pacientes com tuberculose multirresistente ou rifampicina (TBMR/RR) em regimes mais curtos como regimes padronizados com duração prevista de 9 a 12 meses, incluindo 4 a 6 meses de canamicina, moxifloxacina, protionamida, clofazimina, pirazinamida, etambutol e isoniazida em alta dose, seguidos por 5 a 8 meses de moxifloxacina, clofazimina, pirazinamida, etambutol e, opcionalmente, protionamida.

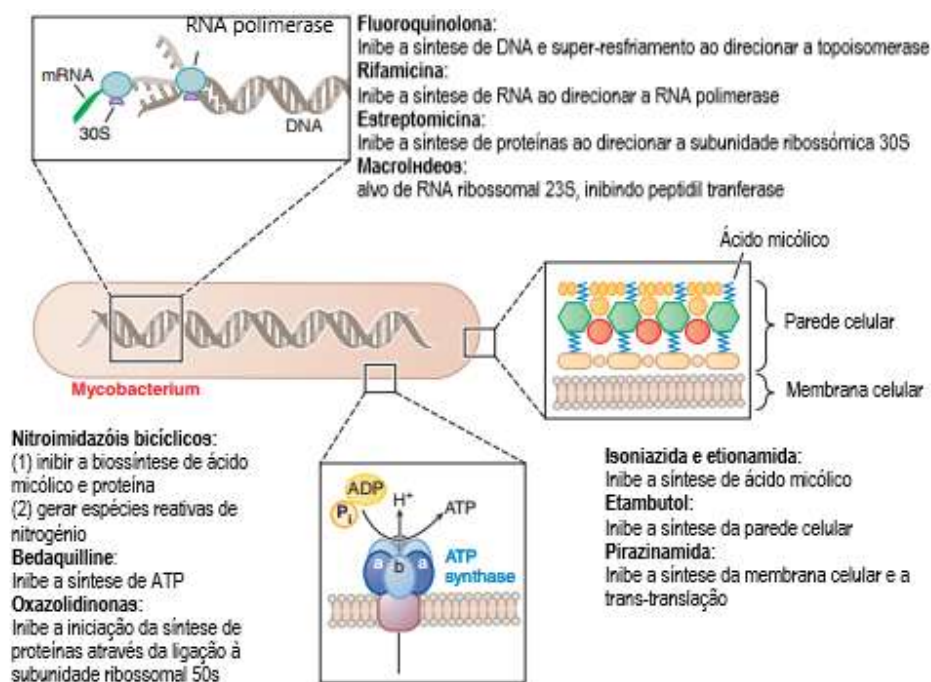
**Regimes mais longos para TB-MR ou TB-RR.** Em pacientes com tuberculose multirresistente ou rifampicina (TBMR/RR) em regimes mais longos como regimes individualizados que incluíam uma fluoroquinolona de última geração e um injetável de segunda linha entre pelo menos cinco medicamentos anti-TB. A duração total do tratamento é de 18 a 20 meses. Pode ser modificado dependendo da resposta do paciente à terapia.

Os medicamentos atuais para TB podem ser divididos em duas categorias: medicamentos bacteriostáticos e bactericidas. Os fármacos bacteriostáticos incluem EMB (7) e PAS (12), enquanto os fármacos bactericidas incluem INH (3), RIF (4), SM (1) e FQ (fluoroquinolonas) (Figura 7). No entanto, a distinção entre fármacos bacteriostáticos e bactericidas é apenas relativa, porque alguns fármacos bacteriostáticos podem ser bactericidas em algumas condições (como concentrações mais altas do fármaco, inóculo menor). Por exemplo, PZA (8) pode mostrar atividade bactericida contra um pequeno número de bacilos que não crescem em pH ácido, mas mostra principalmente atividade bacteriostática para bacilos em crescimento com

metabolismo ativo.<sup>48,49</sup> Os fármacos atuais para TB também podem ser classificados como fármacos de primeira ou de segunda linha. Os fármacos de primeira linha incluem INH (3), RIF (4), PZA (8) e EMB (7); os medicamentos de segunda linha incluem SM (1), canamicina (14), ampicilina (13), capreomicina (17), cicloserina (CS) (11), PAS (12), ETH (9) / PTH (10), tiacetazona (15) e FQ (Figura 7). De acordo com a sua especificidade, os medicamentos para TB também podem ser agrupados como medicamentos específicos para TB ou micobactérias, como INH (3), PZA (8), EMB (7), PAS (12), ETH (9) e tiacetazona (15), e os antibióticos de amplo espectro, como RIF (4), SM (1), canamicina (14), ampicilina (13), capreomicina (17), CS (11) e FQ (Figura 7). Pelo seu mecanismo de ação esses medicamentos podem ser agrupados como inibidores da síntese da parede celular, inibidores da síntese de ácido nucleico, inibidores da síntese de proteínas e inibidores da síntese do ATP (Figura 8).<sup>50</sup>



**Figura 7** Estrutura dos fármacos de segunda linha utilizados no tratamento da tuberculose (fluoroquinolonas).

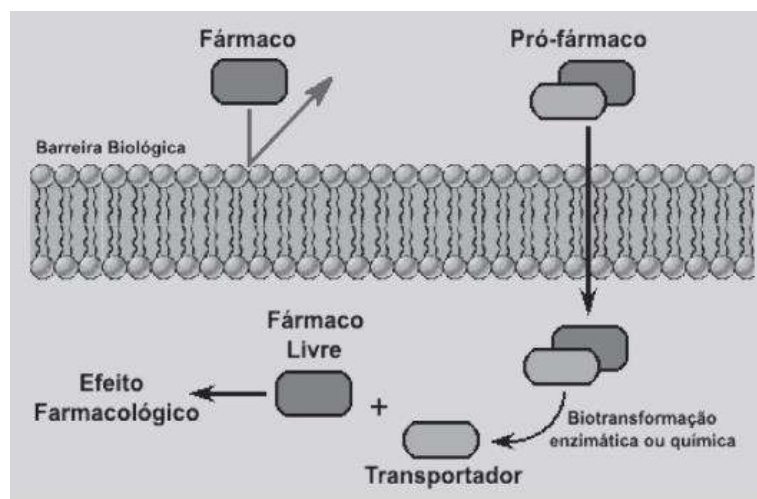


**Figura 8** Fármacos antituberculose agrupados de acordo com os mecanismos de ação possíveis. <sup>44</sup>

## 1.2 Pró-Fármacos

Para otimizar as propriedades físico-químicas de um fármaco, podem-se derivatizar certos grupos funcionais polares através de processos biorreversíveis com pequenas moléculas orgânicas, mascarando tais características sem alterar permanentemente as propriedades da molécula. Esta estratégia tem sido aplicada com sucesso a grupos funcionais tais como álcoois e ácidos fracos, que, convertidos em ésteres, podem ser regenerados *in vivo* por via química ou enzimática nos álcoois e ácidos fracos iniciais. Este processo é também denominado latenciação de fármacos.<sup>75</sup> O termo “latente” significa presente ou existente, mas não manifestado, exibido ou desenvolvido.<sup>74</sup>

Em 1958, Adrien Albert definiu pró-fármaco como qualquer composto que sofre biotransformação antes de manifestar os seus efeitos farmacológicos.<sup>75,76</sup> Outra definição mais alargada considera como pró-fármacos, derivados inativos, obtidos por transformação química do fármaco e que são convertidos por reação química, enzimática ou ambas no fármaco matriz no organismo, antes ou após alcançar o seu local de ação (Figura 9).<sup>59,74</sup> Para se conseguir um pró-fármaco ideal é importante garantir que o pró-fármaco seja efetivamente convertido no fármaco ativo depois de absorvido na corrente sanguínea, mas também é importante garantir que os grupos clivados da molécula não sejam tóxicos para o organismo.<sup>60,62</sup>



**Figura 9 Representação esquemática do conceito de pró-fármaco.<sup>74</sup>**

A indústria farmacêutica usa o desenvolvimento de pró-fármacos como estratégia para melhorar características desfavoráveis de algumas moléculas que possam impedir a aplicação das mesmas.<sup>69</sup> Essa característica de favoráveis podem ser farmacêuticas, farmacocinéticas ou farmacodinâmicas. Assim, propriedades farmacêuticas que podem ser melhoradas com esta estratégia são, por exemplo, estabilidade química insuficiente, baixa solubilidade, odor e sabor desagradável ou irritação e dor. As propriedades farmacocinéticas que podem ser melhoradas são, por exemplo, baixa absorção oral do fármaco, acentuada metabolização pré-sistêmica, curta duração de ação ou distribuição desfavorável no organismo. Por fim, as propriedades farmacodinâmicas que podem ser melhoradas, estão relacionadas com a toxicidade.<sup>66,67</sup> Desta forma, o desenho de pró-fármacos permite melhor a formulação, aumentar a solubilidade, a estabilidade química, a biodisponibilidade, a absorção, a distribuição e a seletividade para determinados órgãos/locais do organismo. Também pode permitir prolongar o tempo de ação, diminuir os efeitos secundários e melhorar a adesão à terapêutica por parte do doente.<sup>60,61,66,68</sup>

De acordo com a sua composição ou estratégia de ação os pró-fármacos podem ser classificados como clássicos, bioprecursores, mistos ou dirigidos.<sup>65</sup>

Clássicos:

São formados pelo fármaco e um transportador. Neste caso a molécula ativa está ligada a um grupo transportador que pode ser removido enzimaticamente, como, por exemplo, um éster que é hidrolisado ao fármaco ativo contendo um ácido carboxílico. A ligação ao grupo transportador deve ser suficientemente lábil de modo a permitir a libertação eficiente do fármaco *in vivo*, e o grupo transportador deve ser não tóxico e biologicamente inativo, ao mesmo tempo que altera as

propriedades físicas do fármaco ou permite a sua distribuição seletiva.<sup>67,70</sup> Este transportador pode, também, ter atividade biológica por si só, sendo nesse caso chamado pró-fármaco mútuo.<sup>71</sup>

#### Bioprecursor:

Os bioprecursores são compostos que são convertidos num novo composto através do metabolismo ou por métodos químicos sendo o novo composto o princípio ativo. Esse tipo de fármaco é naturalmente inativo, não apresentando, dessa forma, transportador. Um exemplo de ativação de bioprecursores através do metabolismo é o caso de fármacos que são ativados pelo sistema REDOX hepático.<sup>73</sup> A maioria dos compostos contendo o grupo nitro requer a redução enzimática para exercer a sua atividade biológica. (1.2.4.1) No entanto a ativação de pró-fármacos usando reações comuns do metabolismo (hidrólise, descarboxilação, oxidação, redução, entre outros) depende das enzimas presentes enquanto os métodos químicos não dependem de enzimas.<sup>66,72</sup>

#### Mistos:

São compostos pelo fármaco e um transportador, porém, após a quebra, o fármaco permanece inativo. Há necessidade, então, de outra reação para tornar esse fármaco ativo. Isto é, apresentam-se como moléculas biologicamente inativas, que necessitam de sofrer diversas reações químicas para se converterem na forma ativa, aumentando a concentração do fármaco ativo num local de ação específico.<sup>74</sup>

#### Dirigidos:

Apresentam um transportador com a função de transportar seletivamente o fármaco até um sítio de ligação específico para reduzir, assim, a ação inespecífica de alguns fármacos. Esse transportador deve ser específico para determinados recetores ou enzimas existentes apenas no local de ação do fármaco.<sup>74</sup>

Curiosamente, entre os agentes de primeira e segunda linha disponíveis atualmente para tratamento da tuberculose a, INH (3), PZA (8) e etionamida (9) (ETH) são pró-fármacos que exercem o seu efeito por meio da ativação metabólica micobacteriana.<sup>80</sup> PZA (8) entra nos bacilos por difusão passiva e convertida na sua forma ativa, ácido pirazinóico (POA), pela pirazinamidase (PZase)/nicotinamidase (Figura 10).<sup>52,81,82</sup> O INH (3) é ativado pela catalase/peroxidase (KatG), gerando um radical isonicotinoílo, que então se liga ao NADH,<sup>83</sup> dando origem a um aduto INH-NADH, que é um potente inibidor de InhA (Figura 11).<sup>78</sup> ETH (9) é estruturalmente semelhante à INH (3), e S-oxigenação da porção ETH tioureia está envolvida na bioativação de um metabólito hepatotóxico conhecido por reter atividade total contra TB.<sup>80,84,85</sup> A conversão de ETA (9) mediada por monooxigenase (EthA) resulta na formação do sulfóxido correspondente (Figura 12).<sup>78</sup> Além

da etionamida (9), vários outros pró-fármacos de tioamida e provavelmente a tiacetazona (TAZ) são ativados pela EthA.<sup>54,55</sup>

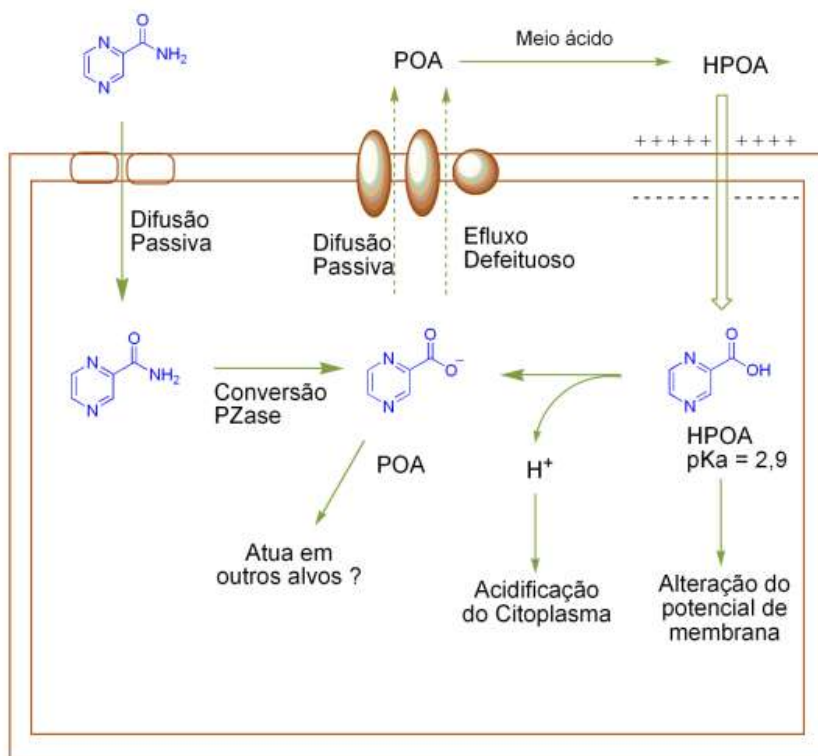


Figura 10 Mecanismo de ação da PZA (8).

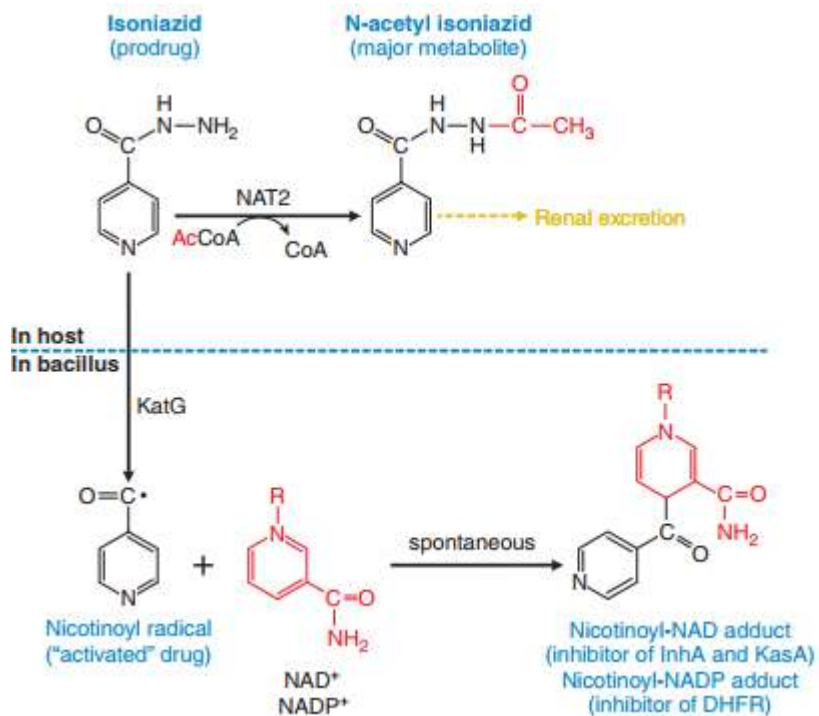
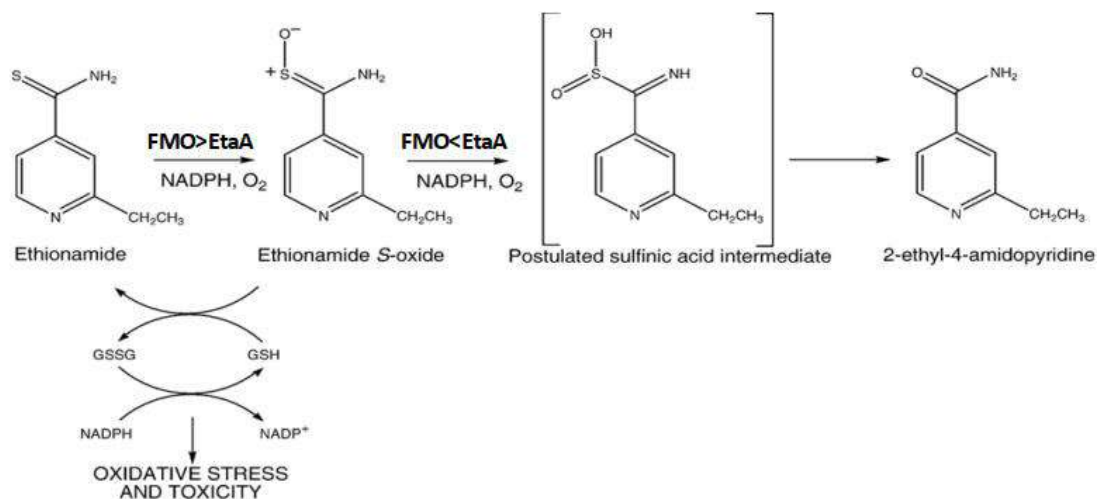


Figura 11 Metabolismo e ativação da isoniazida (3).<sup>44</sup>



**Figura 12 Mecanismo de ação da etionamida (9).**

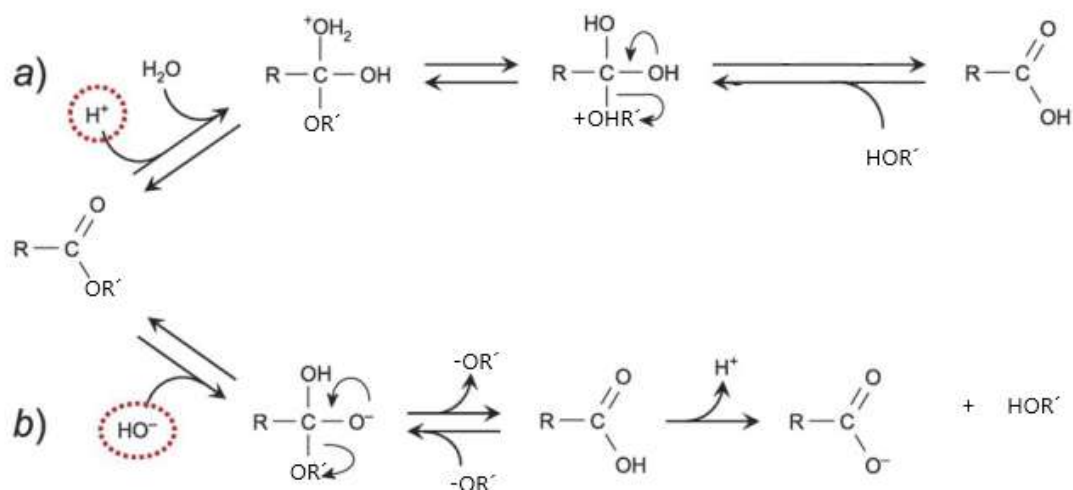
O principal problema relacionado com o uso de pró-fármacos bioativados por micobactérias é o surgimento de estirpes resistentes devido a mutações no gene que codifica o ativador. É o caso do INH (3) e do ETH (9).<sup>84</sup> Os principais mecanismos de resistência a esses dois fármacos são mutações nos genes *katG* e *ethA*, que impedem a formação dos aductos INH-NAD ou ETH-NAD. Por exemplo, a mutação *KatG* (S315T) é encontrada em cerca de 94% dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH (3).<sup>84</sup> Esse problema ainda não foi resolvido, apesar de a INH (3) ser atualmente o antituberculoso mais utilizado.<sup>77</sup>

### 1.2.1 Hidrólise

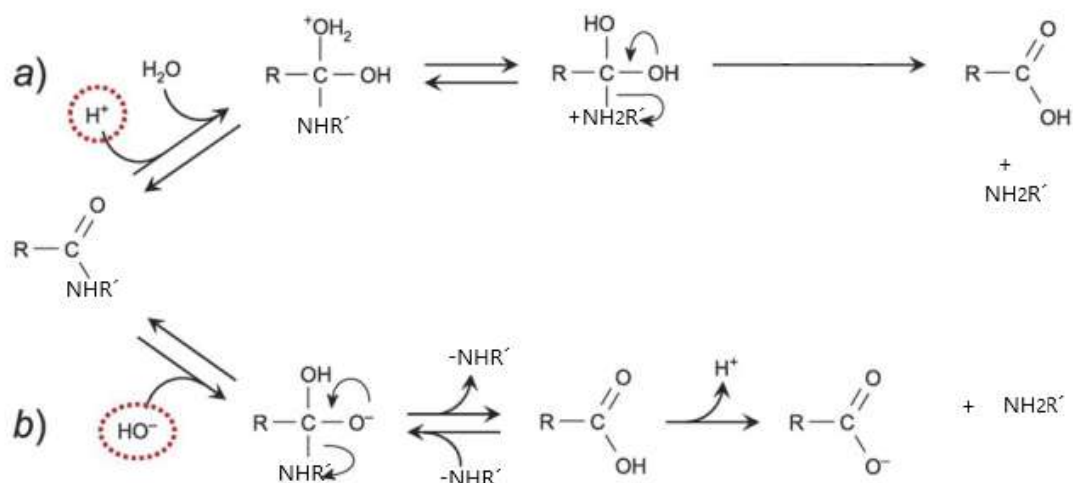
A reação de hidrólise refere-se à quebra de ligações químicas por adição de uma molécula de água. Os pró-fármacos sintetizados como ésteres e/ou amidas podem ser ativados por hidrólise enzimática ou por hidrólise química.

#### 1.2.1.1 Hidrólise Química

A hidrólise química de derivados carboxílicos pode ser catalisada por um ácido ou uma base, sendo o mecanismo de adição - eliminação por meio de um intermediário tetraédrico. Um esquema geral de hidrólise de ésteres apresentado aqui na Figura 13 e amidas na Figura 14.<sup>112</sup>



**Figura 13** Esquema de hidrólise química de ésteres: (a) catálise ácida (b) catálise básica.<sup>111</sup>



**Figura 14** Esquema de hidrólise química de amidas: (a) catálise ácida (b) catálise básica.<sup>111</sup>

Na hidrólise catalisada por  $H^+$  (catálise ácida específica) (Figura 14a), a protonação do átomo oxigênio do carbonilo leva a formação um de um intermediário tetraédrico em que o carbono é mais eletrofílico facilitando a adição do nucleófilo, isto é, uma molécula de  $H_2O$ . A hidrólise catalisada por ácido de ésteres é reversível porque o álcool ou fenol é nucleofílico.<sup>64,114</sup>

Na hidrólise catalisada por hidróxido (hidrólise catalisada por base específica) (Figura 14b), o intermediário tetraédrico é formado pela adição de um ião  $HO^-$  nucleofílico. Em seguida, o intermediário desloca o par de elétrons do ião alcóxido, formando o ácido carboxílico com a saída do grupo abandonante. Depois, a

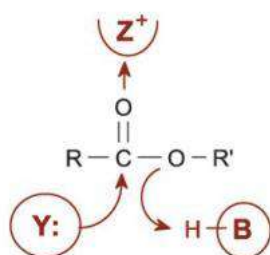
transferência de um próton leva aos produtos da reação. Esta reação é irreversível para ésteres, visto que o íon carboxilato formado é desprotonado em soluções básicas e, portanto, não pode adicionar o álcool nucleofílico ou fenol.<sup>111,115</sup>

A reatividade do éster em relação a um nucleófilo particular depende de 1) da capacidade relativa de doação ou eliminação de elétrons dos substituintes no grupo carbonilo devido ao efeito indutivo, e 2) da capacidade relativa da porção -OR para atuar como um grupo abandonante. Assim, substituintes eletronegativos aceleram a hidrólise.<sup>64</sup>

### 1.2.1.2 Hidrólise Enzimática

Uma hidrólise enzimática consiste numa reação química catalisada por uma enzima (uma hidrólase) que utiliza água (H<sub>2</sub>O) para quebrar uma molécula em duas outras moléculas. A hidrólise enzimática de derivados de ácido carboxílico é muito mais eficaz que a hidrólise química, uma vez que ocorre um decréscimo da energia de Gibbs, o que permite que a barreira de energia no estado de transição seja ultrapassada.<sup>64</sup>

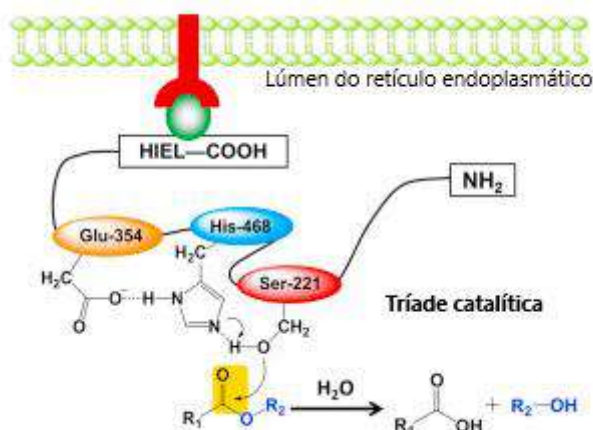
As hidrólases incluem as seguintes três características catalíticas no sítio ativo que aceleram enormemente a taxa de hidrólise. Primeiro, cada um contém um componente eletrofílico, que aumenta a polarização do grupo carbonilo no substrato (Z<sup>+</sup> na Figura 15). Em segundo lugar, cada um tem um nucleófilo (Y: na Figura 15) para atacar o átomo C do carbonilo, levando à formação de um intermediário tetraédrico. E, finalmente, cada um tem um doador de prótons (H – B na Figura 15) para transformar a porção –OR num grupo de saída melhor.<sup>111,116</sup>



**Figura 15 Grupos catalíticos comuns de hidrólases envolvidos na hidrólise da ligação éster.**

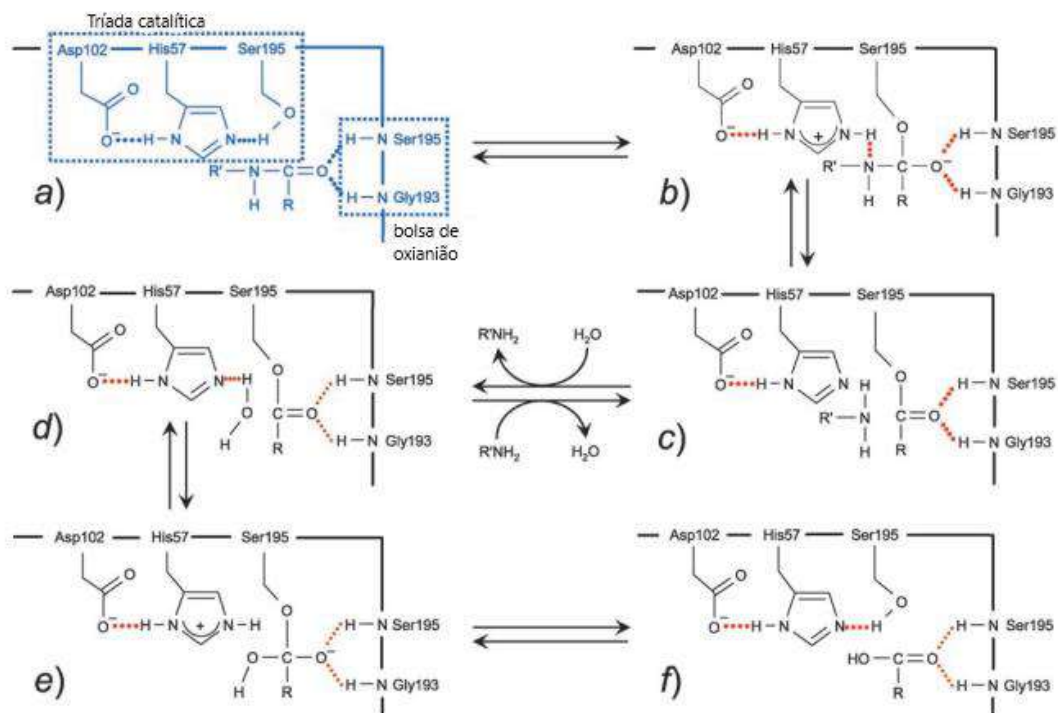
**Z + = componente eletrofílico polarizando o grupo carbonilo; Y: = grupo nucleofílico atacando o átomo C da carbonilo; H – B = doador de prótons transformando a porção –OR num grupo de saída melhor.<sup>64</sup>**

Essas três funcionalidades catalíticas são semelhantes em todas as enzimas hidrolíticas, mas os grupos funcionais reais que as realizarão diferem entre as hidrólases.<sup>111</sup>



**Figura 16** Esquema simplificada para a hidrólise de ésteres com o exemplo da carboxilesterase1 (3.1.1.1) como um protótipo.<sup>117</sup>

As hidrólases na sua forma clássica catalisam a conversão de um éster/amida num ácido carboxílico e um álcool/amina por uma reação de hidrólise, utilizando uma tríade catalítica de uma serina nucleofílica, histidina de base geral e ativando o resíduo ácido (Glu (Figura 16) ou Asp (Figura 17)).<sup>86</sup> O mecanismo catalítico das serina hidrólases é semelhante ao das treonina hidrólases e cisteína hidrólases. Todas as serina hidrólases possuem uma tríade catalítica (Ser-Asp-His ou Ser-Glu-His; ver Figura 16 e Figura 17), e uma chamado bolsa de oxianião (Z<sup>+</sup> na Figura 15) formado por grupos NH da estrutura principal.<sup>118</sup>



**Figura 17** Esquema detalhada para a hidrólise de amidas pela serina hidrolases com o exemplo da quimiotripsina peptidase (EC 3.4.21.1) como um protótipo.<sup>111</sup>

O ciclo catalítico começa com a formação de um complexo de Michaelis não covalente entre a enzima e o substrato (Figura 17 Etapa a.), seguido de ataque nucleofílico ao substrato carbonil C-átomo pelo grupo -OH da serina catalítica (Ser195 na Figura 16; Y: na Figura 15) forma um intermediário tetraédrico covalente (Figura 17 Etapa b). A transferência do átomo H de hidróxi Ser195 para um átomo N de imidazol de His57 é essencial. Esta transferência é facilitada pelo Asp102, o grupo carboxilato orienta adequadamente His57, garante a sua forma tautomérica apropriada e estabiliza a forma carregada positivamente de His57 no estado de transição. Os grupos NH de cadeia principal de Gly193 e Ser195 (a bolsa de oxianião) polarizam o grupo carbonilo, facilitando ainda mais o ataque nucleofílico e, em seguida, estabilizando o oxianião resultante. Na etapa C (Figura 17), o átomo H imidazólico (H-B na Figura 15) é transferido para o átomo N da ligação amida, que é então clivada, formando um intermediário acil-enzima. A desacilação, a próxima etapa nesta sequência (Figura 17 Etapa d), ocorre quando uma molécula de H<sub>2</sub>O entra na reação e substitui o componente amina. Assim, o imidazol ativa a molécula de H<sub>2</sub>O por catálise básica geral levando a outro intermediário tetraédrico (Figura 17 Etapa e). Este intermediário tetraédrico se decompõe por sua vez e liberta o ácido carboxílico e a enzima livre (Figura 17 Etapa f).<sup>64</sup>

## 1.2.2 Ésteres como pró-fármacos

A derivatização sob a forma de pró-fármacos de ésteres é uma ferramenta comum para superar as desvantagens tipicamente associadas à formulação e distribuição de fármacos, fornecendo uma estratégia clássica para mascarar as funcionalidades polares do álcool e do ácido carboxílico e melhorar a permeabilidade celular.<sup>61,108</sup> Quando a ligação éster do pró-fármaco é clivada, o fármaco ativo é liberto. Conforme mostrado na Figura 18, a clivagem da ligação éster ocorre normalmente por hidrólise (Figura 18, via A) ou oxidação (Figura 18, via B). Tradicionalmente, os ésteres foram projetados para serem ativados por esterases humanas ubíquitas; no entanto, com uma compreensão mais profunda da especificidade do substrato, essas funcionalidades podem agora ser ajustadas para os direcionar para esterases humanas específicas ou para mudar a localização da ativação dos pró-fármacos.<sup>108-110</sup> As esterases mais importantes incluem carboxilesterase, acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, paraoxonase e arilesterase (Tabela 2). A clivagem por oxidação de pró-fármacos à base de éster é catalisada pelo citocromo P450s.<sup>63</sup>

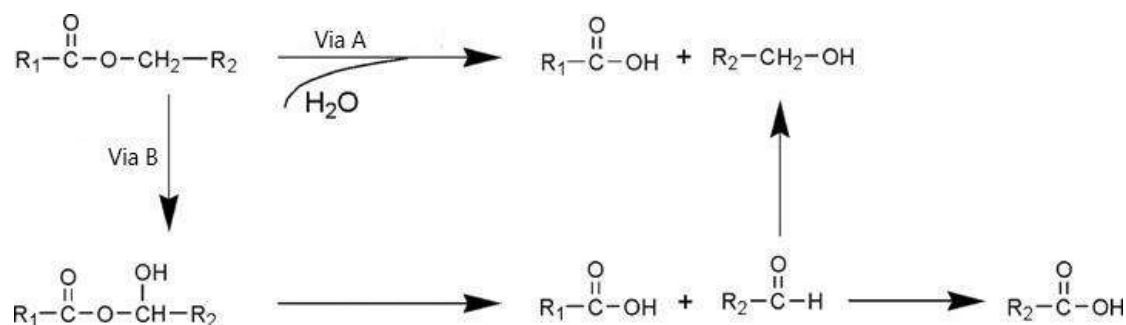


Figura 18 Vias para clivagem de ligação de éster.<sup>63</sup>

Via A: Esterases ou proteínas com atividade esterase. Via B: Citocromo P450s

Tabela 2 Principais enzimas envolvidas na bioconversão de pró-fármacos à base de éster.

| Tipo                        | Número EC | Localização   | Referências  |
|-----------------------------|-----------|---|--------------|
| <b>Enzimas hidrolíticas</b> |           |   |              |
| Esterases A                 |           |   |              |
| Paraoxonase                 | 3.1.8.1   | Plasma, fígado, cérebro, rim, pulmão  | 91,92        |
| Esterases B                 |           |   |              |
| Carboxilesterase            | 3.1.1.1   | Sangue, fígado, cérebro, rim, pulmão, músculo, intestino, estômago, pele, coração, mama, ovário, colo do útero, testículo, bexiga, saliva, pâncreas, tireóide, tecido nasal / respiratório / adiposo, placenta, timo, tumor | 93,94,95     |
| Acetilcolinesterase         | 3.1.1.7   | Plasma, fígado, cérebro, músculo, nervo, rim, intestino, retina, placenta timo  | 96,97,98,99  |
| Colinesterase               | 3.1.1.8   | Plasma, fígado, cérebro, músculo, rim, intestino, retina, placenta  | 97,98,99,100 |

| Tipo                        | Número EC | Localização   | Referências     |
|-----------------------------|-----------|---|-----------------|
| <b>Enzimas hidrolíticas</b> |           |   |                 |
| <b>Enzimas oxidativas</b>   |           |   |                 |
| Citocromo P450s             |           | Fígado, cérebro, rim, pulmão, intestino, adrenal, testículo, pele, baço, placenta, mucosa olfatória, tecido ocular, tumor | 101,102,103,104 |

Uma vez que as esterases, se encontram amplamente distribuídas por todo o corpo, a ligação éster é bastante instável *in vivo*.<sup>63</sup> Os pró-fármacos à base de éster aumentam a biodisponibilidade oral da terapêutica da TB em estudos pré-clínicos e potencialmente oferecem benefícios adicionais relativamente a outras estratégias possíveis de derivatização.<sup>79</sup>

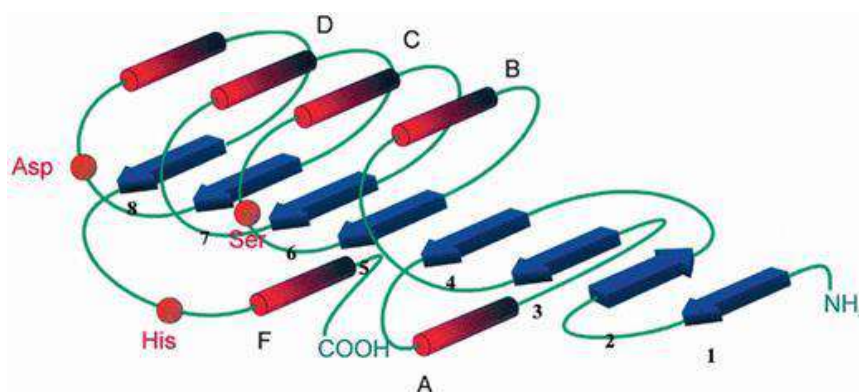
Uma desvantagem dos pró-fármacos éster é a suposição de que as hidrólases humanas não específicas removerão quaisquer grupos de proteção do tipo éster antes da internalização celular, retirando assim a seletividade terapêutica adicional dada pelo pró-fármaco. Existem, no entanto, exemplos de sondas moleculares, derivatizadas sob a forma de ésteres, que se mostraram resistentes à ativação por uma ampla gama de hidrólases de mamíferos, mostrando deste modo que é possível seleccionar determinados grupos de éster ortogonais<sup>4,87</sup>. Além de alterações nas propriedades físico-químicas, os pró-fármacos de éster podem ser desenhados para serem ativados especificamente pela esterases microbianas. Estes pró-fármacos do éster direccionados são capazes de atravessar a parede das células bacterianas e veicular o composto intracelularmente. No interior da célula bacteriana o pró-fármaco é hidrolisado à forma ativa por esterases bacterianas intracelulares. Frequentemente estes pró-fármacos demonstram melhorias significativas na atividade biológica quando comparados com o composto não modificado.<sup>86</sup> O *M. tuberculosis* contém um número significativo de hidrólases de serina (186 que correspondem aproximadamente a 4% do proteossoma)<sup>88</sup> enquanto que nas bactérias comuns ou mesmo nos humanos o seu número corresponde apenas a cerca ~1% do proteossoma.<sup>89,90</sup>

A taxa de bioconversão dos ésteres pode ser difícil de prever e por consequência os, efeitos farmacológicos ou toxicológicos dos pró-fármacos também. Este facto pode ser um problema, sobretudo quando se usam taxas de bioconversão obtidas em animais de experiência para prever a bioconversão em humanos. As diferenças entre espécies estão relacionadas com a existência de diferentes tipos de esterases interespecies e diferenças nas respectivas especificidades de substrato.<sup>105</sup> Mesmo dentro da mesma espécie, a taxa de hidrólise nem sempre é previsível devido à variabilidade entre indivíduos. Além disso, a bioconversão pode ser afetada por outros fatores, como idade, sexo e doença.<sup>100,106,107</sup>

<sup>4</sup> grupos ortogonais - grupos protetores que exibem sensibilidade a um subtipo de enzimas e estabilidade a outro subtipo, o que determina a seletividade da ação dos pró-fármacos.

### 1.2.2.1 Enzimas envolvidas na hidrólise de ésteres.

Hidrólases de éster carboxílico (CEHs) catalisam a hidrólise de ligações éster nos respectivos álcoois e ácidos carboxílicos e são onipresentes ao longo da vida. Muitos CEHs têm dobras  $\alpha/\beta$  hidrólase padrão, que são compostas por três camadas  $\alpha/\beta/\alpha$ , com a segunda folha  $\beta$  sendo antiparalela a geralmente sete outras nas folhas  $\beta$  (Figura 19). Os membros deste grupo de enzimas que hidrolisam diferentes substratos e formam produtos diferentes têm nomes diferentes tais como: Carboxilesterases (EC 3.1.1.1), lípases de triacilglicerol (EC 3.1.1.3), fosfolípases A2s (EC 3.1.1.4), lisofosfolípases (EC 3.1.1.5), acetilcolinesterases (EC 3.1.1.7), butirilcolinesterases (EC 3.1.1.8), aminoacil - tRNA hidrólases (EC 3.1.1.29) e cocaína esterases (EC 3.1.1.84).<sup>113</sup>



**Figura 19** Apresentação esquemática da  $\alpha/\beta$ -hidrólase. Folhas  $\beta$  (1–8) são mostradas como setas azuis, hélices  $\alpha$  (A – F) como colunas vermelhas.<sup>113</sup>

As esterases usualmente catalisam a conversão de um éster num ácido carboxílico e num álcool através de uma reação de hidrólise, utilizando uma tríade catalítica constituída por uma serina (nucleófilo), ativada pela histidina (base) que por sua vez é ativada pelo resíduo ácido de ácido aspártico (Figura 20).<sup>86</sup> No entanto, esta generalização da atividade da esterase esconde a diversidade e complexidade desta superfamília de enzimas, com membros capazes de catalisar seletivamente a hidrólise de diversas ligações químicas, incluindo ésteres, tioésteres, fosfoésteres, amidas e epóxidos.<sup>130-133</sup> As esterases microbianas também possuem a capacidade de hidrolisar ésteres, tioésteres e fosfoésteres.<sup>86,134,135</sup> Os resíduos catalíticos também variam, desde tríades de Ser-His-Asp e Ser-Ser-Lys até diades catalíticas de Ser-Lys, Ser-His e Ser-Asp.<sup>90,136,137</sup>

**Carboxilesterase.** Carboxilesterases (CEs, EC 3.1.1.1) são membros da superfamília das  $\alpha/\beta$  hidrólases de serina e podem hidrolisar com eficiência uma variedade de xenobióticos contendo éster, amida e carbamato nos seus respectivos ácidos livres.<sup>109</sup> Embora as carboxilesterases mostrem atividade e especificidade de substrato variáveis, dependendo da espécie e da localização, elas estão presentes praticamente em todo o corpo, incluindo intestinos, sangue, cérebro, pele e tumor. Existem várias isoenzimas diferentes de carboxilesterases; com base na homologia de sequência e semelhança de características, as isoenzimas foram classificadas em cinco subfamílias, CES1, CES2, CES3,

CES4 e CES5.<sup>120</sup> As carboxilesterases estão envolvidas na ativação de vários pró-fármacos antivirais, anticancerígenos e antibióticos<sup>124</sup>

A CES1 existe abundantemente no fígado e adipócitos, com menor quantidade no rim, monócitos, pulmão, intestino, testículo, coração e macrófagos.<sup>125</sup> A nível intracelular está presente no retículo endoplasmático, citosol e lisossomas.<sup>64,126</sup> Por outro lado, a CES2 é expressa principalmente no intestino delgado e cólon, mas também nos rins, fígado, coração, cérebro e testículo. CES3 localizado na membrana nuclear e retículo endoplasmático, CES4 localizado no citosol e CES5 secretado no sistema reprodutor masculino.<sup>125</sup>

Deste grupo de hidrólases destacam-se também as lipases (EC 3.1.1.3),<sup>64</sup> enzimas que hidrolisam ésteres de cadeia longa, como acilgliceróis constituintes dos triglicéridos e originam ácidos gordos de cadeia longa, que são tipicamente insolúveis ou pouco solúveis em meio fisiológico.<sup>117,125,127-129</sup>

**Acetilcolinesterase.** A acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) pode hidrolisar rapidamente o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas e nas junções neuromusculares. A AChE é uma enzima localizada na membrana externa das células no sítio da sinapse. É responsável pela metabolização da ACh libertada na transmissão pré-sináptica em resposta a um potencial de ação e é fundamental para a manutenção da função colinérgica normal.<sup>63,121</sup>

A AChE é amplamente expressa em muitos tecidos do corpo incluindo músculo esquelético, muitos tipos de neurónios nos sistemas nervosos central e periférico e vários outros tipos de células que são enervadas pelo sistema colinérgico, como glândulas endócrinas e exócrinas, células musculares lisas e cardíacas e órgãos sensoriais inseridos em epitélios. Em humanos, a AChE também é expressa em outro tipo de células, como eritrócitos e linfócitos.<sup>96</sup>

**Butirilcolinesterase.** A butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) é relativamente abundante no plasma e às vezes é chamada colinesterase sérica. No entanto, o seu papel fisiológico permanece obscuro. A BChE pode degradar um grande número de compostos contendo éster, incluindo pró-fármacos de éster.<sup>122</sup> A estrutura geral 3-D da BChE é muito semelhante à das AChEs. No entanto, a BChE não forma o mesmo tipo de dímero observado em estruturas de AChE de *Torpedo californica*, murganho e humanos.<sup>63,122</sup> A BChE tem uma especificidade de substrato mais ampla do que AChE, e essa diferença na especificidade pode ser explicada pelo facto da BChE ter uma bolsa de ligação do grupo acilo maior, para além de diferenças nos resíduos de aminoácidos. A BChE existe predominantemente no plasma, bem como em vários tecidos, como cérebro, músculo, rim, intestino, retina e placenta.<sup>122</sup>

**Paraoxonase.** Paraoxonase (PON, EC 3.1.8.1) é uma família de hidrólases que inclui PON1, PON2 e PON3. PON1 é uma esterase importante que pode catalisar a hidrólise de várias organofosforados. PON2 e PON3 compartilham ~60% de identidade de sequência com PON1, mas têm atividades de arilesterase muito limitadas. Por outro lado, PON2 e PON3 exibem alta atividade

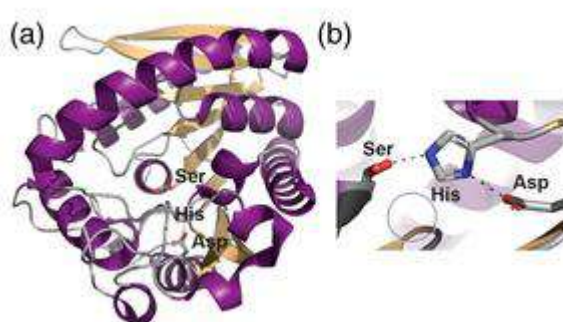
da lactonase. A PON1 humana é sintetizada no fígado e libertada na corrente sanguínea, enquanto a PON3 é expressa, predominantemente no fígado e em níveis baixos no rim.<sup>91</sup> Nos últimos anos, foi demonstrado que PON1 e a suas duas isoenzimas Q e R conhecidas possuem atividades arilesterase e organofosfatase, e desempenham papéis importantes no metabolismo de fármacos e na prevenção da aterosclerose.<sup>123</sup>

**CIP 450.** Além de hidrólise enzimática a ligação éster do pró-fármaco pode ser clivada por oxidação catalisada pelo citocromo P450. As enzimas do citocromo P450 (CYPs) são os grupos enzimáticos da fase I mais importantes e responsáveis pela biotransformação, ou seja, a oxidação clássica de muitos xenobióticos como ésteres. Caracteristicamente, os ésteres do ácido carboxílico originam um aldeído e um ácido ao invés de um álcool e um ácido. (Figura 18: Via B) As CYPs estão presentes praticamente em todo o corpo, incluindo nas células tumorais.<sup>63</sup>

### 1.2.2.1.1 Esterases *M. tuberculosis*

Com mais de 40 esterases identificadas por análise computacional, as esterases de *M. tuberculosis* exemplificam a diversidade de esterases microbianas e os seus diversos papéis biológicos.<sup>86,88</sup> O aumento da atividade das esterases em *M. tuberculosis* em comparação com humanos ou outras bactérias está provavelmente associada às suas diversas vias metabólicas, à sua aptidão de metabolizar os lípidos da célula hospedeira para obter energia e à capacidade única de transitar entre os estados de crescimento ativo e latente.<sup>88,138</sup>

A maioria dessas 40 esterases identificadas pertencem à família de proteínas  $\alpha/\beta$ -hidrólases tradicionais, com uma dobra estrutural composta por oito folhas  $\beta$  formando uma folha  $\beta$  canhota, superelicamente torcida rodeada por hélices  $\alpha$  (Figura 20).<sup>86,88,138,139</sup>

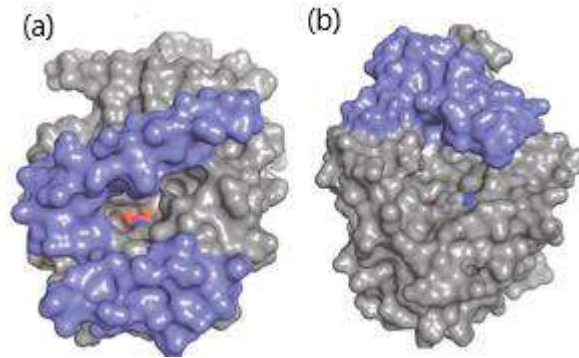


**Figura 20** Estrutura e função da esterase bacteriana.

(a) Estrutura clássica da  $\alpha/\beta$ -hidrólase presente em muitas esterases bacterianas no exemplo de LipS. (b) Close-up da tríade catalítica de LipS.<sup>86</sup>

Apenas um número limitado de estruturas tridimensionais de esterases micobacterianas foi determinado, mas todas elas possuem esta dobra de proteína  $\alpha/\beta$ -hidrólase clássica.<sup>140-142</sup> Exemplos destas estruturas tridimensionais são as estruturas de LipW e Rv0045c, duas hidrólases metabólicas de *M.tuberculosis* (Figura 21). Cada uma dessas enzimas mostra dobras estruturais de  $\alpha/\beta$ -hidrólase

sobrepostas, mas os domínios *cap/lid* e bolsas de ligação de substrato são diferentes o que lhes confere especificidade para o substrato.<sup>86,140,143</sup>



**Figura 21 Estrutura e função da esterase bacteriana.**

**Duas esterases *M. tuberculosis* com especificidade de substrato variável e estruturas de bolso de ligação. (a) LipW; (b) Rv0045c.<sup>141,143</sup>**

Uma classe de esterases de *M. tuberculosis* com um papel importante na virulência de *M. tuberculosis* são as esterases contendo domínios de prolina-glutamato (PE) e prolina-prolina-glutamato (PPE).<sup>86,144</sup> A família de domínios PE e PPE é uma família de proteínas específicas de micobactérias que é nomeada com base nos seus motivos N-terminais de PE ou PPE. A família de domínios PE e PPE está presente em espécies de micobactérias patogénicas, com 167 proteínas de domínio PE/PPE identificadas no *M. tuberculosis* de crescimento lento, mas apenas dois membros no organismo micobacteriano não patogénico de crescimento rápido, *M. smegmatis*.<sup>86,144</sup> As proteínas de domínio PE e PPE estão associadas à antigenicidade, regulação imunológica e virulência de *M. tuberculosis*.<sup>145</sup> Dentro da família de domínio PE e PPE, oito membros da família foram identificados computacionalmente como contendo uma dobra de proteína  $\alpha/\beta$ -hidrolase.<sup>86,146</sup> Estes membros da família foram confirmados como esterases contendo uma tríade catalítica clássica.<sup>86,147-149</sup> O mais bem estudado desta família - PE11 (Rv1169c ou LipX) - desempenha um papel no crescimento do biofilme, cria uma resposta imunogénica e afeta os níveis de lípidos relacionados com a virulência.<sup>147,150</sup> Curiosamente, o efeito no crescimento do biofilme varia com base na expressão de PE11 em *M. tuberculosis* ou *M. smegmatis*.<sup>86,150</sup> Como a maioria dos membros da família do domínio PE e PPE estão ligados à membrana ou libertados nas vesículas da membrana externa, estas esterases de domínio PE-PPE podem ser usadas como ativadores de pró-fármacos éster e estão a ser exploradas com este objetivo.<sup>86</sup>

Outra classe de esterases *M. tuberculosis* que são alvos antibacterianos confirmados e estão localizadas extracelularmente são as esterases que hidrolisam lípidos endógenos do hospedeiro, especialmente aqueles que constituem fontes de nutrientes essenciais para *M. tuberculosis* como o triacilglicerol (TAG).<sup>139,151,152</sup> O TAG é uma boa fonte de energia quer para o *M. tuberculosis* latente, quer para a reativação do *M. tuberculosis*, tornando as enzimas envolvidas nestas reações alvos

promissores sobretudo nos casos de infecção por TB latente.<sup>153</sup> A primeira TAG esterase identificada foi a LipY (Rv3097c).<sup>86,151</sup> A LipY contém um domínio PE que modula a sua atividade e direciona LipY para secreção pela via ESX-5.<sup>154-156</sup> A deleção de LipY interfere na degradação dos lípidos armazenados intracelularmente e na restauração do crescimento dos bacilos latentes.<sup>86,156</sup> A LipY também está envolvida na resposta imune ao *M. tuberculosis*, já que a sobreexpressão de LipY levou a uma resposta imune mais forte e diminuiu a eficácia da vacina *M. bovis* BCG.<sup>157,158</sup> A LipY pode ser uma enzima adequada para a hidrólise de pró-fármacos ésteres porque apesar de ter uma grande especificidade de substrato, também tem as relações estrutura-atividade bem definidas.<sup>86,152,159,160</sup> Recentemente, a Msh1 (hidrólase secretada por micobactérias) foi identificada como uma segunda esterase hidrolisante de TAG, específica para a hidrólise de lípidos do hospedeiro.<sup>161</sup> Por ter como alvo os lípidos do hospedeiro, catalisa a hidrólise dos ésteres fora do *M. tuberculosis* e regulada positivamente durante as condições de hipoxia, daí que a Msh1 também possa representar um novo alvo.<sup>86,161</sup>

### 1.2.3 Amidas como pró-fármacos

A função amida é menos reativa quimicamente em condições fisiológicas que a função éster, além disso, excetuando o caso das proteínas geralmente as amidas são menos suscetíveis a hidrólise enzimática que os ésteres correspondentes. Por essa razão esta abordagem pode ser usada não só para aumentar a estabilidade de pró-fármacos, mas também para conseguir obter uma distribuição direcionada e alterar a lipofilia dos compostos.<sup>278</sup> Os fármacos com ácido carboxílico ou grupo amina podem ser convertidas em pró-fármacos de amida. Esta estratégia geralmente tem uma utilidade limitada devido à alta estabilidade *in vivo*.<sup>267</sup>

Os pró-fármacos de amida podem ser convertidos nos fármacos originais por amidases não específicas ou por ativação enzimática específica, como, por exemplo, através da  $\gamma$  - glutamil transpeptidase renal.<sup>267</sup>

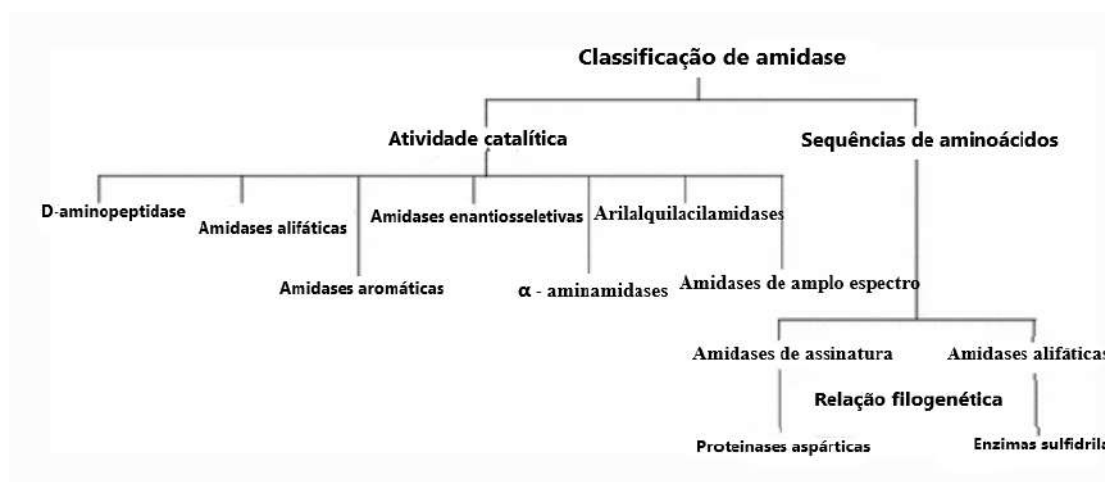
#### 1.2.3.1 Enzimas envolvidas na hidrólise de amidas.

As amidases, catalisam a clivagem hidrolítica da ligação entre o carbonilo e o nitrogénio em amidas. Estão presentes nos tecidos de animais e plantas, em microrganismos e estão envolvidas no metabolismo do azoto. As amidases incluem: a urease, arginase, asparaginase, hipurase, e purinadeamidases.<sup>279</sup>

As amidases (EC 3.5.1.4) podem ser divididas em dois tipos. O primeiro tipo inclui amidases alifáticas que hidrolisam apenas amidas alifáticas de cadeia curta e o segundo tipo inclui amidases que hidrolisam amidas alifáticas de cadeia média, algumas arilamidas,  $\alpha$ -aminoamidas e  $\alpha$ -hidroxiamidas.<sup>270</sup>

Muitas das amidases atualmente conhecidas foram encontradas e descritas em bactérias de muitos gêneros: *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Blastobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Helicobacter*, *Lactobacillus* e *Methylophilus*.<sup>270</sup>

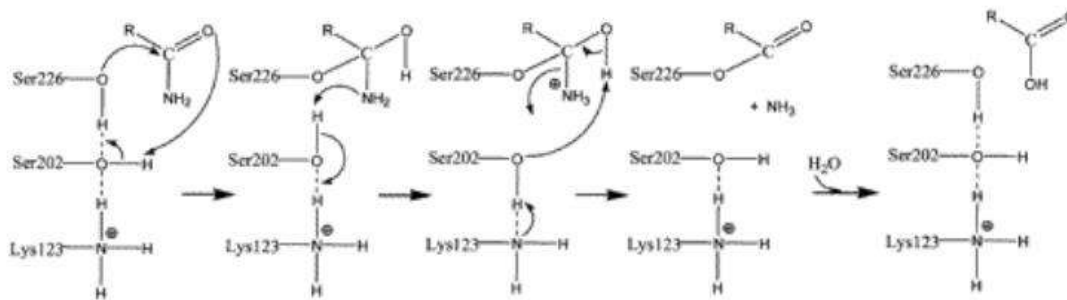
As amidases também podem se classificadas com base na atividade catalítica, na sequência de aminoácidos e relação filogenética.<sup>270-273</sup> A classificação com base na atividade catalítica leva em consideração o perfil de especificidade do substrato e, em seguida, classifica-a em seis classes (Figura 22).<sup>268</sup>



**Figura 22 Classificação de amidase.**<sup>268</sup>

As amidases (AS) pertencem à família das hidrólases, que atuam em ligações carbononitrogênio diferentes das ligações peptídicas, mais especificamente nas amidas lineares. Assim, os dois substratos dessa enzima são amida de ácido monocarboxílico e H<sub>2</sub>O, enquanto os produtos são o monocarboxilato e NH<sub>3</sub>.<sup>268</sup>

Estas enzimas contêm um local conservado de aproximadamente 130 aminoácidos conhecidos como sequência AS. As enzimas AS catalisam a hidrólise das ligações amida, embora as famílias variem muito em especificidade e funções de substrato. No entanto, essas enzimas mantêm uma estrutura alfa/beta/alfa central, onde as topologias das metades N- e C-terminais são semelhantes. As enzimas AS possuem caracteristicamente uma região C-terminal altamente conservada, rica em resíduos de serina e glicina, mas sem resíduos de ácido aspártico e histidina, diferem, portanto, das serinas hidrólases clássicas. Possuem uma tríade catalítica de Ser-Ser-Lys exclusiva e altamente conservada, usada para a hidrólise da amida, embora o mecanismo catalítico para a formação de intermediários acil-enzima possa diferir entre as enzimas (Figura 23).<sup>274</sup>

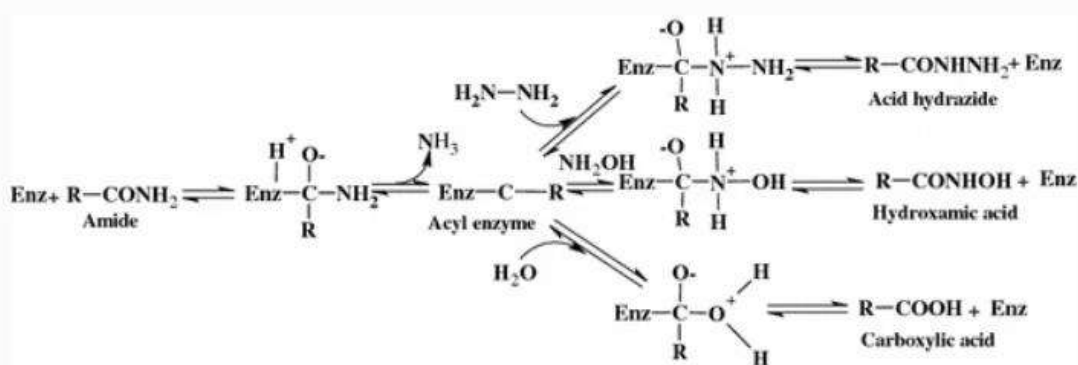


**Figura 23 Mecanismo proposto para a hidrólise de amida de ácido gordo (FAAH).<sup>274</sup>**

Na natureza, as enzimas de metabolização de amida desempenham papéis significativos na formação de ligações C – N e reações de clivagem em organismos eucarióticos e procarióticos para a produção de substâncias naturais, como auxina e biotina, etc., metabolismo de nutrientes, degradação de compostos cianogênicos tóxicos.<sup>275</sup> Embora as atividades do metabolismo do nitrilo sejam relativamente raras em plantas e animais, elas são comumente observadas em bactérias que metabolizam as amidases como fonte única de carbono e azoto.<sup>276</sup>

As amidases, em geral, catalisam quatro tipos diferentes de atividades, nomeadamente atividade de amidotransferase, atividade de aciltransferase, atividade de transferase de ácido e atividade de transferase de éster. O mecanismo de hidrólise da amida envolve dois substratos (amida e água) e dois produtos (carboxilato e amina).<sup>268</sup>

O mecanismo de hidrólise catalisada por amidase e a reação de transferência de acilo são apresentados na Figura 24. Em 1997, *Kobayashi e colegas*<sup>277</sup> propuseram um mecanismo hidrolítico em que o grupo carbonilo da amida sofre ataque nucleofílico, resultando na formação de um intermediário tetraédrico. O intermediário tetraédrico é convertido num complexo acil-enzima com remoção imediata de amónia (amina); o complexo acil-enzima é então hidrolisado a ácido após a adição de uma molécula de água (Figura 24).<sup>268</sup>



**Figura 24 Mecanismo de reação de transferência do grupo acil de amida para hidrazina, hidroxilamina e água.**

As amidases são enzimas amplamente distribuídas na natureza, com diversas capacidades bioquímicas. Os estudos até agora mostraram que algumas dessas enzimas têm ampla especificidade de substrato, enquanto outras são exclusivamente enantio e/ou estereosseletivas. A análise molecular contínua e os estudos de estrutura/função irá melhorar ainda mais a nossa compreensão dessas enzimas e aumentar a sua capacidade biotecnológica para biocatálise e biorremediação.<sup>268</sup>

#### **1.2.4 Fármacos contendo grupo nitro.**

Os nitrocompostos são agentes químicos que se caracterizam pela presença de um ou mais grupos nitro (NO<sub>2</sub>).<sup>168</sup> O grupo nitro está presente em moléculas bioativas e fármacos tais como agentes antibacterianos, antiparasitários e antitumorais.<sup>165</sup> É considerado um grupo funcional versátil e único em química medicinal. Apesar de uma longa história de uso em terapêutica, está muitas vezes associado a problemas de toxicidade e é frequentemente classificado como um alerta estrutural ou toxicóforo, pelo que as evidências relacionadas com fármacos contendo grupos nitro são bastante contraditórias.<sup>10</sup>

O grupo nitro é um grupo fortemente atrator de elétrons que por essa razão cria sítios com deficiência de elétrons localizados dentro das moléculas. Estes sítios electrofílicos interagem com os nucleófilos biológicos presentes nos sistemas vivos, como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e enzimas. A interação pode ocorrer por adição nucleofílica e por transferência de elétrons envolvendo oxidação e redução, ou simplesmente por complexação molecular.<sup>169,170</sup> Moléculas contendo grupos nitro que antes eram evitados em programas de descoberta de fármacos devido a potenciais problemas de toxicidade, estão agora a ser usadas com sucesso, como antineoplásicos,<sup>171</sup> antibióticos,<sup>172-175</sup> e agentes antiparasitários,<sup>162,164,176,177</sup> bem como tranquilizantes, fungicidas, inseticidas e herbicidas: por exemplo, a nitazoxanida está aprovada para tratamento da giardíase e criptosporidiose;<sup>181</sup> metronidazol para tricomoníase, giardíase e amebíase;<sup>182</sup> e nifurtimox para DC e HAT. Além disso, os compostos contendo um grupo nitroaromático são usados para tratar doença de Parkinson, angina e insónia.<sup>178-180</sup> Os grupos nitro podem sofrer redução e servir como pró-fármacos devido à sua bioativação por redução enzimática, gerando espécies reativas que produzirão efeitos biológicos.<sup>10</sup>

Na última década foram estudados vários compostos contendo grupos nitro como potenciais agentes anticancerígenos, antituberculosos e antiparasitários. Estes compostos têm diversos mecanismos de ação, causando ações de morte celular, como a inibição da topoisomerase,<sup>183-186</sup> inibição da histona desacetilase,<sup>187,188</sup> alquilação do DNA,<sup>189</sup> ou inibição

da polimerização da tubulina,<sup>190,191</sup> e demonstraram efeitos induzidos por hipóxia que são atribuídos à sua capacidade de ativação bio redutiva.<sup>189,192-195</sup> Por exemplo, o nitroimidazol é amplamente utilizado para exercer vários efeitos biológicos e é frequentemente considerado um agente bio redutor.<sup>198-200</sup> Isso é claramente evidenciado pelo número de nitroimidazóis clinicamente aprovados, principalmente para tratamento de doenças infecciosas.<sup>174,175,200-208</sup>

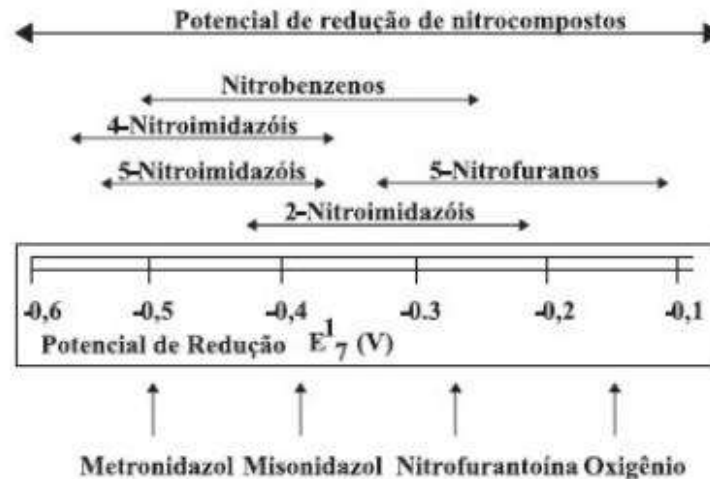
#### **1.2.4.1 Bioativação dos compostos que contêm grupos nitro.**

Muitos compostos nitroaromáticos requerem bioativação para exercer a sua ação. Os nitrocompostos podem ser metabolizados e degradados por microorganismos, como bactérias e fungos, que os utilizam até mesmo como fonte de azoto e carbono.<sup>168,169</sup> No entanto, a bioativação indesejada também pode causar efeitos secundários tóxicos.<sup>164</sup> A toxicidade sempre foi um problema com medicamentos, especialmente aqueles que contêm grupos nitro, e a carcinogenicidade, hepatotoxicidade, mutagenicidade e supressão da medula óssea foram os principais efeitos adversos encontrados com tais agentes.<sup>212</sup>

A passagem transmembranar dessas moléculas ocorre por difusão passiva e aumenta à medida que os radicais livres, vindos do processo de biorredução, desestabilizam a membrana celular. Assim, devido ao aumento da concentração intracelular de nitrocompostos, mais radicais livres são gerados e, conseqüentemente, maior é o dano causado pelo stress oxidativo.<sup>215</sup> É consensual que o mecanismo de ação desta classe de compostos está ligado ao processo de redução *in vivo* do grupo nitro e à subsequente interação dos produtos formados, a partir desta reação, com biomoléculas essenciais de bactérias, fungos e parasitas.<sup>214,216</sup> No entanto, em alguns casos, pode também resultar da interação desses compostos com recetores, sem que a redução catalítica do grupo nitro seja o elemento essencial da bioatividade do composto.<sup>165</sup>

##### **1.2.4.1.1 A capacidade de redução.**

A capacidade de redução de certos sistemas enzimáticos em microorganismos aeróbios atinge valores de - 0,35 V, ao contrário dos anaeróbios que conseguem reduzir compostos nitro em valores de - 0,5 V. Esta diferença de potencial de redução entre os vários nitrocompostos resulta numa base importante para a compreensão da toxicidade seletiva para os microorganismos. Além disso, a ativação redutiva em anaeróbios só é possível numa faixa limitada de potencial de determinados sistemas enzimáticos, o que comprova a seletividade de alguns compostos.<sup>215,219</sup> Os valores dos potenciais de redução de alguns nitrocompostos podem ser observados na Figura 25.



**Figura 25** Intervalo de variação do potencial de redução dos nitrocompostos e do oxigênio.<sup>165</sup>

A facilidade de redução de alguns nitrofuranos (Figura 25) mostra que o grupo nitro é reduzido por microrganismos aeróbios e anaeróbios, justificando a perda de seletividade destes compostos. Neste contexto, a nitrofurantoína, por exemplo, apresenta nitrorredução eficiente (cerca de -0,3 V) em meio contendo alta concentração das enzimas do citocromo P-450, dependente de NADPH, de mamíferos, comprovando a falta de seletividade de alguns nitrocompostos contra bactérias e humanos.<sup>220</sup>

#### 1.2.4.1.2 Nitrorredutases

Em sistemas biológicos maioria dos nitrocompostos requerem redução enzimática para induzir os efeitos terapêuticos e citotóxicos.<sup>168</sup> As nitrorredutases são enzimas capazes de catalisar a redução do grupo nitro e utilizam mononucleótido de flavina (FMN) ou dinucleótido de flavina e adenina (FAD) como grupo prostético e nicotinamida adenina dinucleótido (NAD(P)H) como agente redutor.<sup>230,231</sup> Estruturalmente, as nitroreductases são proteínas homodiméricas, com subunidades constituídas por  $\alpha$ -hélice e estruturas  $\beta$ , sendo que as subunidades se unem formando uma cavidade hidrofóbica onde ficam localizados o grupo prostético e o sítio ativo da enzima.<sup>231,232</sup>

##### 1.2.4.1.2.1 Classificação das nitrorredutases

Dois grupos de nitrorredutases foram bioquimicamente caracterizados: as nitrorredutases insensíveis ao oxigênio (tipo I) que realizam uma redução sequencial do nitrocomposto transferindo dois elétrons do NADPH ou NADH para o grupo  $\text{NO}_2^-$ , levando à formação de intermediários nitroso, hidroxilamina e aminas primárias;<sup>232,233</sup> e as nitrorredutases sensíveis ao oxigênio (tipo II), que catalisam a redução sequencial do nitrocomposto pela transferência de um elétron dos agentes redutores para o grupo  $\text{NO}_2^-$ , produzindo um radical nitroanião que reage com oxigênio e origina

superóxido, regenerando o nitrocomposto original (Figura 30). Este "ciclo fútil" pode causar "stress" oxidativo ao produzir grande quantidade de superóxido.<sup>235,236</sup> As nitrorredutases do tipo I participam na redução de uma variedade de nitrocompostos, incluindo nitrofuranos, nitrobenzenos, nitrofenóis, nitrobenzoatos, nitrotoluenos, nitroimidazóis, entre outros.<sup>220</sup> As nitrorredutases de tipo II são menos estudadas.

As nitrorredutases compreendem uma família de proteínas conservadas evolutivamente e originalmente identificadas em eubactérias.<sup>220</sup> As nitrorredutases do tipo I ou insensíveis ao oxigênio, podem ser classificadas em duas famílias ou grupos principais representadas pelas nitrorredutases de *Escherichia coli* NfsA (grupo A) e NfsB (grupo B), respetivamente (Figura 26), sendo que estes grupos possuem baixa similaridade entre si.<sup>220,237</sup>

As nitrorredutases são amplamente distribuídas entre as bactérias. Pelo contrário, as nitrorredutases em eucariotas são bastante restritas. Em mamíferos existem algumas enzimas funcionalmente semelhantes às nitrorredutases do tipo I, como a NAD(P)H-quinona oxidoreductase (DT - diaforase) e a xantina desidrogenase. No entanto, ambas as enzimas não são filogeneticamente relacionadas e não possuem o domínio característico da família.<sup>238</sup> Entretanto, uma proteína com domínio de nitrorredutases foi descrita em humanos, a iodotirosina deiodinase, envolvida na produção da hormona da tiroide.<sup>239, 167</sup>

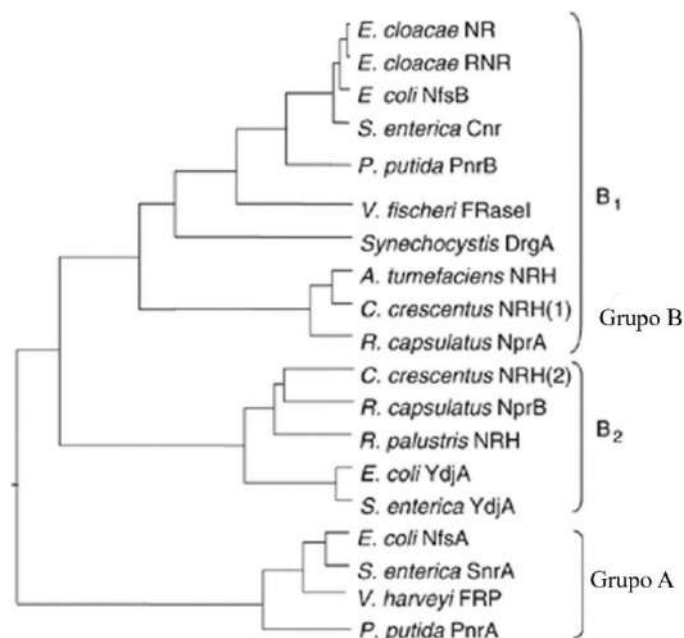
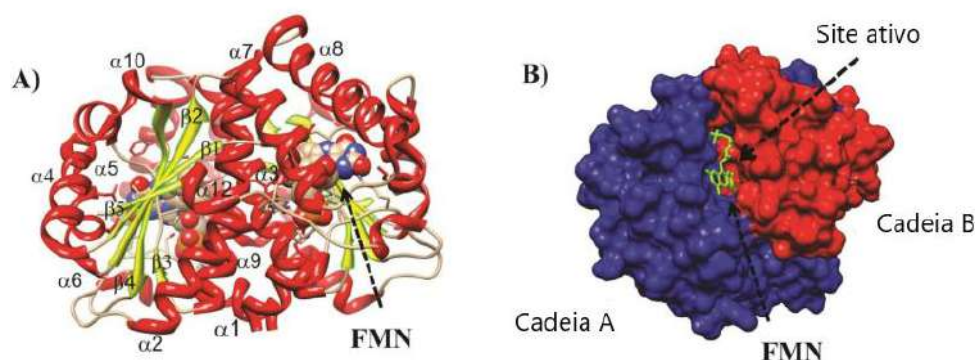


Figura 26 Árvore das nitrorredutases do tipo I ou insensíveis ao oxigênio.<sup>220</sup>

#### 1.2.4.1.2.2 Estrutura das nitrorredutases

As estruturas cristalinas de muitas nitrorredutases foram determinadas.<sup>239,240,242</sup> Apesar da variação na sequência de aminoácidos, as estruturas 3D das nitrorredutases é muito semelhante

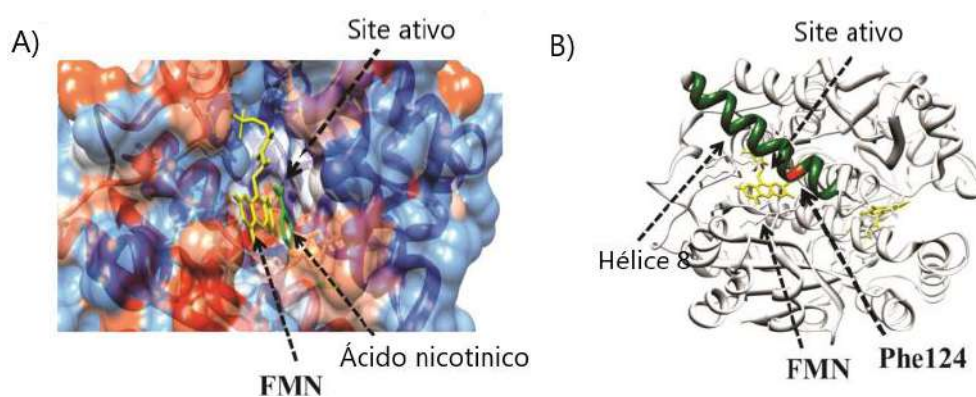
(Figura 27A). As nitrorredutases não possuem metais na estrutura da enzima ou do grupo sulfidrilo no sítio ativo.<sup>243</sup> Além disso, compartilham uma estrutura globular homodimérica, dobra  $\alpha + \beta$  das subunidades, com massa molecular monomérica de 20-30 kDa. Possuem um núcleo hidrofóbico central consistindo em folhas beta em cadeia circundadas por hélices alfa onde estão localizados os domínios conservados para a ligação FMN (Figura 27A) e o sítio ativo da enzima para interação com NAD(P)H e substratos (Figura 27B).<sup>243</sup>



**Figura 27 Estrutura das nitrorredutases.**<sup>167</sup>

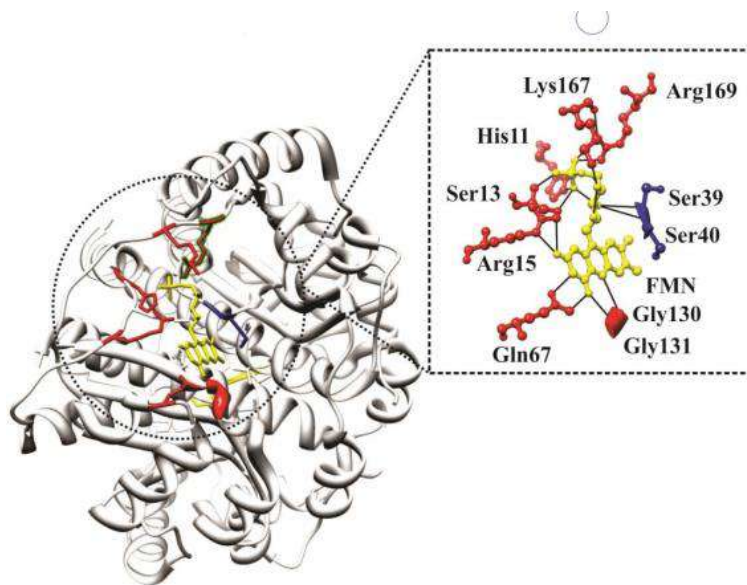
**(A) Dobra global do homodímero de NfsB; o grupo prostético FMN é mostrado como esferas de "Wan der Waals". As  $\alpha$ -hélices (vermelho) são marcadas de 1 a 12 e  $\beta$ -folhas (amarelo) são representados de 1 a 5. (B) O sítio ativo é loteado na interface do dímero, e os resíduos de monómeros (cadeia A em vermelho e a cadeia B em azul) contribuem para a ligação ao FMN.**

Os grupos prostéticos FMN estão ligados em bolsas profundas na interface do dímero e interagem com resíduos de ambos os monómeros, formando ligações de hidrogénio com uma subunidade e contatos hidrofóbicos para ambos (Figura 27B e Figura 28A).<sup>243</sup> Este conjunto de interação com FMN é bem conservado em todas as nitrorredutases e envolve resíduos idênticos ou semelhantes.<sup>242</sup>



**Figura 28 Estrutura das nitrorredutases.**<sup>167</sup>

**(A) A estrutura do NfsB complexado com ácido nicotínico. A superfície da proteína, mostrada ao fundo, é colorida conforme o seu potencial eletrostático. Azul indica mudança positiva, vermelho indica carga negativa e carga branca neutra. (B) Figura enfatizando a alfa-hélice 8 (com resíduo Phe124 em vermelho) em contato com o sítio ativo da nitrorredutase NfsB.**



**Figura 29 Estrutura das nitrorredutases.** <sup>167</sup>

**A interação iônica e a ligação de hidrogênio estabilizam o FMN no sítio ativo. Os resíduos de aminoácidos representados estão bem conservados em todas as nitrorredutases (ou resíduos semelhantes).**

As nitrorredutases do grupo NfsA/Frp usam NADPH como fonte de elétrons, enquanto o grupo NfsB/FRaseI pode usar NADH ou NADPH.<sup>232,244</sup> A especificidade de NADPH está associada a dois requisitos: o grupo 2'-fosfato de NADPH interage com Arg203 e o anel de nicotinamida de NADPH que está localizado próximo ao anel de isoloxazina de FMN para transferência de íon hidreto entre os dois anéis (Figura 28A).<sup>245</sup> Nesse sentido, resíduos carregados positivamente, como arginina, lisina e histidina, estão envolvidos no reconhecimento do grupo 2'-fosfato do NADPH por meio de um átomo de hidrogênio.<sup>232,240</sup> Em NfsB, o anel de nicotinamida de NAD(P)H é colocado entre o anel de flavina isoaloxazina e o resíduo Phe124.<sup>243</sup> Em NfnB de *M. smegmatis* o fosfato 2' faz apenas uma ponte salina com resíduo Arg105 (Phe124 em NfsB), o que pode explicar porque NfnB não mostra especificidade significativa para NADPH ou NADH. Um mecanismo semelhante deve ocorrer em outras enzimas do grupo B, explicando a plasticidade desses dois cofatores.<sup>241</sup>

Além disso, o estado de oxidação do FMN influencia a orientação espacial do substrato no sítio ativo.<sup>232</sup> Portanto, a distribuição de carga nos anéis FMN, que se altera com a redução, pode ser uma determinante chave da ligação ao substrato e reatividade em flavoproteínas com ampla especificidade de substrato.<sup>244</sup> No NfsB, a ampla especificidade do substrato é explicada pela plasticidade inerente da hélice 8 que contém o resíduo Phe124 (ou semelhante em outras nitrorredutases), mostrando uma elevada variabilidade na posição para acomodar

substratos de tamanhos diferentes (Figura 28B).<sup>232,243</sup> Além disso, a mutação de Arg203 em NfsA equivalente a Phe124 em NfsB afeta a especificidade do substrato.<sup>232,244</sup> Estes e outros resíduos do sítio ativo variam entre as nitrorredutases, sugerindo que podem desempenhar um papel na determinação das preferências do substrato.<sup>232,243</sup>

A inspeção de estruturas de nitrorredutases sugere um modo de ligação de substrato comum: compostos nitro são todos posicionados com o seu empilhamento de porção nitrobenzeno (nitrofurano, nitroimidazol) paralelo ao anel de isoaloxazina FMN e grupo nitro poente em ~3,5 Å para FMN. Devido ao espaço limitado entre o sítio ativo, o substrato inicial (NADPH/NADH) e o segundo substrato (composto nitro) não se podem ligar simultaneamente ao sítio ativo.<sup>243</sup> Tal mecanismo implica que NAD(P)H e o segundo substrato deve se ligar ao sítio ativo da nitrorredutase de modo que o anel de nicotinamida reduzido de NAD(P)H se aproxime do anel de isoaloxazina de FMN suficientemente próximo para permitir a transferência eficiente de hidreto, reduzindo então o FMN. Posteriormente, o NAD(P)<sup>+</sup> é liberto e o segundo substrato se liga na bolsa do sítio ativo, permitindo a transferência reversa de elétrons da porção de flavina para o efeito de redução.<sup>240,243,244</sup>

O sítio ativo da proteína IYD é estruturalmente semelhante ao sítio ativo NfsB, onde o substrato moniodotirosina (MIT) se liga de forma semelhante ao ácido nicotínico no sítio ativo NfsB (Figura 28B).<sup>239</sup> A química promovida por esta enzima é provavelmente bem diferente das nitrorredutases insensíveis ao oxigênio porque sua função biológica parece envolver a degradação do FMN ligado pelo oxigênio molecular.<sup>239</sup> Mecanismo semelhante ocorre na redução realizada pela enzima BluB (5,6-dimetilbenzimidazol sintase).<sup>246</sup>

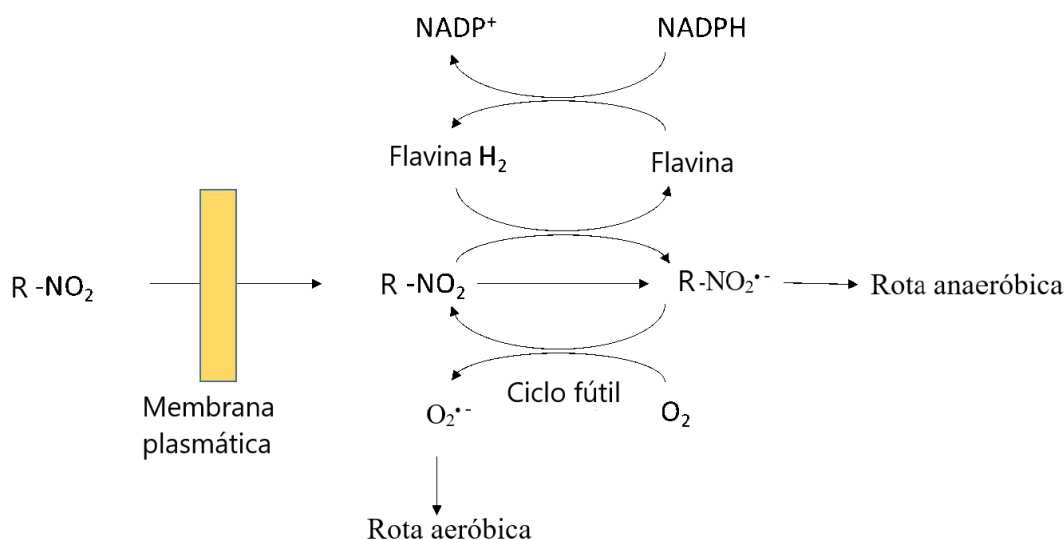
A análise da estrutura das nitrorredutases revela uma plasticidade inerente do sítio ativo para a ligação do substrato e variabilidade nos resíduos de aminoácidos que participam nas suas interações, explicando assim as diferentes atividades da nitrorredutase para nitroaromáticos e outros compostos e também sugere que essas enzimas podem participar em diferentes funções metabólicas nos organismos.<sup>167</sup>

#### **1.2.4.1.3 Mecanismo de redução por nitrorredutases**

Uma sequência generalizada para a via bioreduativa envolve a formação um derivado nitroso, um anião de radical nitro, um radical nitroxilo, hidroxilamina e uma amina primária (Figura 31). Problemas de toxicidade associados a compostos nitro foram atribuídos a cada um desses intermediários. O derivado de hidroxilamina são particularmente responsáveis

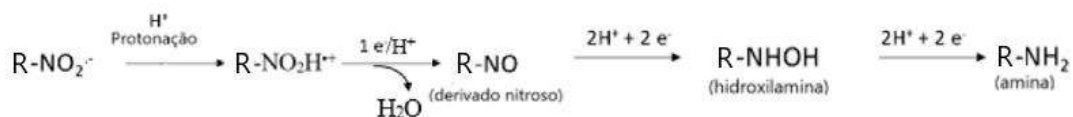
pela meta-hemoglobinemia, enquanto os efeitos cumulativos do anião de radical nitro, derivados nitroso ou hidroxilamina esterificada (por exemplo, derivados de sulfato) são considerados responsáveis pelas atividades mutagênicas e carcinogênicas. O anião superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilo formados durante o ciclo redox do anião do radical nitro também podem levar à carcinogenicidade.<sup>212</sup> Além disso, há evidências que sugerem que as hidroxilaminas são convertidas em iões de nitrênio reativos, que podem reagir com o DNA.<sup>213</sup>

A redução completa destes compostos (Figura 31) envolve 6 eletrões até o derivado amino, embora o intermediário hidroxilamina, envolvendo 4 eletrões, seja o produto final da biorredução de alguns nitrocompostos.



**Figura 30 Mecanismo geral de redução por nitrorredutases**

#### 1.2.4.1.3.1 Mecanismo de redução por nitrorredutases. Rota anaeróbia

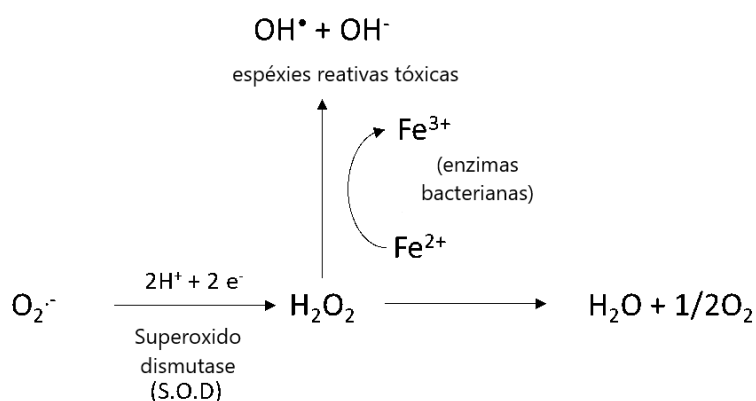


**Figura 31 Mecanismo biorredutivo de nitrocompostos. Rota anaeróbia. Continuação da Figura 30.**

Em condições anaeróbias, o anião radical formado na primeira etapa pode ser transformado na hidroxilamina. Ambos constituem os principais intermediários ou

metabólitos do processo de redução enzimática do grupo nitro até amino. O radical  $\text{Ar-NO}_2^{\cdot-}$  e o derivado hidroxilamina ( $\text{Ar-NHOH}$ ) podem interagir com o DNA celular, o que resulta nos efeitos biológicos observados. Todavia, outros intermediários também apresentam atividade biológica, entre as quais, a toxicidade ao DNA supostamente causada pelo radical  $\text{Ar-NO}_2\text{H}^+$  e a inativação enzimática desempenhada pelo derivado nitroso ( $\text{Ar-NO}$ ), foi apresentado como um eliminador eficiente de tióis essenciais na célula, sendo este último então submetido a uma  $\text{H}^+$ redução adicional à amina (Figura 31).<sup>165</sup>

#### 1.2.4.1.3.2 Mecanismo de redução por nitrorredutases. Rota aeróbica



**Figura 32 Mecanismo biorredutivo de nitrocompostos. Rota aeróbica. Continuação da Figura 30.**

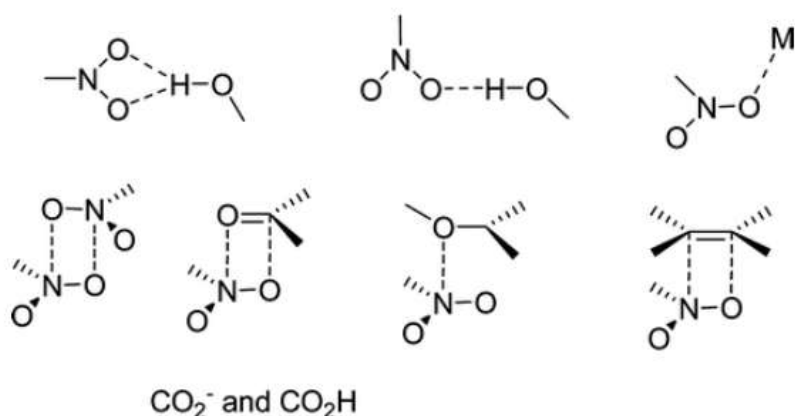
Em condições aeróbicas, o anião do radical nitro reage com o oxigênio, presente no meio, para formar radical superóxido.<sup>214</sup> Este radical, por sua vez, sofre ação de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), formando peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que pode desestruturar membranas biológicas e também reagir com enzimas ferredoxinas, liberando espécies reativas ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) que são tóxicas para as células bacterianas e parasitárias (Figura 32).<sup>214-216</sup>

De acordo com a Figura 31 e a Figura 32, pode ser concluído que o processo de redução depende da estrutura do nitrocomposto e do meio onde ocorre. As bactérias podem conter os dois tipos de nitrorredutases, embora neste processo a recepção de 1 elétron a partir do primeiro passo de redução do grupo nitro, demonstrado pelo par  $\text{Ar-NO}_2/\text{Ar-NO}_2^{\cdot-}$ , seja a etapa principal responsável pela ação biológica da maioria dos nitrocompostos (Figura 30).<sup>214-216</sup>

#### 1.2.4.1.4 Interação dos compostos que contêm grupo nitro com recetores.

O efeito biológico, em alguns casos, pode também resultar da interação desses compostos com recetores específicos, sem que a redução catalítica do grupo nitro seja o elemento

essencial da bioatividade do composto. A porção nitro é um substituinte pequeno e moderadamente polar capaz de se ligar a hidrogênio.<sup>165</sup>



**Figura 33 Interações de contacto entre grupo nitro e funcionais grupos no centro ativo da enzima.**<sup>163</sup>

A maioria dos compostos nitrados, no entanto, apresenta o mecanismo de biorredução enzimática, o que resulta na formação de radicais livres com toxicidade preferencial para células bacterianas e parasitárias.<sup>165</sup>

#### 1.2.4.2 Problemas de Toxicidade

Apesar dessas amplas aplicações, a metabolização de nitrocompostos pode levar à formação de intermediários tóxicos, genotóxicos, mutagénicos e/ou carcinogénicos<sup>209,210</sup> e esta é indubitavelmente a razão para evitar estes compostos na maior dos casos. Muitos nitrocompostos podem gerar espécies reativas de oxigénio e de azoto (ERO e ERNs, respetivamente) que podem reagir com biomoléculas.<sup>211</sup> Desta forma, esses compostos têm atraído considerável atenção devido ao seu risco potencial para a saúde humana.<sup>167</sup> Concomitantemente, a toxicidade seletiva com compostos nitroaromáticos e heteroaromáticos também forma a base da quimioterapia que resulta no envenenamento de bactérias, parasitas ou células tumorais sem prejudicar o organismo hospedeiro, ou as células normais.<sup>164</sup> Os químicos medicinais têm se esforçado constantemente para explorar o potencial bioativo de compostos nitroaromáticos e heteroaromáticos em diversas aplicações, desde o tratamento de infeções parasitárias ao cancro e em muitas doenças dependentes da expressão de enzimas. Geralmente, as questões relacionadas com tais agentes são de fato contraditórias, visto que o grupo nitro é considerado tanto um farmacóforo, ou parte integrante do farmacóforo, quanto um toxicóforo ou alerta estrutural.<sup>162</sup>

O risco de mutagenicidade é uma das principais razões pelas quais os nitroarenos são menos preferidos na área de desenho de fármacos. O grupo nitro e a sua localização nos anéis aromáticos influenciam a ligação ao DNA e o perfil mutagénico de um composto aromático. Tem sido amplamente sugerido que a redução do grupo nitro desempenha um papel crítico na mutagénese, visto que os principais aductos de DNA formados com compostos nitroaromáticos foram isolados e caracterizados. No entanto, há uma diferença nas taxas de formação e nos locais onde podem ser introduzidos preferencialmente. Há uma assinatura característica de especificidade mutagénica associada a cada mutagénio e, portanto, eles exercem efeitos mutagénicos diferenciais.<sup>209</sup>

Ao mesmo tempo, não todas as moléculas contendo um grupo nitro é mutagénico, e o campo de descoberta de medicamentos antituberculosos exemplifica isso. Delamanida (29), BTZ043 (31) e pretomanida (PA-824, 30) representam fármacos antituberculosos em desenvolvimento clínico que não foram considerados mutagénicos.<sup>221,222</sup>

Numerosos estudos estão sendo conduzidos para resolver o problema de mutagenicidade de fármacos contendo grupos nitro. Um interessante estudo com o objetivo de mitigar a mutagenicidade de compostos nitro foi conduzido por *Landge et al.*<sup>223</sup> A investigação levou à identificação de compostos à base de benzotiazol contendo grupos nitro que eram não mutagénicos e demonstraram perfis de segurança melhorados. Fatores eletrónicos e o posicionamento adequado de substituintes na vizinhança do grupo nitro (fatores estereoeletrónicos) foram considerados críticos na modulação do perfil mutagénico dos compostos.<sup>223</sup>

Outros estudos foram realizados por *Shamovsky et al.* para determinar a relação estrutura-genotoxicidade para aminas aromáticas. A investigação foi baseada num claro entendimento de que a ativação de  $ArNH_2$  é geralmente iniciada com N-hidroxilação pelas enzimas P450 (CYP1A2). A mesma via é seguida pelos nitroarenos após sofrer nitrorredução por uma nitrorredutase bacteriana em hidroxilaminas. Além disso, a geração de iões nitrénio pela dissociação heterolítica de hidroxilaminas e os seus ésteres são catalisada por protonação em condições ácidas. Concluiu-se que alterações estruturais nas frações  $ArNH_2$  possibilitando o rompimento da compatibilidade geométrica com CYP1A2 dificultam a abstração de prótons ou desestabilizam fortemente o ião nitrénio, evitando a genotoxicidade.<sup>224-226</sup> Os grupos hidroxilamino, nitro e nitroso são capaz de gerar grupos amina por conversão metabólica. Além disso, a formação de N-hidroxilaminas por redução catalisada por enzimas microsossomais e citosólicas também é responsável pela ativação inicial de hidrocarbonetos nitroaromáticos.

Nesse contexto, a nitrorredução microsossomal também parece depender do complexo do citocromo P-450.<sup>227</sup> Os resultados desses estudos de estrutura-genotoxicidade podem ser úteis para a classe de compostos contendo grupos nitro, sendo essencialmente aminas mascaradas.

Outro estudo foi conduzido por *Boechat et al.* avaliar uma série de nitroimidazóis quanto à genotoxicidade (o ensaio do cometa) e mutagenicidade (o ensaio salmonella/microsossoma). Os resultados deste estudo indicaram que a colocação de um grupo nitro em C-4 e um grupo  $-CH_3$  em C-2 em nitroimidazóis diminuiu os efeitos genotóxicos.<sup>229</sup>

Apesar das preocupações de segurança válidas em torno dos compostos nitroaromáticos, há um interesse contínuo no seu uso como terapêutica, particularmente para doenças infecciosas e cancro. Nestes casos, o objetivo é desenvolver compostos que sejam seletivamente tóxicos de forma que o composto mate o agente infeccioso/células cancerosas sem prejudicar o hospedeiro/células normais.<sup>162</sup>

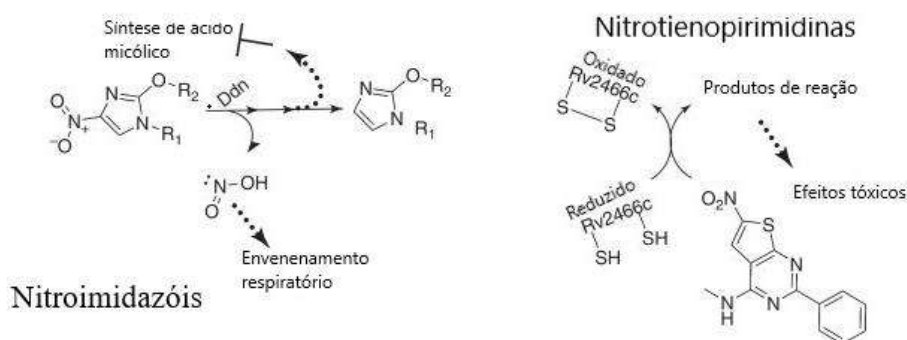
#### **1.2.4.3 Agentes antituberculosos contendo grupos nitro**

Têm sido feitos diversos estudos sobre agentes antituberculosos contendo grupos nitro, a maioria deles relacionados com a modificação da estrutura. Um estudo envolveu a substituição bioisostérica do grupo nitro numa tentativa de eliminar ou diminuir a toxicidade. Contudo, de modo geral os análogos sem o grupo nitro, mostraram ser menos ativos. Compostos como os nitroimidazóis e as benzotiazinonas mostraram grande potencial contra infecções por *M. tuberculosis*, incluindo delamanida (29)<sup>248,249</sup> e pretomanida (30) (dois nitroimidazóis) e a benzotiazinona BTZ043 (31).<sup>51,250</sup> Os nitrocompostos são geralmente ativados no *M. tuberculosis* por diferentes reações enzimáticas, levando a diferentes mecanismos de ação (Figura 34, Figura 39).

##### **1.2.4.3.1 Agentes antituberculosos ativados pelas nitrorreductases micobacterianas .**

Pretomanid (30), possuindo uma estrutura de 5-nitroimidazooxazina, e delamanida (29), contendo um esqueleto de 5-nitroimidazooxazol, são potentes inibidores da replicação ativa de latente de *M. tuberculosis*. Os 4-nitroimidazóis bicíclicos PA-824 (30) e delamanida (29) são pró-fármacos metabolizados pelo *M. tuberculosis* e ativados por Ddn, uma nitrorreductase dependente de deazaflavina.<sup>251</sup> O composto sofre biorredução do grupo nitro aromático a um intermediário anião de radical nitro reativo na célula e é assim ativado. A inibição da síntese de lípidos e proteínas da parede celular é considerada o principal mecanismo de ação do pretomanid (30), mas o seu efeito contra bactérias não replicantes indica que a inibição da

biossíntese da parede celular não é o único modo de ação.<sup>51,222</sup> Delamanida (29) também é um pró-fármaco que precisa ser ativado pelo *M. tuberculosis*.<sup>248,238,249</sup> Os intermediários reativos, formados durante a conversão para os principais desnitro-metabólitos, são considerados como tendo um papel vital na inibição da produção de ácido metoxicólico e cetomicólico em bacilos replicantes,<sup>252</sup> enquanto a geração de espécies reativas de azoto é a principal causa da atividade anaeróbia dos compostos (Figura 34).<sup>247,251</sup>

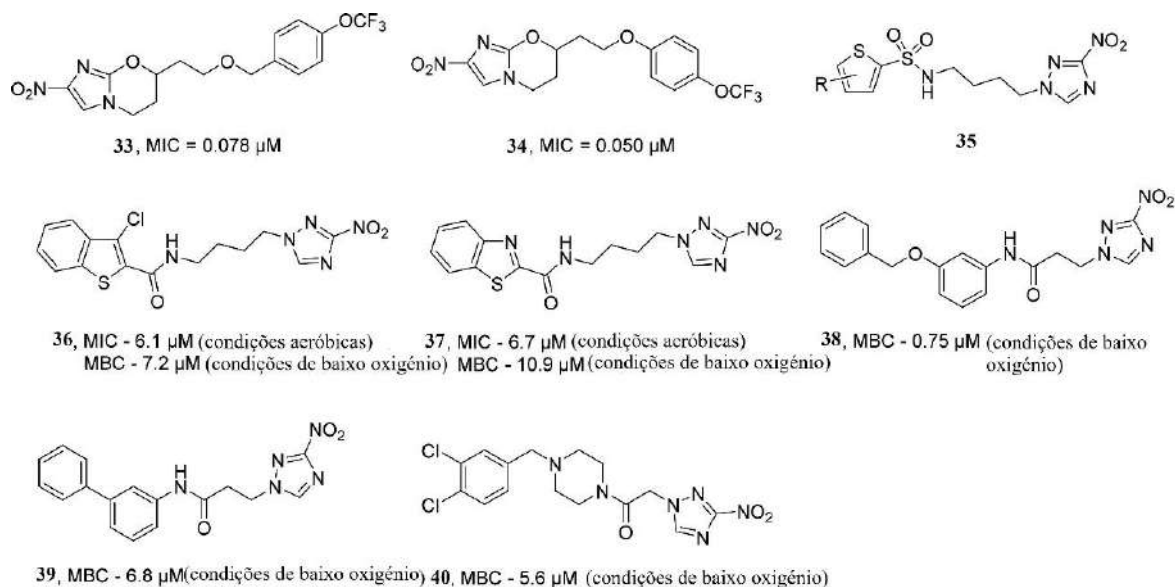


**Figura 34 Mecanismos de ativação e ação de nitroimidazóis e nitrotienopirimidinas.<sup>77</sup>**

O Ddn ativa os nitroimidazóis, que poderiam exercer a sua atividade antitubercular contra bacilos replicantes e não replicantes por meio de diferentes metabólitos intermediários da reação. Da mesma forma, Rv2466c ativa os nitrotiofenos, provavelmente libertando intermediários tóxicos. (Figura 34) Rv2466c é uma redutase tipo tiorredoxina que usa tiois intracelulares como substratos.<sup>247</sup>

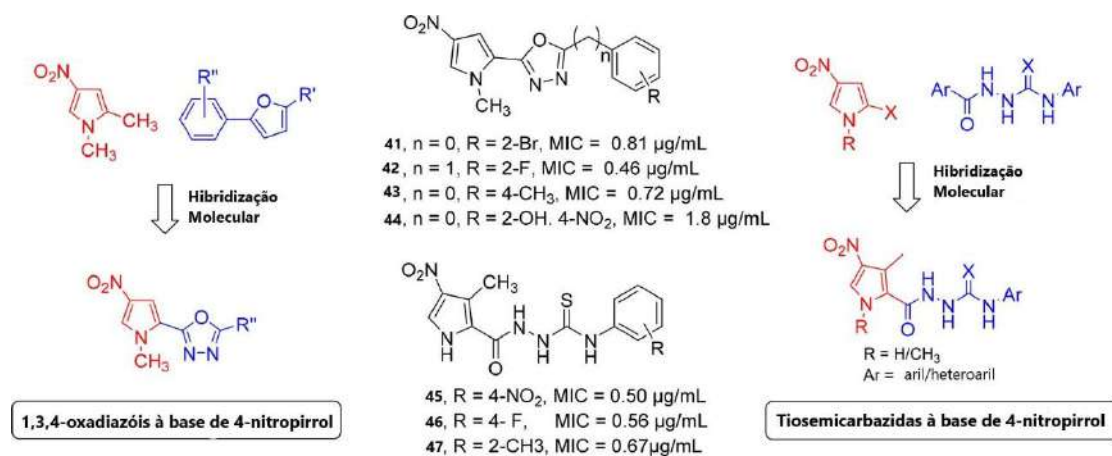
Com base nos resultados pré-clínicos positivos obtidos com compostos de cloroquinolona ligados a 2-nitroimidazol, foi também investigado o potencial antituberculose de amidas e sulfonamidas com base em 3-nitrotriazol e 2-nitroimidazol contra *M. tuberculosis* H37Rv3 aeróbico usando o ensaio de viabilidade celular BTG (BacTiter-Glo) de bactérias. Algumas das sulfonamidas (35) exibiram uma tendência positiva com o aumento da lipofilicidade; entretanto, não foi observada dependência entre a atividade antimicobacteriana e o potencial de redução de um eletrão. Em geral, os nitrotriazóis demonstraram atividade antimicobacteriana inalterada no ensaio BTG contra estirpes resistentes (Figura 35).<sup>253</sup> A avaliação da atividade antituberculose desses compostos levou à identificação dos compostos 36 e 37, que exibiram potencial contra o *M. tuberculosis* aeróbico e hipóxico e também

possuíam atividades bactericidas e antituberculosos intracelulares. Os compostos [38](#), [39](#) e [40](#) foram considerados seletivamente ativos contra o *M. tuberculosis* aeróbio. O composto [39](#) também exibiu boas características ADMET in vitro, demonstrando excelente permeabilidade, baixa taxa de efluxo, boa estabilidade microsomal e química e uma baixa hepatotoxicidade (Figura 35).<sup>200</sup>



**Figura 35 Agentes antituberculosos contendo grupos nitro.**<sup>10</sup>

Baseados no núcleo de 4-nitropirrol foram sintetizados uma série de novos derivados 1,3,4-oxadiazol como agentes antimicrobianos e antituberculosos. Os compostos [41](#), [42](#), [43](#) e [44](#) mostraram potencial antitubercular significativo, com valores CIM de 0,81  $\mu$ g/mL, 0,46  $\mu$ g/mL, 0,72  $\mu$ g/mL e 1,8 mg/mL, respetivamente. Entre eles, o composto [41](#) foi quase equipotente à isoniazida ([3](#)) (0,40 mg/mL). Os resultados do estudo foram encorajadores, uma vez que todos os compostos foram considerados não tóxicos quando testados em células de mamíferos usando a linha celular VERO (Figura 36).<sup>254</sup>



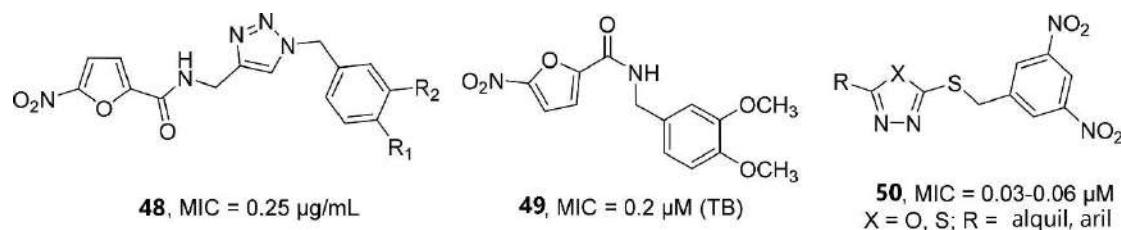
**Figura 36 Agentes antituberculosos contendo grupos nitro.**<sup>10</sup>

Também foi sintetizada uma série de conjugados 4-nitropirrol-semicarbazida, baseado no biopotencial de alcalóides bromopirrol e derivados de semicarbazida para atividade antimicrobiana. Os híbridos com NH do pirrol livre foram mais potentes contra o *M. tuberculosis* em comparação com os análogos N-metilados.

As tiossemicarbazidas mostraram melhor atividade antitubercular do que as semicarbazidas.

Entre os compostos sintetizados, os híbridos [45](#), [46](#) e [47](#) tiveram valores de CIM de 0,50, 0,56 e 0,67  $\mu\text{M}$ , respectivamente, contra *M. tuberculosis* H37RV (Figura 36).<sup>255</sup>

Além disso, foram sintetizados os híbridos de triazóis ligados a nitrofuramida e avaliados quanto à sua atividade antitubercular contra *M. tuberculosis* H37Rv. Os resultados da investigação foram encorajadores, pois composto [48](#) (CIM = 0,25  $\mu\text{g/mL}$ ) mostrou ser muito ativo. A maioria dos outros compostos sintetizados no estudo apresentou baixa citotoxicidade.<sup>256</sup>



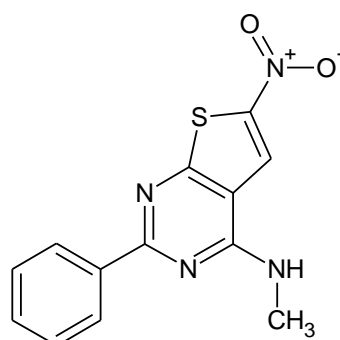
**Figura 37 Agentes antituberculosos contendo grupos nitro.<sup>10</sup>**

As nitrofuramilamidas também são alvos interessantes no desenvolvimento de novos medicamentos antituberculose. Assim foram sintetizados uma série de nitrofuramilamidas e feitos ensaios de screening contra a inibição da mutase UDP-Gal do *M. tuberculosis*. A avaliação biológica indicou que os valores de CIM não se correlacionaram com a inibição da mutase UDP-Gal, indicando que o potencial antitubercular dos compostos pode ser atribuído a um alvo celular primário alternativo. Com base nos resultados in vitro, os compostos promissores foram avaliados posteriormente em estudos in vivo num modelo de ratinho de infecção por tuberculose. Entre os compostos testados, o composto [49](#) demonstrou efeitos antituberculosos substanciais (Figura 37).<sup>257</sup>

*Karabanovich et al.* sintetizaram uma série de estruturas de 1,3,4-oxadiazol e 1,3,4-tiadiazol como substitutos bioisostéricos de tetrazóis 2,5-dissubstituídos que já tinham

mostrado atividade antitubercular. Foi demonstrada uma atividade substancial contra *M. tuberculosis* suscetível a fármacos e multirresistente pela maioria dos compostos, e a substituição 3,5-dinitro foi considerada indispensável para a atividade antimicobacteriana. Além disso, um efeito antimicobacteriano altamente seletivo foi demonstrado pelos compostos, uma vez que não possuíam efeitos inibitórios contra outras bactérias ou fungos. Baixas toxicidades *in vitro* contra quatro linhas de células de mamíferos e em hepatócitos humanos primários isolados, juntamente com a ausência de mutagenicidade estavam entre as conclusões importantes do estudo. O composto ativo (50) revelou um perfil de toxicidade favorável e exibiu uma potência comparável à da rifampicina contra a estirpe de *M. tuberculosis* 18b-Lux não replicante sensível à estreptomicina (Figura 37).<sup>258</sup>

Entre os compostos nitro ativados enzimaticamente recentemente descobertos, um dos mais promissores é a tienopirimidina TP053 (61), ativa contra células replicantes e não replicantes de *M. tuberculosis*.<sup>265</sup> TP053 (61) é ativado por Rv2466c, um membro da superfamília tiol-dissulfeto oxidoreductase, e é responsável pela redução do grupo nitro (Figura 30). No entanto, embora o mecanismo de redução de TP053 (61) por Rv2466c tenha sido extensivamente investigado, seu modo de ação preciso permanece desconhecido. À semelhança de outros compostos nitro, a geração de radicais aniônicos tóxicos ou de outros compostos altamente reativos, como os derivados nitroso ou hidroxilamina resultantes da redução da porção nitro, ainda não foi excluída.<sup>265,266</sup>



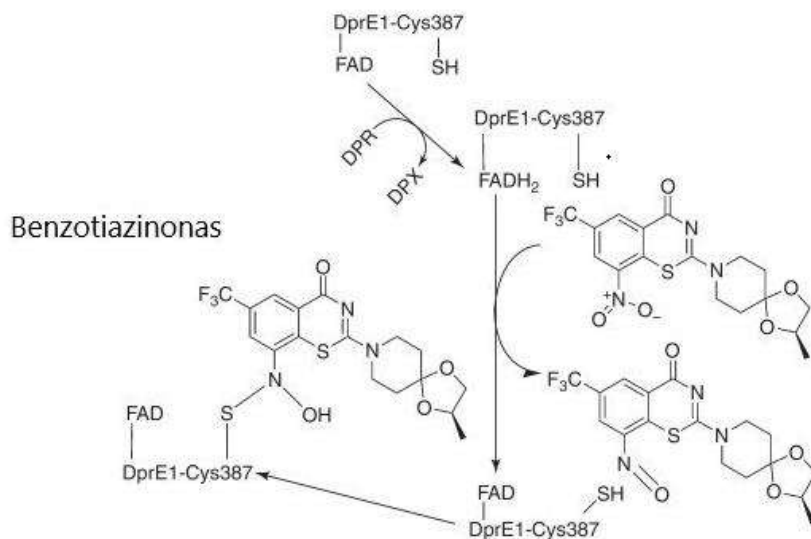
TP053 (61)

### Figura 38 Agentes antituberculosos contendo grupos nitro. Estrutura de TP053

#### 1.2.4.3.2 Agentes antituberculosos ativados pelo DprE1.

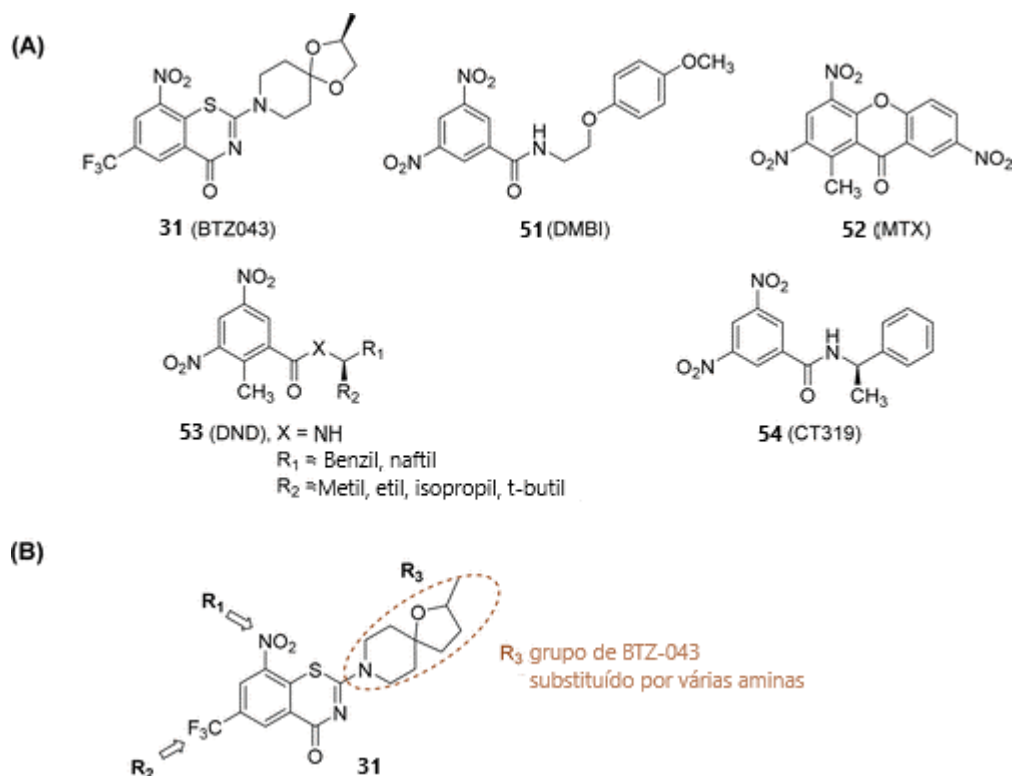
Por outro lado, o mecanismo de ativação da benzotiazinona (BTZ) é muito diferente; uma vez oxidados pelo próprio alvo (DprE1), esses compostos, sendo inibidores

suicidas, ligam-se ao sítio ativo da enzima, bloqueando covalentemente a sua atividade. (Figura 39)



**Figura 39 Mecanismos de ativação e ação de benzotiazinonas.**<sup>77</sup>

A 1,3-Benzotiazin-4-onas (benzotiazinonas, BTZs) mostraram grande atividade contra *M. tuberculosis* in vitro e in vivo. O composto BTZ-043 (31), um análogo da benzotiazina, demonstrou um potencial notável para matar *M. tuberculosis* in vitro, ex vivo e em modelos de ratinho de TB apresenta uma CIM de 1 ng/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv. Este é um perfil de atividade extraordinário quando comparado com as terapêuticas existentes, como a isoniazida (3). As benzotiazinonas (BTZs) são inibidores suicidas da decaprenilfosforil- $\beta$ -d-ribose oxidoreductase DprE1, uma enzima essencial envolvida na biossíntese da parede celular, levando à inibição da enzima pela conversão do grupo nitro em nitroso e uma ligação covalente subsequente com Cys387 de DprE1.<sup>259,260</sup> O estudo também indicou que BTZ-043 (31) e os outros compostos nitroaromáticos (51-54), apesar da sua diversidade estrutural, possuem um mecanismo de ação comum, representando assim uma nova família de agentes antimicobacterianos (Figura 40A).<sup>261</sup>



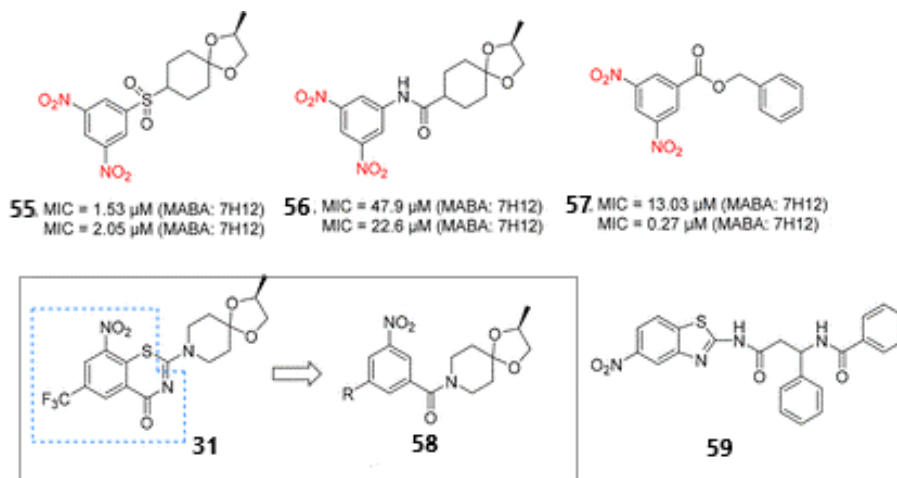
**Figura 40 Benzotiazinonas e heterociclos relacionados como pró-fármacos antituberculosos.<sup>10</sup>**

BTZ-043 (31) pode ser definido como um núcleo BTZ, contendo três substituintes (R1, R2 e R3). As relações estrutura-atividade indicam que as modificações em torno dos grupos R1 e R2, não são benéficas, mas que uma variação na estrutura do grupo R3 é viável. Baseando-se nestes SAR, 170 compostos BTZ foram sintetizados por *Karoli et al.* Os grupos nas posições R1 e R2 permaneceram como NO<sub>2</sub> e CF<sub>3</sub>, e foram feitas várias alterações na posição R3. Os ensaios biológicos levaram à identificação de vários compostos com melhor atividade contra MDR-TB. Além disso, os compostos apresentaram estabilidade microssomal, metabólica e plasmática favorável e baixa toxicidade (Figura 40B).<sup>262</sup>

*Tiwari et al.* desenvolveu vários compostos do tipo sulfonamida nitroaromática, amida reversa<sup>5</sup> e classes de éster de agentes anti-TB, usando uma estratégia de simplificação de estrutura. Os efeitos substanciais do BTZ-043 (31) levaram os autores a explorar a influência de fármacos funcionais, como sulfonamidas, amidas reversas e ésteres ligados a anéis nitroaromáticos, na atividade anti-TB. A avaliação biológica dos compostos sintéticos contra a estirpe H37Rv indicou que sulfonamidas simples e análogos de éster de ácido nitrobenzóico com substituintes dinitro foram mais ativos do que as amidas reversas, mas sua potência não foi próxima à de BTZ043 (31). A diferença no perfil de atividade foi atribuída ao anel aromático deficiente em elétrons nos nitroaromáticos, conforme evidenciado pela atividade dos compostos 55-57. O estudo concluiu que os anéis aromáticos

<sup>5</sup> Amida reversa é uma amida com a ligação amida feita ao contrário.

deficientes em elétrons como, por exemplo, os nitroaromáticos foram fundamentais para potencializar a bioatividade (Figura 41).<sup>198</sup>



**Figura 41 Benzotiazinonas e heterociclos relacionados como pró-fármacos antituberculosos.<sup>10</sup>**

Tiwari *et al.* desenvolveu e sintetizou novos agentes anti-TB, sucessores de BTZs e outros compostos nitroaromáticos. Os compostos sintetizados apresentaram potencial antitubercular promissor e não eram tóxicos. Uma revelação importante do estudo foi a suscetibilidade do carbono aromático não substituído entre os grupos que retiram elétrons dos compostos [58](#) e [31](#) à substituição por nucleófilos como tiolatos, cianetos e até hidretos. Isso mediou a redução não enzimática dos grupos nitro aos correspondentes intermediários nitroso por adição ao carbono aromático deficiente em elétrons não substituído presente nesses compostos. No geral, o estudo apresenta um possível mecanismo alternativo com o qual os compostos nitroaromáticos podem exercer efeitos antituberculosos. O mecanismo prossegue via tiol (ate) de cisteína ou uma fonte de hidreto no sítio ativo de DprE1, desencadeando uma redução do grupo nitro semelhante aos procedimentos de reação na reação de von Richter aos intermediários nitroso, iniciando assim a inibição de DprE1 (Figura 41).<sup>264</sup>

### 1.2.5 Objetivo do trabalho

Estudos recentes com o objetivo de encontrar pró-fármacos ativas contra as formas resistentes e multirresistentes do *M. tuberculosis*<sup>3-5,37</sup> mostraram que alguns ácidos fracos possuíam atividade significativa sobre o *M. tuberculosis* e que álcoois de cadeia longa (LCA) empregues em pró-fármacos como transportadores também possuíam atividade relevante. Surgiu então a ideia de obter pró-fármacos mútuos contendo os dois componentes unidos por de uma ligação éster. Esses compostos podem ter potencialmente uma ação sinérgica e uma melhora na penetração das micobactérias devido à sua lipofilia adequada.

Devido ao fato dos derivados de ácidos fracos contendo o grupo nitro terem sido especialmente interessantes em termos de atividade e toxicidade,<sup>9,10,21</sup> esta tese se concentrará na obtenção de derivados entre ácidos fracos contendo grupos nitro e LCA, ampliando a gama de ácidos fracos já

obtidos, no estudo da sua atividade, estabilidade e ativação e na exploração do mecanismo de ação dos compostos. Paralelamente, também foi decidido incluir no estudo pró-fármacos de amida, visto que as amidas são conhecidas por serem significativamente mais resistentes à hidrólise do que os ésteres.

Este trabalho teve como principal objetivo a síntese de ésteres/amidas derivados de ácidos fracos contendo o grupo nitro e álcoois/aminas com cadeia longa. Foram sintetizados ésteres e amidas de ácido benzóico, ácido 4-nitrobenzóico, ácido 3,5-dinitrobenzóico e ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico contendo comprimentos de cadeia linear de 4 a 16 átomos de carbono.

Para além de síntese o trabalho compreendeu a avaliação da estabilidade dos compostos sintetizados em tampão fosfato a pH 7,4, em plasma humano e em homogenato de micobactéria.

Com base nos estudos de estabilidade e atividade, pretende-se escolher compostos que sejam ativos nas micobactérias, e ao mesmo tempo, apresentem uma hidrólise lenta em plasma e uma ativação rápida na presença das micobactérias. Os compostos que apresentarem estas características poderão ser considerados potenciais pró-fármacos para o tratamento da tuberculose.

## 2 Resultados e Discussão dos Resultados

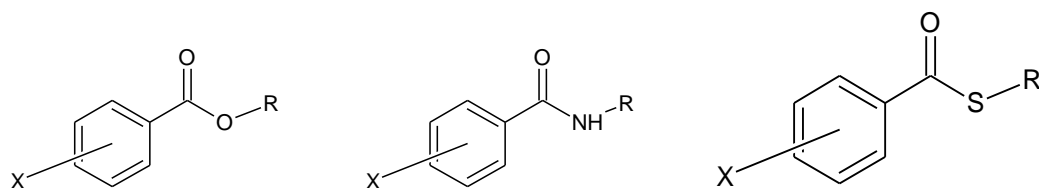
### 2.1 Compostos testados

Estudaram-se 20 ésteres (Tabela 3) obtidos a partir do ácido benzóico (BA) ou de outros ácidos benzóicos substituídos e que foram divididos em 4 séries. A série **1** corresponde aos derivados benzoatos, a série **2** corresponde aos derivados 4-nitrobenzoatos, a série **3** corresponde aos derivados 3,5-dinitrobenzoatos e a série **4** corresponde aos derivados 3-nitro-5-trifluorometilbenzoatos. Na série 1, sintetizaram-se os ésteres **1a**, **1b**, **1c** e **1e**; na série 2, os ésteres **2b** e **2c**; na série 3, os ésteres **3d** e **3g** na série 4, os ésteres **4a**, **4b**, **4c**, **4d** e **4e**. Os ésteres **2a**, **2e**, **3a**, **3b**, **3c**, **3e** e **3f** pois existiam em laboratório. Os ésteres sintetizados de novo encontram-se na Tabela 4.

Também se estudaram e sintetizaram 20 amidas derivadas dos mesmos ácidos anteriormente descritos. A série **5** corresponde aos derivados benzamidas, a série **6** corresponde aos derivados 4-nitrobenzamidas, a série **7** corresponde aos derivados 3,5-dinitrobenzamidas e a série **8** corresponde aos derivados 3-nitro-5-trifluorometilbenzamida (Tabela 5).

Foram também estudados e sintetizados, 12 tioésteres. A série **9** corresponde aos derivados tiobenzoatos, a série **10** corresponde aos derivados 4-nitrotiobenzoatos, a série **11** corresponde aos derivados 3,5-dinitrotiobenzoatos e finalmente a série **12** corresponde aos derivados 3-nitro-5-(trifluorometil)tiobenzoatos. A estrutura de todos os compostos estudados encontra-se na Tabela 3

**Tabela 3** Estrutura molecular dos 20 ésteres, 20 amidas e 12 tioésteres de derivados dos ácidos fracos estudados.



**1**, X= H

**2**, X= 4-NO<sub>2</sub>

**3**, X= 3,5-NO<sub>2</sub>

**4**, X= 3-NO<sub>2</sub>, 5-CF<sub>3</sub>

**5**, X= H

**6**, X= 4-NO<sub>2</sub>

**7**, X= 3,5-NO<sub>2</sub>

**8**, X= 3-NO<sub>2</sub>, 5-CF<sub>3</sub>

**9**, X= H

**10**, X= 4-NO<sub>2</sub>

**11**, X= 3,5-NO<sub>2</sub>

**12**, X= 3-NO<sub>2</sub>, 5-CF<sub>3</sub>

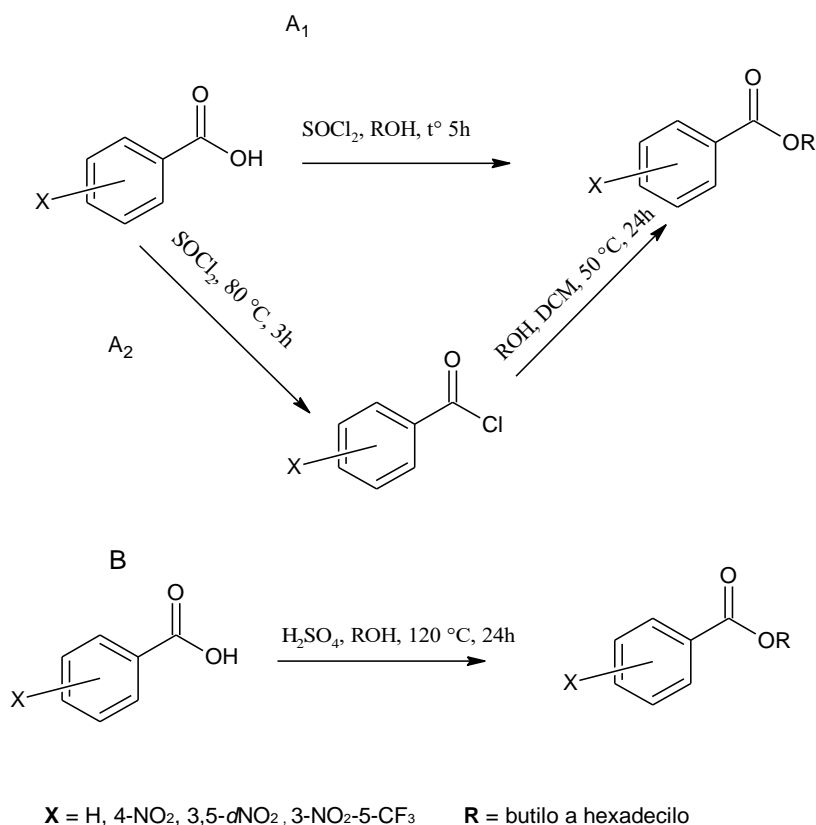
| ésteres   | X | R                               | amidas    | X | R                               | tioésteres | X | R                               |
|-----------|---|---------------------------------|-----------|---|---------------------------------|------------|---|---------------------------------|
|           | H | H                               |           | H |                                 |            | H |                                 |
| <b>1a</b> |   | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | <b>5a</b> |   | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | <b>9a</b>  |   | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |
| <b>1b</b> |   | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | <b>5b</b> |   | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  |            |   |                                 |
| <b>1c</b> |   | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | <b>5c</b> |   | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | <b>9c</b>  |   | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |
| <b>1e</b> |   | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | <b>5e</b> |   | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | <b>9e</b>  |   | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |

| ésteres   | X                                    | R                               | amidas    | X                                    | R                               | tioésteres | X                                    | R                               |
|-----------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------|--------------------------------------|---------------------------------|------------|--------------------------------------|---------------------------------|
|           | 4-NO <sub>2</sub>                    | H                               |           | 4-NO <sub>2</sub>                    |                                 |            | 4-NO <sub>2</sub>                    |                                 |
| <b>2a</b> |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | <b>6a</b> |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | <b>10a</b> |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |
| <b>2b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | <b>6b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  |            |                                      |                                 |
| <b>2c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | <b>6c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | <b>10c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |
| <b>2e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | <b>6e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | <b>10e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |
|           | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 | H                               |           | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 |                                 |            | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 |                                 |
| <b>3a</b> |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | <b>7a</b> |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | <b>11a</b> |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |
| <b>3b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | <b>7b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  |            |                                      |                                 |
| <b>3c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | <b>7c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | <b>11c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |
| <b>3d</b> |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | <b>7d</b> |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> |            |                                      |                                 |
| <b>3e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | <b>7e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | <b>11e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |
| <b>3f</b> |                                      | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> | <b>7f</b> |                                      | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> |            |                                      |                                 |
| <b>3g</b> |                                      | C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> | <b>7g</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |            |                                      |                                 |
|           | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> | H                               |           | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> |                                 |            | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> |                                 |
| <b>4a</b> |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | <b>8a</b> |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | <b>12a</b> |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |
| <b>4b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | <b>8b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  |            |                                      |                                 |
| <b>4c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | <b>8c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | <b>12c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |
| <b>4d</b> |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | <b>8d</b> |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> |            |                                      |                                 |
| <b>4e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | <b>8e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | <b>12e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |

Foram realizados estudos de atividade antimicobacteriana e citotoxicidade para todos os compostos mencionados, bem como estudos de estabilidade em tampão fosfato e plasma humano. Além disso, foram realizados estudos de ativação pelas enzimas micobacterianas em homogenato de *M. smegmatis*.

## 2.2 Síntese e Purificação dos Ésteres

Neste trabalho, os ésteres foram sintetizados partindo dos ácidos correspondentes, os quais, após conversão nos respectivos cloretos de ácido (Método A) ou após a protonação do ácido carboxílico (Método B) reagiram com diferentes álcoois (butanol a hexadecanol). Recorrendo ao Método A foram testados duas condições de reação diferentes: no método A1, o ácido correspondente é dissolvido no álcool correspondente, após o qual é adicionado cloreto de tionilo. A reação ocorre sob refluxo durante 5h (temperatura); no método A2, o cloreto de ácido correspondente é formado por refluxo a 88 °C durante 3 horas. Depois da formação do cloreto de ácido é adicionado o álcool correspondente e diclorometano (DCM) mantendo-se a mistura reacional sob refluxo durante 24h (Figura 42). Pelo Método B, realizaram-se reações de esterificação de Fisher usando ácido sulfúrico como catalisador (Figura 42).



**Figura 42** Esquema geral das sínteses dos ésteres de derivados de ácidos fracos.

### 2.2.1 Ésteres de derivados do ácido benzóico.

Todos os ésteres derivados de ácido benzóico foram sintetizados pelo método A1, exceto para os compostos **1b** e **3g**. O composto **3g** pelo método A1 formou vários produtos e por consequência não era possível purificá-lo. A síntese de composto **3g** foi repetido por método A2. Todos os ésteres se encontrarem puros de acordo com a caracterização RMN. Na Tabela 4 encontram-se descritos os rendimentos e pontos de fusão dos compostos sintetizados.

**Tabela 4** Sumário das características e rendimentos obtidos dos ésteres de derivados do ácido benzóico.

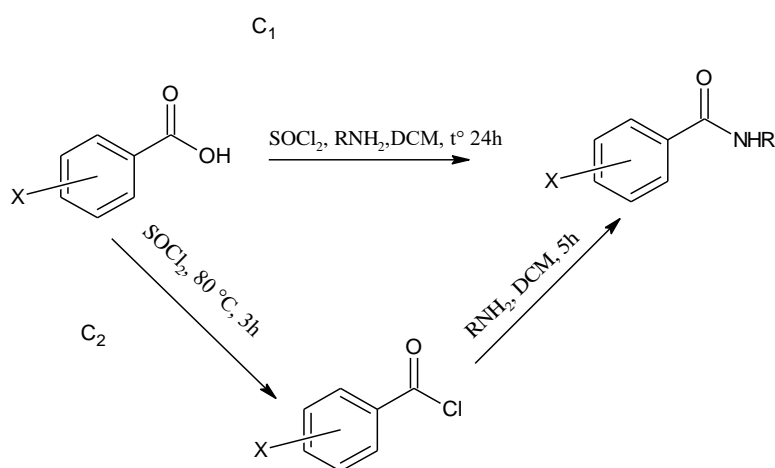
| Composto  | X                                    | R                               | Método | Aspeto         | Rendimento / $\eta$ (%) | Ponto de Fusão (°C) |
|-----------|--------------------------------------|---------------------------------|--------|----------------|-------------------------|---------------------|
| <b>1a</b> | H                                    | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | A1     | Óleo Amarelo   | 79                      | -                   |
| <b>1b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | A2     | Óleo Amarelo   | 51                      | -                   |
| <b>1c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | A1     | Óleo Amarelo   | 86                      | -                   |
| <b>1e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | A1     | Óleo Amarelo   | 72                      | -                   |
| <b>2b</b> | 4-NO <sub>2</sub>                    | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | A1     | Óleo Amarelo   | 70                      | -                   |
| <b>2c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | A1     | Óleo Amarelo   | 88                      | -                   |
| <b>3d</b> | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | A1     | Sólido Amarelo | 99                      | 42-44               |
| <b>3g</b> |                                      | C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> | A2     | Sólido Amarelo | 28                      | 72-74               |
| <b>4a</b> | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | A1     | Óleo Amarelo   | 80                      | -                   |
| <b>4b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | A1     | Óleo Amarelo   | 84                      | -                   |
| <b>4c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | A1     | Óleo Amarelo   | 51                      | -                   |
| <b>4d</b> |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | A1     | Sólido Branco  | 84                      | 40-42               |
| <b>4e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | A1     | Sólido Branco  | 95                      | 44-46               |

Os ésteres foram obtidos com rendimentos que variaram entre 28% e 99%. O baixo rendimento de composto **3g** pode ser justificado por dificuldades na purificação do composto.

## 2.3 Síntese e Purificação das Amidas

Na série 5, sintetizaram-se as amidas **5a**, **5b**, **5c** e **5e**; na série 6, as amidas **6a**, **6b**, **6c** e **6e**; na série 7, as amidas **7a**, **7b**, **7c**, **7d**, **7e**, **7f** e **7g** e na série 8, as amidas **8a**, **8b**, **8c**, **8d** e **8e**.

As amidas foram sintetizados partindo dos ácidos correspondentes, os quais, após conversão nos respectivos cloretos de ácido (Método C) reagiram com diferentes aminas (butilamina a hexadecilamina). Recorrendo ao Método C foram testadas duas condições de reação diferentes: C1, onde o ácido correspondente é dissolvido em DCM, após o qual a amina e cloreto de tionilo são adicionados à mistura. A reação ocorre sob refluxo a 50 °C durante 24h; no método C2 o primeiro passo é igual ao passo 1 do método A2 da esterificação, o cloreto de ácido é formado sob refluxo a 88 °C durante 3 horas. Depois a amina reage à temperatura ambiente durante 5h (Figura 43).



X = H, 4-NO<sub>2</sub>, 3,5-dNO<sub>2</sub>, 3-NO<sub>2</sub>-5-CF<sub>3</sub>    R = butilo a hexadecilo

**Figura 43** Esquema geral das sínteses das amidas de derivadas de ácidos fracos.

### 2.3.1 Amidas de derivadas do ácido benzóico.

Todas as amidas derivadas de ácido benzóico foram sintetizados pelo método C2, devido ao fato que o método C1 leva a formação vários compostos o que complica a

purificação. Todos as amidas se encontravam puras de acordo com a caracterização RMN.

As características físicas e os rendimentos obtidos encontram-se na Tabela 5.

**Tabela 5** Sumário das características e rendimentos obtidos das amidas de derivadas do ácido benzóico.

| Composto  | X                                    | R                               | Método | Aspetto        | Rendimento / $\eta$ (%) | Ponto de Fusão (°C) |
|-----------|--------------------------------------|---------------------------------|--------|----------------|-------------------------|---------------------|
| <b>5a</b> | H                                    | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | C2     | Óleo Amarelo   | 84                      | -                   |
| <b>5b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | C2     | Sólido Amarelo | 85                      | 36-38               |
| <b>5c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | C2     | Sólido Branco  | 80                      | 38-40               |
| <b>5e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | C2     | Sólido Amarelo | 78                      | 66-68               |
| <b>6a</b> | 4-NO <sub>2</sub>                    | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | C2     | Sólido Branco  | 93                      | 104-106             |
| <b>6b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | C2     | Sólido Branco  | 40                      | 84-86               |
| <b>6c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | C2     | Sólido Branco  | 40                      | 82-84               |
| <b>6e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | C2     | Sólido Branco  | 50                      | 96-98               |
| <b>7a</b> | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | C2     | Sólido Branco  | 47                      | 102-104             |
| <b>7b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | C2     | Sólido Amarelo | 59                      | 86-88               |
| <b>7c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | C2     | Sólido Amarelo | 43                      | 72-74               |
| <b>7d</b> |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | C2     | Sólido Amarelo | 41                      | 82-86               |
| <b>7e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | C2     | Sólido Amarelo | 93                      | 94-96               |
| <b>7f</b> |                                      | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> | C2     | Sólido Amarelo | 20                      | 96-98               |
| <b>7g</b> |                                      | C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> | C2     | Sólido Amarelo | 86                      | 102-104             |
| <b>8a</b> | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | C2     | Sólido Amarelo | 84                      | 72-74               |
| <b>8b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | C2     | Sólido Branco  | 30                      | 60-62               |
| <b>8c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | C2     | Sólido Amarelo | 35                      | 70-72               |
| <b>8d</b> |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | C2     | Sólido Branco  | 30                      | 90-94               |
| <b>8e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | C2     | Sólido Branco  | 47                      | 110-112             |

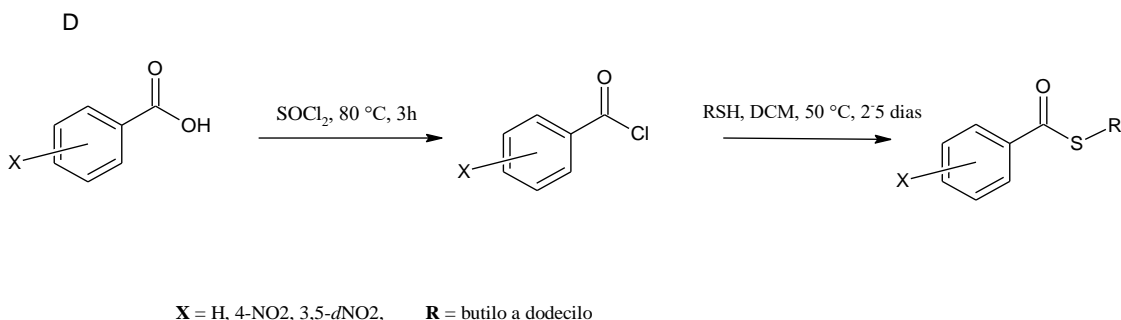
As amidas foram obtidas com rendimentos entre 20% e 93%. O baixo nível de rendimento de composto **7f** pode ser justificado por dificuldades na purificação do composto.

## 2.4 Síntese e Purificação dos Tioésteres

Na série 9, sintetizou-se o tioéster **9a**; na série 10, os tioésteres **10a e 10c** e na série 11, os tioésteres **11a e 11c**.

Os tioésteres foram sintetizados a partir dos ácidos correspondentes, os quais, após conversão nos respetivos cloretos de ácido (Método D) reagiram com diferentes tiois (butiltiol a dodeciltiol). No método de síntese dos tioesteres (Método D) o primeiro passo é igual ao paço 1 do método A2 da esterificação, o cloreto de ácido é formado por refluxo a 88 °C durante 3 horas. Depois disso o tiol reage na sua forma neutra em diclorometano sob refluxo durante 2-5dias (Figura 44).

Este método mostrou-se efetivo na síntese de tioésteres de cadeia curta. Para a síntese de tioésteres de cadeia longa, a reação foi muito lenta e a percentagem do produto obtido foi baixa.



**Figura 44** Esquema geral das sínteses dos tioésteres de derivados de ácidos fracos.

### 2.4.1 Tioésteres de derivados do ácido benzóico.

Todos os tioésteres se encontravam puros por RMN. As características e rendimentos obtidos encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6** Sumário das características e rendimentos obtidos dos tioésteres de derivados do ácido benzóico.

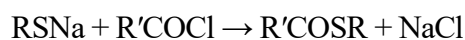
| Composto   | X                             | R                              | Método | Aspetto        | Rendimento / $\eta$ (%) | Ponto de Fusão (°C) |
|------------|-------------------------------|--------------------------------|--------|----------------|-------------------------|---------------------|
| <b>9a</b>  | H                             | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>  | D      | Óleo Amarelo   | 46                      | -                   |
| <b>10a</b> | 4-NO <sub>2</sub>             | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>  | D      | Óleo Amarelo   | 55                      | -                   |
| <b>10c</b> |                               | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> | D      | Óleo Amarelo   | 28                      | -                   |
| <b>11a</b> | 3,5- <i>d</i> NO <sub>2</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>  | D      | Sólido Branco  | 75                      | 50-52               |
| <b>11c</b> |                               | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> | D      | Sólido Amarelo | 15                      | 72-74               |

## 2.5 Conclusões Gerais

Os ésteres derivados de ácido benzóico foram sintetizados com rendimentos superiores a 50% pelo método A1. Os ésteres **1b** e **3g** foram sintetizados pelo método A2 com os rendimentos 51% e 28% respetivamente. O éster **3g** apresentou baixo rendimento devido à necessidade de uma purificação adicional. A purificação foi feita por cromatografia em coluna *flash* usando como eluente o tolueno.

As amidas foram sintetizados com rendimentos superiores a 40% pelo método C2. A amida **6f** apresentou baixo rendimento devido à necessidade de uma purificação adicional. A purificação das amidas **1a,1c,1e, 2a, 2c, 2e, 3a, 3b, 3c, 3d e 3e** foi feita por cromatografia em coluna *flash* com uma mistura de hexano e acetato de etilo 7:3 e 4:1 para amidas **3f e 3g**.

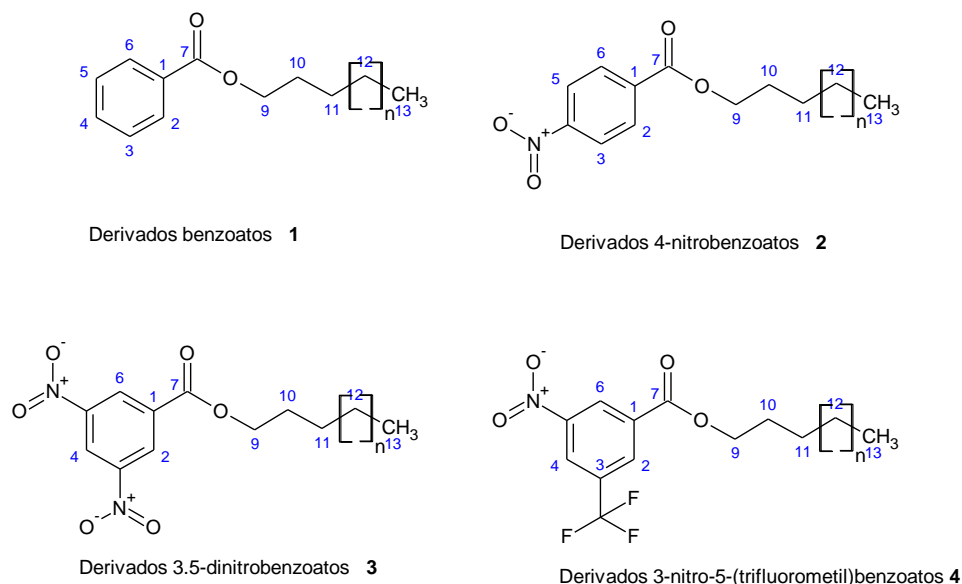
Os tioésteres foram sintetizados com rendimentos superiores a 15% pelo método D. Devido ao fato dos tióis apresentarem baixa reatividade caso se sintetizem estes compostos novamente, o tiol deve ser ativado com um sal de metal alcalino.



## 2.6 Caracterização por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Através da técnica RMN foram obtidos os espectros de próton ( $^1\text{H}$ -RMN) e carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e em metanol deuterado ( $\text{MeOD}$ ).

A partir dos vários espectros obtidos, que estão representados no Anexo A3. , foi possível fazer a identificação de cada um dos compostos sintetizados. Os valores dos desvios químicos dos sinais de próton e de carbono dos espectros de RMN dos compostos testados (Figura 45) encontram-se nas Tabela 7 e Tabela 12



n = 1-12

Figura 45 Representação Estrutural dos ésteres sintetizados.

Tabela 7 Sumários dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de próton presentes nos espectros  $^1\text{H}$ -RMN dos ésteres (s - singuleto alargado, d - duplete, t - tripleto, dd - duplete dupletos, dt - duplete tripletos, td –triplrto dupletos, m - multiplete).

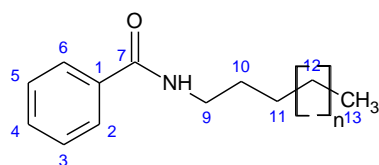
| Composto  | Protões Aromáticos |           |         | Protões da Cadeia Alquílica |         |         |                 | Protão NH |
|-----------|--------------------|-----------|---------|-----------------------------|---------|---------|-----------------|-----------|
|           | C3/5               | C2/6      | C4      | C9                          | C10     | C11-Cx  | CH <sub>3</sub> |           |
| <b>1a</b> | 8.06, m            | 7.46, m   | 7.55, m | 4.35, t                     | 1.77, m | 1.51, m | 1, t            | -         |
| <b>1b</b> | 8.06, m            | 7.46, m   | 7.56, m | 4.33, t                     | 1.78, m | 1.47, m | 0.92, t         | -         |
| <b>1c</b> | 8.06, m            | 7.46, m   | 7.56, m | 4.33, t                     | 1.77, m | 1.45, m | 0.90, t         | -         |
| <b>1e</b> | 8.06, m            | 7.46, m   | 7.56, m | 4.33, t                     | 1.77, m | 1.28, m | 0.90, t         | -         |
| <b>2c</b> | 8.31, AA'          | 8.22, BB' | -       | 4.38, t                     | 1.81, m | 1.31, m | 0.90, t         | -         |

| Composto  | Protões Aromáticos |          |          | Protões da Cadeia Alquílica |         |         |         | Protão NH       |   |
|-----------|--------------------|----------|----------|-----------------------------|---------|---------|---------|-----------------|---|
|           | C3/5               | C2/6     |          | C4                          | C9      | C10     | C11-Cx  | CH <sub>3</sub> |   |
| <b>3d</b> | -                  | 9.17, d  |          | 9.24, t                     | 4.47, t | 1.85, m | 1.28, m | 0.88, t         | - |
| <b>3g</b> | -                  | 9.17, d  |          | 9.24, t                     | 4.47, t | 1.85, m | 1.27, m | 0.89, t         | - |
| <b>4a</b> | -                  | 8.69, dd | 8.63, dd | 9.05, t                     | 4.45, t | 1.83, m | 1.51, m | 0.98, t         | - |
| <b>4b</b> | -                  | 8.68, dd | 8.63, dd | 9.05, t                     | 4.44, t | 1.84, m | 1.40, m | 0.93, t         | - |
| <b>4c</b> | -                  | 8.69, dd | 8.63, dd | 9.05, t                     | 4.44, t | 1.84, m | 1.31, m | 0.89, t         | - |
| <b>4d</b> | -                  | 8.68, dd | 8.63, dd | 9.05, t                     | 4.44, t | 1.83, m | 1.30, m | 0.88, t         | - |
| <b>4e</b> | -                  | 8.69, dd | 8.63, dd | 9.05, t                     | 4.44, t | 1.83, m | 1.29, m | 0.89, t         | - |

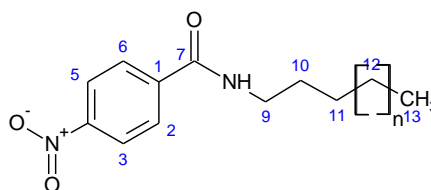
**Tabela 8** Sumários dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de carbono presentes nos espectros <sup>13</sup>C-RMN dos ésteres.

| Composto  | Carbonos Aromáticos |       |       |       |       | Carbonos da Cadeia Alquílica |       |      |        |                 |      |
|-----------|---------------------|-------|-------|-------|-------|------------------------------|-------|------|--------|-----------------|------|
|           | C1                  | C2/6  |       | C3/5  | C4    | C7                           | C9    | C10  | C11-Cx | CH <sub>3</sub> |      |
| <b>1a</b> | 130.6               | 129.5 |       | 128.2 | 132.8 | 166.9                        | 65.0  | 30.8 | 19.3   | 13.8            |      |
| <b>1b</b> | 130.6               | 129.5 |       | 128.3 | 132.8 | 166.8                        | 65.3  | 31.7 | 25.7   | 14.0            |      |
| <b>1c</b> | 130.7               | 129.5 |       | 128.3 | 132.8 | 166.9                        | 65.1  | 31.7 | 26.1   | 14.1            |      |
| <b>1e</b> | 130.7               | 129.5 |       | 128.3 | 132.8 | 166.9                        | 65.3  | 32.2 | 26.0   | 14.1            |      |
| <b>2c</b> | 136.2               | 130.6 |       | 123.5 | 150.5 | 164.9                        | 66.2  | 32.0 | 25.8   | 14.1            |      |
| <b>3d</b> | 134.1               | 129.4 |       | 148.8 | 122.3 | 162.5                        | 67.3  | 31.8 | 25.5   | 14.1            |      |
| <b>3g</b> | 134.2               | 129.4 |       | 148.7 | 122.3 | 162.7                        | 67.1  | 32.0 | 25.9   | 14.1            |      |
| <b>4a</b> | 131,3               | 127.6 | 124.4 | 148.8 | 133.8 | 120.6                        | 163.7 | 66.5 | 30.4   | 21.0            | 13.9 |
| <b>4b</b> | 131,3               | 127.6 | 124.4 | 148.8 | 133.9 | 120.6                        | 163.5 | 66.8 | 31.4   | 26.0            | 14.1 |
| <b>4c</b> | 133.3               | 131.8 | 127.7 | 148.9 | 133.6 | 124.3                        | 163.2 | 66.8 | 31.8   | 25.9            | 14.0 |
| <b>4d</b> | 133,2               | 132.7 | 127.5 | 148.7 | 133.8 | 124.4                        | 163.5 | 66.8 | 31.7   | 25.9            | 14.1 |

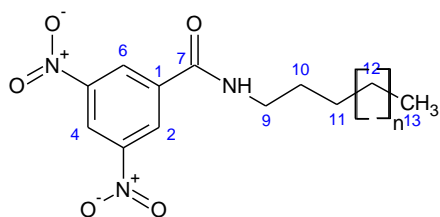
Através da análise de <sup>1</sup>H-RMN e <sup>13</sup>C-RMN, os sinais dos protões aromáticos da série **1** apresentaram multiplicidade **m**, na série **2** multiplicidade do sistema **AA'BB'**, na série **3** multiplicidade **d** ligados ao C4 e **t** ligados ao C2/C6, na série **4** multiplicidade **dd**. Os sinais dos protões da cadeia alquílica em ésteres apresentaram multiplicidade **t** ligados ao C9, **m** ligados ao C10, **m** ligados ao C11-Cx (observou-se a sobreposição dos sinais de protão dos grupos alquilo a partir de três carbonos (multipletos largos)) e **t** nos sinais do grupo metilo. (Tabela 7 e Tabela 8)



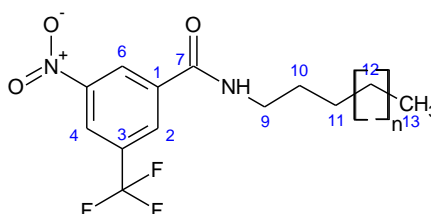
Derivados benzamidas 5



Derivados 4-nitrobenzamidas 6



Derivados 3.5-dinitrobenzamidas 7



Derivados 3-nitro-5-(trifluorometil)benzamidas 8

n = 1-12

Figura 46 Representação Estrutural das amidas sintetizadas.

Tabela 9 Sumários dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de próton presentes nos espectros <sup>1</sup>H-RMN das amidas (s - singuleto alargado, d - duplete, t - tripleto, dd - duplete dupletos, dt - duplete tripletos, td – tripleto dupletos, m - multipletos).

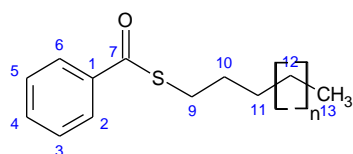
| Composto | Prótons Aromáticos |           |          | Prótons da Cadeia Alquílica |          |         |                 | Próton NH |         |
|----------|--------------------|-----------|----------|-----------------------------|----------|---------|-----------------|-----------|---------|
|          | C3/5               | C2/6      | C4       | C9                          | C10      | C11-Cx  | CH <sub>3</sub> |           |         |
| 5a       | 7.77, m            | 7.44, m   | 7.49, m  | 3.47, td                    | 1.61, m  | 1.43, m | 0.98, t         | 6.15, s   |         |
| 5b       | 7.77, m            | 7.43, m   | 7.48, m  | 3.47, td                    | 1.62, m  | 1.35, m | 0.91, t         | 6.10, s   |         |
| 5c       | 7.77, m            | 7.45, m   | 7.50, m  | 3.47, td                    | 1.62, m  | 1.30, m | 0.89, t         | 6.11, s   |         |
| 5e       | 7.77, m            | 7.45, m   | 7.50, m  | 3.47, td                    | 1.62, m  | 1.33, m | 0.90, t         | 6.11, s   |         |
| 6a       | 8.30, AA'          | 7.93, BB' | -        | 3.50, td                    | 1.66, m  | 1.43, m | 0.99, t         | 6.19, s   |         |
| 6b       | 8.30, AA'          | 7.94, BB' | -        | 3.50, td                    | 1.66, m  | 1.36, m | 0.93, t         | 6.14, s   |         |
| 6c       | 8.22, AA'          | 7.85, BB' | -        | 3.41, td                    | 1.22, m  |         | 0.81, t         | 6.10, s   |         |
| 6e       | 8.30, AA'          | 7.93, BB' | -        | 3.49, td                    | 1.67, m  | 1.28, m | 0.89, t         | 6.17, s   |         |
| 7a       | -                  | 8.96, d   | 9.18, t  | 3.56, td                    | 1.68, m  | 1.47, m | 1.01, t         | 6.40, s   |         |
| 7b       | -                  | 8.96, d   | 9.17, t  | 3.55, td                    | 1.70, m  | 1.42, m | 0.92, t         | 6.42, s   |         |
| 7c       | -                  | 8.95, d   | 9.18, t  | 3.54, td                    | 1.71, m  | 1.32, m | 0.89, t         | 6.37, s   |         |
| 7d       | -                  | 8.96, d   | 9.18, t  | 3.54, td                    | 1.69, m  | 1.29, m | 0.88, t         | 6.39, s   |         |
| 7e       | -                  | 8.96, d   | 9.18, t  | 3.54, td                    | 1.69, m  | 1.29, m | 0.88, t         | 6.40, s   |         |
| 7f       | -                  | 9.01, d   | 9.14, t  | 3.53, td                    | 1.76, m  | 1.26, m | 0.87, t         | 7.07, s   |         |
| 7g       | -                  | 8.95, d   | 9.18, t  | 3.54, td                    | 1.69, m  | 1.26, m | 0.89, t         | 6.36, s   |         |
| 8a       | -                  | 8.54, dd  | 8.34, dd | 8.68, t                     | 3.45, td | 1.59, m | 1.38, m         | 0.91, t   | 6.25, s |
| 8b       | -                  | 8.63, dd  | 8.42, dd | 8.76, t                     | 3.53, td | 1.68, m | 1.39, m         | 0.90, t   | 6.25, s |
| 8c       | -                  | 8.63, dd  | 8.43, dd | 8.76, t                     | 3.53, td | 1.68, m | 1.32, m         | 0.90, t   | 6.27, s |
| 8d       | -                  | 8.63, dd  | 8.42, dd | 8.77, t                     | 3.52, td | 1.69, m | 1.28, m         | 0.89, t   | 6.30, s |
| 8e       | -                  | 8.62, dd  | 8.42, dd | 8.76, t                     | 3.52, td | 1.68, m | 1.29, m         | 0.89, t   | 6.29, s |

**Tabela 10** Sumários dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de carbono presentes nos espectros  $^{13}\text{C}$ -RMN das amidas.

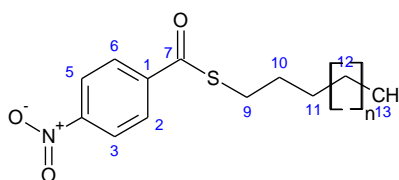
| Composto  | Carbonos Aromáticos |       |       |       |       | Carbonos da Cadeia Alquílica |       |      |        |                 |      |
|-----------|---------------------|-------|-------|-------|-------|------------------------------|-------|------|--------|-----------------|------|
|           | C1                  | C2/6  |       | C3/5  | C4    | C7                           | C9    | C10  | C11-Cx | CH <sub>3</sub> |      |
| <b>5a</b> | 135.0               | 128.5 |       | 126.9 | 131.2 | 167.7                        | 40.3  | 31.8 | 20.2   | 13.8            |      |
| <b>5b</b> | 134.8               | 128.5 |       | 126.9 | 131.2 | 167.6                        | 40.3  | 31.7 | 26.6   | 14.0            |      |
| <b>5c</b> | 134.9               | 128.5 |       | 126.9 | 131.2 | 167.5                        | 40.3  | 32.0 | 27.1   | 14.1            |      |
| <b>5e</b> | 134.9               | 128.5 |       | 126.8 | 131.3 | 167.5                        | 40.3  | 31.9 | 27.0   | 14.1            |      |
| <b>6a</b> | 140.6               | 128.1 |       | 123.7 | 149.4 | 165.6                        | 40.3  | 31.9 | 20.1   | 13.7            |      |
| <b>6b</b> | 140.5               | 128.1 |       | 123.8 | 149.6 | 165.5                        | 40.5  | 31.3 | 26.7   | 14.0            |      |
| <b>6c</b> | 140.5               | 128.1 |       | 123.8 | 149.6 | 165.5                        | 40.7  | 31.6 | 26.8   | 14.1            |      |
| <b>6e</b> | 140.5               | 128.1 |       | 123.8 | 149.6 | 165.5                        | 40.7  | 31.6 | 26.8   | 14.1            |      |
| <b>7a</b> | 138.4               | 127.2 |       | 148.6 | 121.0 | 162.9                        | 40.7  | 31.6 | 20.0   | 13.7            |      |
| <b>7b</b> | 138.4               | 127.2 |       | 148.9 | 121.0 | 163.0                        | 40.9  | 31.4 | 26.8   | 14.0            |      |
| <b>7c</b> | 138.2               | 127.2 |       | 148.9 | 121.0 | 162.7                        | 40.9  | 31.8 | 26.9   | 14.1            |      |
| <b>7d</b> | 138.2               | 127.2 |       | 148.7 | 120.9 | 163.0                        | 41.1  | 31.9 | 27.1   | 14.1            |      |
| <b>7e</b> | 138.4               | 127.2 |       | 148.9 | 120.9 | 162.7                        | 41.0  | 31.9 | 26.9   | 14.1            |      |
| <b>7f</b> | 138.6               | 127.5 |       | 148.9 | 121.3 | 162.9                        | 41.4  | 32.1 | 27.3   | 14.4            |      |
| <b>7g</b> | 138.2               | 127.1 |       | 148.9 | 121.0 | 162.9                        | 40.9  | 32.1 | 26.9   | 14.1            |      |
| <b>8a</b> | 130.1               | 125.1 | 123.0 | 148.6 | 137.9 | 120.7                        | 164.2 | 40.4 | 31.7   | 26.1            | 13.8 |
| <b>8b</b> | 130.0               | 124.7 | 122.8 | 148.3 | 137.9 | 120.9                        | 163.7 | 40.7 | 31.4   | 26.8            | 14.0 |
| <b>8c</b> | 123.0               | 124.7 | 122.8 | 148.3 | 137.9 | 122.4                        | 163.7 | 40.9 | 31.6   | 29.5            | 14.0 |
| <b>8d</b> | 132.9               | 130.0 | 124.8 | 148.4 | 137.6 | 123.0                        | 163.9 | 40.9 | 31.7   | 29.4            | 14.0 |
| <b>8e</b> | 132.9               | 130.0 | 124.8 | 148.5 | 137.8 | 123.0                        | 163.8 | 40.9 | 31.4   | 29.6            | 13.5 |

Através da análise de  $^1\text{H}$ -RMN e  $^{13}\text{C}$ -RMN, os sinais dos prótons aromáticos da série **5** apresentaram multiplicidade **m**, na série **6** multiplicidade do sistema **AA'BB'**, na série **7** multiplicidade **d** ligados ao C4 e **t** ligados ao C2/C6, na série **8** multiplicidade **dd**. Os sinais dos prótons da cadeia alquílica em amidas apresentaram multiplicidade **td** ligados ao C9, **m** ligados ao C10, **m** ligados ao C11-Cx (observou-se a sobreposição dos sinais de próton dos grupos alquila a partir de três carbonos (multipletos largos) e **t** nos sinais do grupo metilo. As amidas apresentaram **s** largos correspondentes ao NH. (Tabela 9 e

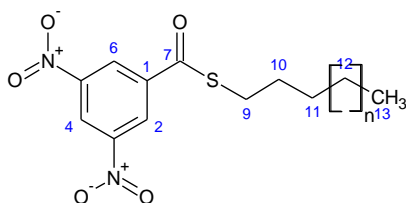
Tabela 10)



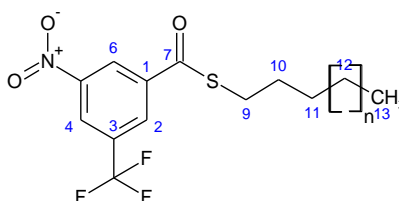
Derivados tioenzoatos **9**



Derivados 4-nitrotioenzoatos **10**



Derivados 3,5-dinitrotioenzoatos **11**



Derivados 3-nitro-5-(trifluorometil)tioenzoatos **12**

n = 1-12

**Figura 47** Representação Estrutural dos tioésteres sintetizados.

**Tabela 11** Sumários dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de próton presentes nos espectros  $^1\text{H-RMN}$  dos tioésteres (s - singuleto alargado, d - duplete, t - tripleto, dd - duplete dupletos, dt - duplete tripletos, td – tripleto dupletos, m - multiplete).

| Composto   | Protões Aromáticos |           |         | Protões da Cadeia Alquílica |         |         |                 | Protão NH |
|------------|--------------------|-----------|---------|-----------------------------|---------|---------|-----------------|-----------|
|            | C3/5               | C2/6      | C4      | C9                          | C10     | C11-Cx  | CH <sub>3</sub> |           |
| <b>9a</b>  | 7.99, m            | 7.47, m   | 7.57, m | 3.10, t                     | 1.67, m | 1.48, m | 0.97, t         | -         |
| <b>10a</b> | 8.23, AA'          | 8.04, BB' | -       | 3.06, t                     | 1.61, m | 1.41, m | 0.90, t         | -         |
| <b>10c</b> | 8.31, AA'          | 8.13, BB' | -       | 3.14, t                     | 1.71, m | 1.30, m | 0.89, t         | -         |
| <b>11a</b> | -                  | 9.10, d   | 9.24, t | 3.23, t                     | 1.74, m | 1.5, m  | 1.00, t         | -         |
| <b>11c</b> | -                  | 9.10, d   | 9.24, t | 3.22, t                     | 1.75, m | 1.29, m | 0.89, t         | -         |

**Tabela 12** Sumários dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de carbono presentes nos espectros  $^{13}\text{C-RMN}$  dos tioésteres.

| Composto   | Carbonos Aromáticos |       |       |       | Carbonos da Cadeia Alquílica |      |      |        |                 |
|------------|---------------------|-------|-------|-------|------------------------------|------|------|--------|-----------------|
|            | C1                  | C2/6  | C3/5  | C4    | C7                           | C9   | C10  | C11-Cx | CH <sub>3</sub> |
| <b>9a</b>  | 134.2               | 128.6 | 127.1 | 137.7 | 192.2                        | 31.8 | 28.7 | 22.2   | 12.9            |
| <b>10a</b> | 141.8               | 128.2 | 123.8 | 150.7 | 190.8                        | 31.5 | 29.5 | 22.0   | 13.5            |
| <b>10c</b> | 142.0               | 128.2 | 123.8 | 150.5 | 190.8                        | 31.9 | 29.9 | 22.6   | 14.1            |
| <b>11a</b> | 140.1               | 126.9 | 148.9 | 122.2 | 188.1                        | 30.9 | 30.0 | 22.1   | 13.6            |
| <b>11c</b> | 140.1               | 126.9 | 148.7 | 122.2 | 188.3                        | 30.9 | 30.0 | 22.1   | 14.1            |

Através da análise de  $^1\text{H-RMN}$  e  $^{13}\text{C-RMN}$ , os sinais dos protões aromáticos da série 9 apresentaram multiplicidade **m**, na série 10 multiplicidade do sistema **AA'BB'**, na série 11 multiplicidade **d** ligados ao C4 e **t** ligados ao C2/C6, na série 12 multiplicidade **dd**. Os sinais dos protões da cadeia alquílica em tioésteres apresentaram multiplicidade **t** ligados ao C9, **m** ligados ao C10, **m** ligados ao C11-Cx (observou-se a sobreposição

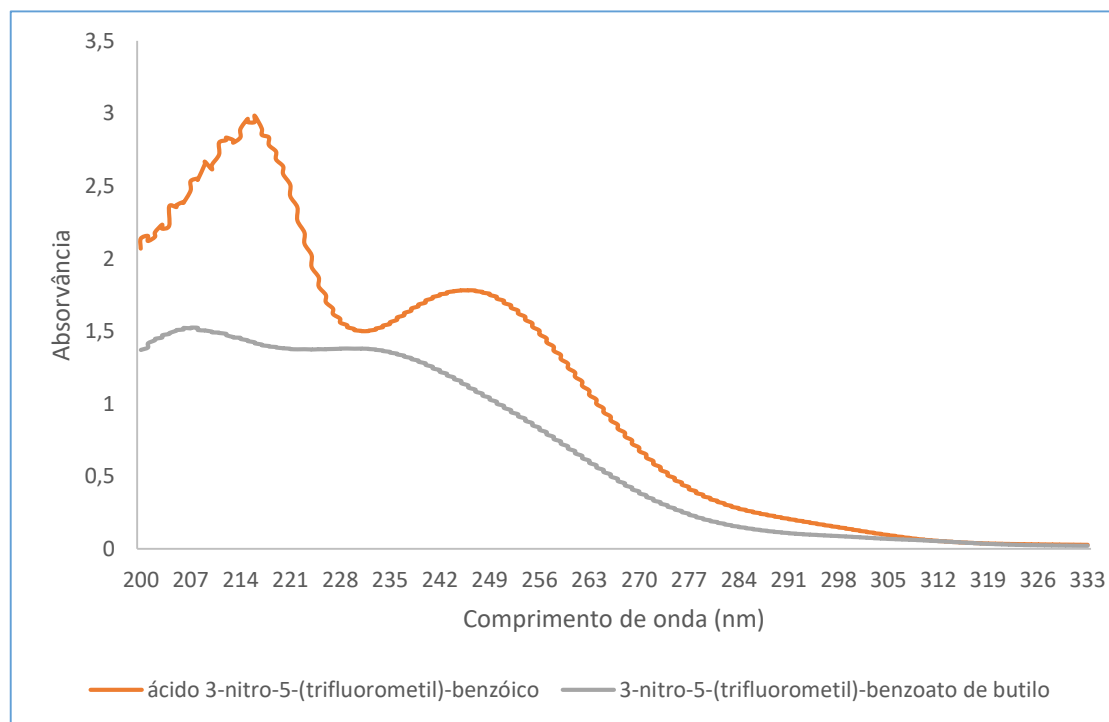
dos sinais de próton dos grupos alquila a partir de três carbonos (multipletos largos) e t nos sinais do grupo metilo. ( Tabela 11 e Tabela 12)

## 2.7 Estudos de Estabilidade dos Ésteres, Tioésteres e Amidas de derivados de Ácido Benzóico

Os compostos sintetizados foram estudados quanto à sua estabilidade química e enzimática. Foram para isso feitos estudos cinéticos em tampão fosfato a pH 7,4 (para avaliar a reação de hidrólise química), em plasma humano (para avaliar a estabilidade em plasma) e em homogenato de *M.smegmatis* (para avaliar a potencial reação de ativação enzimática em micobactérias). A monitorização das reações e a detecção dos compostos e dos seus metabolitos foi feita através da técnica cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em coluna de fase reversa acoplada a um detetor de UV. Para o efeito foram previamente realizados os espectros de absorção no UV dos compostos e os seus metabolitos.

Na Figura 48 encontra-se um exemplo dos espectros de absorção para o composto **4a** e respetivo ácido carboxílico.

Na Tabela 13 encontra-se um resumo dos comprimentos de onda e tempos de retenção de todos os compostos e metabolitos analisados.



**Figura 48. Espectro UV obtido para o ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoato de butilo.**

**Tabela 13** Tempos de retenção (tR) e comprimentos de onda de absorção ( $\lambda$ ) dos compostos testados nos estudos de HPLC no eluente acetonitrilo: água (80:20) com dihidrogenofosfato de potássio (0,001 mol/dm<sup>3</sup> e 0,002% (v/v) de ácido fosfórico (85%)). tR em minutos e  $\lambda$  em nanômetros.

| ésteres | X                                    | R                               | Comprimento de onda( $\lambda$ )/ nm | Tempo de retenção (tR)/ min     | amidas | X                                    | R                               | Comprimento de onda( $\lambda$ )/ nm | Tempo de retenção (tR)/ min | tioésteres | X                                    | R                               | Comprimento de onda( $\lambda$ )/ nm | Tempo de retenção (tR)/ min |
|---------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|--------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|------------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
|         | H                                    | H                               | 230                                  | 2,13                            |        | H                                    |                                 | 230                                  |                             | 9a         | H                                    |                                 | 230                                  |                             |
| 1a      |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |                                      | 9,85                            | 5a     |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |                                      | 3,43                        |            |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |                                      | 14,6                        |
| 1b      |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  |                                      | 11,1                            | 5b     |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  |                                      | 3,76                        |            |                                      | -                               |                                      | -                           |
| 1c      |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |                                      | 16,8                            | 5c     |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |                                      | 6,50                        |            |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |                                      | 23,0                        |
| 1e      |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |                                      | 26,7                            | 5e     |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |                                      | 16,7                        |            |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |                                      | 32,7                        |
|         | 4-NO <sub>2</sub>                    | H                               | 255                                  | 2,48                            |        | 4-NO <sub>2</sub>                    |                                 | 255                                  |                             | 10a        | 4-NO <sub>2</sub>                    |                                 | 255                                  |                             |
| 2a      |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |                                      | 9,46                            | 6a     |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |                                      | 4,52                        |            |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |                                      | 13,3                        |
| 2b      |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  |                                      | 10,1                            | 6b     |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  |                                      | 5,76                        |            |                                      | -                               |                                      | -                           |
| 2c      |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |                                      | 14,7                            | 6c     |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |                                      | 6,79                        |            |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |                                      | 22,2                        |
| 2e      |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |                                      | 21,8                            | 6e     |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |                                      | 16,8                        |            |                                      | -                               |                                      | -                           |
|         | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 | H                               | 230                                  | 2,14                            |        | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 |                                 | 230                                  |                             | 11a        | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 |                                 | 230                                  |                             |
| 3a      |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |                                      | 6,15                            | 7a     |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |                                      | 3,88                        |            |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |                                      | 12,7                        |
| 3b      |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  |                                      | 8,41                            | 7b     |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  |                                      | 4,02                        |            |                                      | -                               |                                      | -                           |
| 3c      |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |                                      | 13,2                            | 7c     |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |                                      | 7,59                        |            |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |                                      | 20,0                        |
| 3d      |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> |                                      | 15,9                            | 7d     |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> |                                      | 12,0                        |            |                                      | -                               |                                      | -                           |
| 3e      |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |                                      | 21,7                            | 7e     |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |                                      | 19,4                        |            |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |                                      | 23,3                        |
| 3f      |                                      | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> |                                      | 34,5                            | 7f     |                                      | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> |                                      | 33,5                        |            |                                      | -                               |                                      | -                           |
| 3g      |                                      | C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> |                                      | 45,9                            | 7g     |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |                                      | 44,5                        |            |                                      | -                               |                                      | -                           |
|         | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> | H                               | 240                                  | 3,38                            |        | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> |                                 | 240                                  |                             | 12a        | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> |                                 | 240                                  |                             |
| 4a      |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |                                      | 5,12                            | 8a     |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |                                      | 5,69                        |            |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   |                                      | 8,9                         |
| 4b      |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  |                                      | 13,1                            | 8b     |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  |                                      | 6,94                        |            |                                      | -                               |                                      | -                           |
| 4c      |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |                                      | 15,6                            | 8c     |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |                                      | 10,8                        |            |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |                                      | 15,2                        |
| 4d      |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> |                                      | 18,7                            | 8d     |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> |                                      | 17,3                        |            |                                      | -                               |                                      | -                           |
| 4e      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>      | 30,3                            | 8e                                   | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 29,1   | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>      | 34,7                            |                                      |                             |            |                                      |                                 |                                      |                             |

A determinação das concentrações dos compostos e os seus metabolitos foi feita recorrendo ao uso de curvas de calibração. (A4. )

### **2.7.1 Estabilidade em tampão de fosfato pH 7,4**

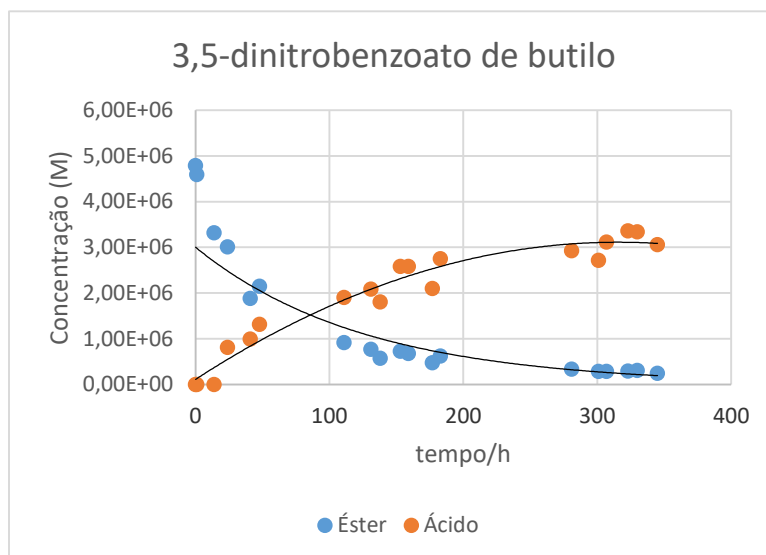
A hidrólise química foi avaliada em tampão fosfato a pH fisiológico (7.4) para determinar a sua influência nos estudos enzimáticos. Dado que se observou que a conversão de éster/amida com cadeias longas (C<sub>8</sub>-C<sub>16</sub>) no ácido não é quantitativamente equivalente, o que pode ser relacionado com a alta lipofilia e formação de precipitados, todos os cálculos foram realizados pela formação de ácido. Preparou-se tampão fosfato com concentração (Ct) 0,01 M, força iónica (I) 0,15 M e pH 7,4. A estabilidade de todos os compostos foi avaliada no tampão mencionado diluído com 20% de acetonitrilo (ACN) e à temperatura de 37°C durante duas semanas. Os ensaios foram realizados em triplicado.

A partir da determinação das concentrações de ácido calcularam-se as percentagens de degradação de éster/amida (A5. ) como constam na Tabela 14.

Tabela 14 Resultados obtidos dos valores de percentagem de degradação do éster ou amida, ao fim de 14 dias, em tampão de fosfato pH 7,4.

| ésteres   | X  | R                               | Degradação (%) |     |     |      |      | amid<br>as | X  | R                               | Degradação (%) |     |     |      |      | tioéste<br>res | X  | R                               | Degradação (%) |     |     |      |      |
|-----------|--|---------------------------------|----------------|-----|-----|------|------|------------|--|---------------------------------|----------------|-----|-----|------|------|----------------|--|---------------------------------|----------------|-----|-----|------|------|
|           |  |                                 | 24h            | 48h | 72h | 168h | 332h |            |  |                                 | 24h            | 48h | 72h | 168h | 332h |                |  |                                 | 24h            | 48h | 72h | 168h | 332h |
| <b>1a</b> | H  | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0              | 0   | 0   | 1    | 2    | <b>5a</b>  | H  | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    | <b>9a</b>      | H  | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    |
| <b>1c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    | <b>5c</b>  |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    | <b>9c</b>      |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 0   | 0   | 0    | 1    |
| <b>1e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    | <b>5e</b>  |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    | <b>9e</b>      |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    |
| <b>2a</b> | 4-NO <sub>2</sub>                            | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0              | 1   | 1   | 2    | 4    | <b>6a</b>  | 4-NO <sub>2</sub>                            | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    | <b>10a</b>     | 4-NO <sub>2</sub>                            | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0              | 1   | 1   | 2    | 4    |
| <b>2c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 1   | 1   | 3    | 6    | <b>6c</b>  |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    | <b>10c</b>     |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 0   | 0   | 0    | 1    |
| <b>2e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 0   | 1    | 1    | <b>6e</b>  |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    | <b>10e</b>     |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    |
| <b>3a</b> | 3,5-<br>dNO <sub>2</sub>                     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 10             | 14  | 18  | 40   | 65   | <b>7a</b>  | 3,5-<br>dNO <sub>2</sub>                     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    | <b>11a</b>     | 3,5-<br>dNO <sub>2</sub>                     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 3              | 6   | 9   | 19   | 35   |
| <b>3c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 0   | 1   | 2    | 3    | <b>7c</b>  |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    | <b>11c</b>     |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 0   | 1   | 1    | 3    |
| <b>3e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 1   | 1    | 2    | <b>7e</b>  |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    | <b>11e</b>     |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 0   | 0    | 1    |
| <b>4a</b> | 3-<br>NO <sub>2</sub> -<br>5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 5              | 12  | 16  | 35   | 60   | <b>8a</b>  | 3-<br>NO <sub>2</sub> -<br>5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    | <b>12a</b>     | 3-<br>NO <sub>2</sub> -<br>5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 1              | 3   | 4   | 10   | 18   |
| <b>4c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 1   | 1   | 3    | 6    | <b>8c</b>  |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    | <b>12c</b>     |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 1   | 1   | 2    | 3    |
| <b>4e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 1              | 2   | 3   | 6    | 11   | <b>8e</b>  |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    | <b>12e</b>     |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 0   | 0    | 0    |

Observou-se que todos os compostos testados apresentam estabilidade elevada em PBS a pH7.4. Os ésteres degradam mais rapidamente do que os tioésteres. As amidas por sua vez não apresentam degradação relevante durante 345h (Tabela 14). Na Figura 49 encontra-se representado um gráfico que mostra um exemplo da variação da concentração do éster – 3.5 dinitrobenzoato de butilo (**3a**) – e do ácido correspondente, ao longo de 345 h.



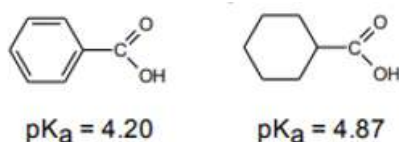
**Figura 49** Variação da concentração de éster **3a** e ácido em tampão fosfato (pH = 7,4, T=37 °C)

Entre os ésteres e tioésteres apenas os compostos com cadeias curtas (C4) contendo dois grupos atratores de elétrons no anel aromático (3.5-dinitrosubstituídos e 3-nitro-5-(trifluorometil) substituídos), apresentam degradação significativa confirmando a influência do efeito indutivo na taxa de hidrólise química. (2.7.1.1). Os ésteres e tioésteres 4-nitrosubstituídos apesar que possuem um grupo atrator dos elétrons em posição -para mostram baixo nível de degradação em PBS a pH7.4. Isso pode ser explicado pelo facto do grupo nitro em posição -para estar mais afastado do grupo carboxilo em comparação com o grupo nitro em posição -meta, diminuindo o efeito indutivo. Além disso, é óbvio que um grupo atrator de elétrons (compostos 4-nitrosubstituídos) têm menos impacto indutivo no grupo carboxilo do que dois grupos atratores de elétrons (compostos 3.5-dinitrosubstituídos e 3-nitro-5-(trifluorometil) substituídos). Os ésteres que apresentam mais degradação são **3a** (3.5-dinitrobenzoato de butilo) e o **4a** (3-nitro-5-(trifluorometil)-benzoato de butilo). Estas moléculas mostraram decompor-se 65% para o **3a** e 60% para o **4a** ao fim de 345 horas. Dos tioésteres degradação significativa apresentam apenas o composto **11a** (3.5-dinitrotiobenzoato de butilo) se degradou em 35% e composto **12a** (3-nitro-5-(trifluorometil)-tiobenzoato de butilo) se degradou em 18%.

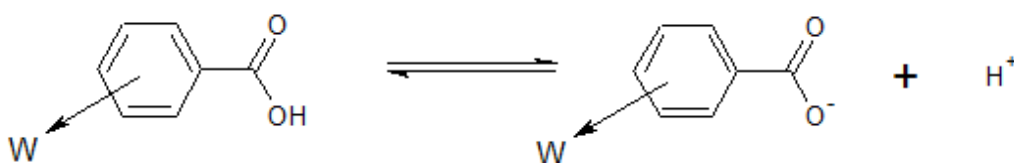
Nos compostos com cadeia longas (C8 e C12) praticamente não foi observada degradação.

### 2.7.1.1 Efeito do pKa dos ácidos fracos.

A acidez dos ácidos carboxílicos pode variar significativamente. Essas diferenças de acidez podem ser explicadas quase exclusivamente pelo efeito indutivo<sup>6</sup> de substituintes ligados ao grupo carboxilato. O ácido benzóico em si, é um ácido um pouco mais forte que o ácido ciclohexanocarboxílico pelo fato de que o grupo carboxilo do ácido benzóico está ligado a um carbono hibridizado sp<sup>2</sup> que é mais eletronegativo e atrator de elétrons.<sup>291</sup>

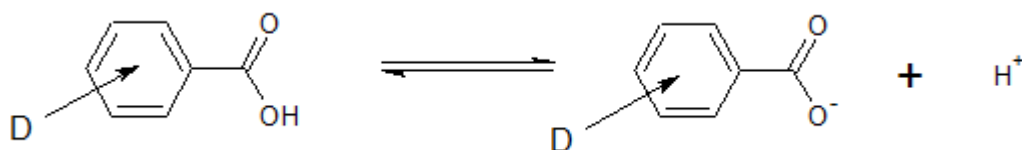


Os substituintes doadores de elétrons aumentam a densidade eletrônica do anel aromático, ativando-o para SEA. Os grupos atratores de elétrons diminuem a densidade eletrônica, desativando o anel aromático para as mesmas reações. De maneira semelhante, os substituintes têm efeito sobre a acidez dos ácidos benzóicos.



W – grupo atrator de elétrons

Substituintes desativadores, como o grupo nitro (-NO<sub>2</sub>), removem a densidade eletrônica do anel aromático e também do anião carboxilato. Isso estabiliza a carga negativa da base conjugada, aumentando a acidez do ácido carboxílico.<sup>291</sup>



D – grupo doador de elétrons

O efeito oposto ocorre com substituintes doadores de elétrons. A base conjugada do ácido benzóico é desestabilizada por substituintes doadores de elétrons, tornando o ácido carboxílico menos ácido.<sup>291</sup>

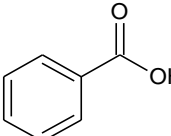
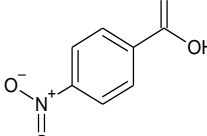
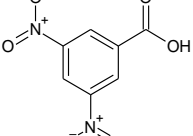
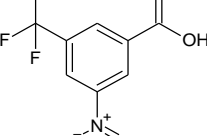
<sup>6</sup> O efeito indutivo é um efeito experimentalmente observável da transmissão de carga através de uma cadeia de átomos numa molécula por indução eletrostática.<sup>290</sup>

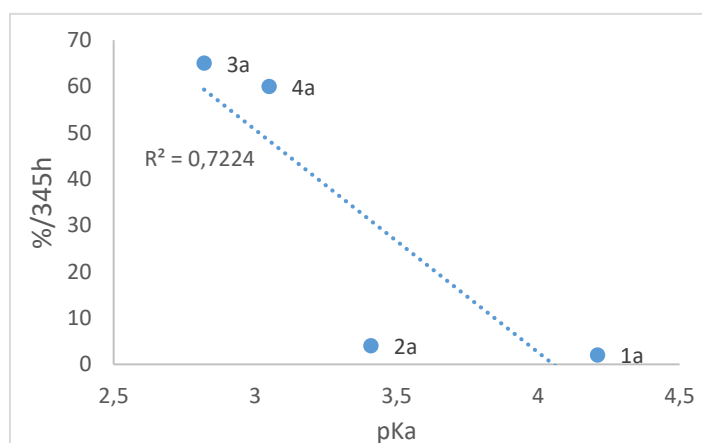
Todos os compostos estudados nesta tese são derivados do ácido benzóico contendo grupos aceitadores de elétrons e desativadores do anel aromático. Os substituintes utilizados foram 4-nitro (NO<sub>2</sub>), 3,5-dinitro e 3-nitro-5-(trifluorometilo) (ordem crescente do poder desativador: CF<sub>3</sub> < NO<sub>2</sub>).<sup>291</sup>

Uma boa medida da estabilidade do anião é o pKa do ácido conjugado.

No sentido de verificar o efeito dos diferentes grupos substituintes do anel aromático na velocidade de hidrólise química para os ésteres estudou-se o efeito do pKa de ácidos fracos naquela velocidade de degradação. Construiu-se então um gráfico para quatro ésteres derivados de ácido benzóico (**1a**), ácido 4-nitrobenzóico (**2a**), ácido 3,5-dinitrobenzóico (**3a**) e ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico (**4a**) com cadeia alcóxica de 4 átomos de carbono com base nos valores indicados na Tabela 15 e Figura 50.

**Tabela 15 Efeito do pKa dos ácidos fracos na percentagem de degradação ao fim de 354 horas dos ésteres derivados de ácido benzóico substituído com cadeia 4 átomos de carbono: benzoato de butilo (1a), 4-nitrobenzoato de butilo (2a), 3,5-dinitrobenzoato de butilo (3a) e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoato de butilo (4a).**

|        |   |   |  |   |
|--------|---|---|--|---|
|        |  |  |  |  |
| pKa    | 4,21  | 3,41  | 2,82   | 3,05  |
| %/345h | 2   | 4   | 65   | 60  |



**Figura 50 Efeito do pKa dos ácidos fracos na velocidade de degradação dos ésteres derivados de ácido benzóico substituído com cadeia 4 átomos de carbono: H-benzoato de butilo (1a), 4-nitrobenzoato de butilo (2a), 3,5-dinitrobenzoato de butilo (3a) e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoato de butilo (4a).**

O gráfico da Figura 50 mostra uma possível correlação entre o pKa dos ácidos fracos e velocidade de degradação ( $R^2=0.72$ ). O composto com menor pKa (**3a**; pKa=2.82) degrada mais rapidamente, e ao contrário o composto com maior pKa (**1a**; pKa=4.21) degrada mais lentamente. Neste ensaio a degradação dos compostos **1a** e **2a** é muito baixa (4% e 2% correspondente/345h). Tendo em conta que erro associado a este ensaio que é cerca de 5%, não podemos tirar do gráfico mais do que uma tendência que, no entanto, vai na direção do que seria de esperar.

### 2.7.2 Estabilidade em plasma humano

Estes estudos foram efetuados plasma humano diluído a 80% com tampão fosfato pH 7,4 de concentração total 0,05M e força iónica 0,15M à temperatura de 37°C. O meio reacional continha sempre 2% de acetonitrilo, sendo adicionadas quantidades de substratos a partir de soluções mães. As reações de hidrólise processaram-se sempre partindo de uma concentração inicial de substrato de  $5 \times 10^{-4}$ M.

O plasma é uma solução aquosa, sendo o maior componente do sangue (55%). É constituído principalmente por água (92%), possui pH 7.4, e contem substâncias de diversos pesos moleculares que perfazem 7% do seu volume. Estes componentes dissolvidos são proteínas plasmáticas. Também se incluem 1% outros solutos: nutrientes, gases respiratórios, hormonas e iões inorgânicos.<sup>281</sup>

Qualquer fármaco ou pró-fármaco em desenvolvimento deverá ter a sua estabilidade em plasma estudada. No caso de um composto passível de ser hidrolisado pelas esterases humanas este estudo é ainda mais premente. No caso de pró-fármacos desenvolvidos para serem ativados por esterases de micobactérias é ainda importante demonstrar que o fármaco não só é resistente às esterases do plasma como também consegue ser ativado pelas esterases das micobactérias.

Foram realizados estudos de estabilidade com os ésteres/amidas derivados de BA de modo a avaliar a degradação enzimática e selecionar assim os ésteres/amidas mais adequados do ponto de vista de estabilidade frente a essas mesmas enzimas. Como é difícil garantir que o plasma humano mantenha a sua atividade durante longas incubações, o período de incubação de 72 horas não foi excedido.

Dado que a conversão do éster/tioéster no ácido é quantitativamente equivalente, esta reação pode ser seguida tanto pela formação do ácido como pela diminuição do éster/amida. No entanto, todos os cálculos foram realizados pela formação de ácido. De modo a quantificar a hidrólise enzimática que ocorreu para os ésteres e tioésteres calculou-se a constante de pseudo-1ª ordem ( $k_{\text{obs}}$ ) e tempo de semivida ( $t_{1/2}$ ) (Tabela 16).

Uma vez que a taxa de degradação das amidas apresenta valor muito reduzido, não foram calculadas as constantes de velocidade ( $k_{\text{obs}}$ ) nem os tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) calculando-se apenas a percentagem de degradação da amida (Tabela 17).

Para os compostos onde se observou degradação em plasma, as taxas de hidrólise química determinadas anteriormente (Tabela 14) foram sempre significativamente inferiores às taxas de hidrólise observadas nos estudos de estabilidade em plasmas. Tal significa que a degradação observada em plasma e em homogenato de micobactéria se deve essencialmente à hidrólise enzimática e que a velocidade de hidrólise química pode ser desprezada por ser significativamente inferior.

**Tabela 16 Estudo da hidrólise enzimática. Constantes de velocidade de reação e tempos de semivida de ésteres/tioésteres de derivados de ácido benzóico substituído em plasma humano à temperatura 37°C durante 72h. Concentração inicial de substrato (éster/tioéster) -  $5 \times 10^{-4} \text{M}$  com 2% de ACN.**

| ésteres               | X  | R                               | $k_{\text{obs}} \times 100$<br>( $\text{h}^{-1}$ ) | 1/2 (h)     | tioésteres | X  | R                               | $k_{\text{obs}} \times 100$<br>( $\text{h}^{-1}$ ) | 1/2 (h)     |
|-----------------------|--|---------------------------------|--|-------------|------------|--|---------------------------------|--|-------------|
| <b>1a</b>             | H  | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 44,1 ± 6,1   | 1,59 ± 0,21 | <b>9a</b>  | H  | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 92,3 ± 1,8   | 0,75 ± 0,01 |
| <b>1b</b>             |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 11,6 ± 1,2   | 6,00 ± 0,61 |            |  | -                               | -  | -           |
| <b>1c</b>             |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 2,66 ± 0,23  | 26,1 ± 2,4  | <b>9c</b>  |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 14,9 ± 0,9   | 4,66 ± 0,28 |
| <b>1e</b>             |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | n/d  | n/d         | <b>9e</b>  |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0,60 ± 0,07  | 116 ± 13    |
| <b>2a</b>             | 4-NO <sub>2</sub>                        | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 132 ± 6  | 0,53 ± 0,01 | <b>10a</b> | 4-NO <sub>2</sub>                        | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 34,5 ± 1,3   | 2,01 ± 0,08 |
| <b>2b</b>             |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 27,4 ± 5,8   | 2,62 ± 0,63 |            |  | -                               | -  | -           |
| <b>2c</b>             |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 9,73 ± 1,20  | 7,18 ± 0,9  | <b>10c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 8,08 ± 0,21  | 8,58 ± 0,22 |
| <b>2e<sup>i</sup></b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0,66 ± 0,10  | 106 ± 17    | <b>10e</b> |  | -                               | -  | -           |
| <b>3a</b>             | 3,5-dNO <sub>2</sub>                     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 8,08 ± 0,29  | 8,59 ± 0,31 | <b>11a</b> | 3,5-dNO <sub>2</sub>                     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 10,3 ± 1,9   | 6,84 ± 1,14 |
| <b>3b</b>             |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 5,68 ± 0,47  | 12,3 ± 1,0  |            |  | -                               | -  | -           |
| <b>3c</b>             |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 3,53 ± 0,44  | 19,9 ± 2,6  | <b>11c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 11,8 ± 1,9   | 5,96 ± 1,03 |
| <b>3d</b>             |  | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 0,98 ± 0,07  | 71,0 ± 4,7  |            |  | -                               | -  | -           |
| <b>3e<sup>i</sup></b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0,89 ± 0,13  | 78,4 ± 11,7 | <b>11e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 2,85 ± 0,21  | 24,4 ± 1,9  |
| <b>3f<sup>i</sup></b> |  | C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> | 0,97 ± 0,23  | 74,1 ± 18,7 |            |  | -                               | -  | -           |
| <b>3g</b>             |  | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> | n/d  | n/d         |            |  | -                               | -  | -           |
| <b>4a</b>             | 3-NO <sub>2</sub> -<br>5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 12,5 ± 1,8   | 5,63 ± 0,88 | <b>12a</b> | 3-NO <sub>2</sub> -<br>5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 7,86 ± 0,64  | 8,86 ± 0,76 |
| <b>4b</b>             |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 5,96 ± 1,28  | 12,0 ± 2,4  |            |  | -                               | -  | -           |
| <b>4c</b>             |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 2,30 ± 0,06  | 30,1 ± 0,9  | <b>12c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 3,47 ± 0,54  | 20,3 ± 3,0  |
| <b>4d</b>             |  | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 1,26 ± 0,04  | 55,0 ± 1,7  |            |  | -                               | -  | -           |
| <b>4e</b>             |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | n/d  | n/d         | <b>12e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0,78 ± 0,01  | 89,2 ± 1,4  |

n/d – não degrada

i - Ensaio foi feito nos estudos anteriores.<sup>9</sup>

Ao comparar estabilidade em plasma humano de ésteres e tioésteres entre si (Figura 51) verificou-se que entre os ésteres os compostos 4-nitrosubstituídos são degradados mais rapidamente (Figura 51:B), enquanto os tioésteres que apresentem menor estabilidade são derivados de ácido benzóico não substituído (Figura 51:A). É provável que as enzimas responsáveis pela hidrólise ésteres e tioésteres plasma sejam diferentes. Os ésteres e tioésteres derivados de ácido 3.5-dinitrobenzóico (Figura 51:C) e derivados de ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico (Figura 51:D) apresentam a estabilidade semelhante em plasma humano.

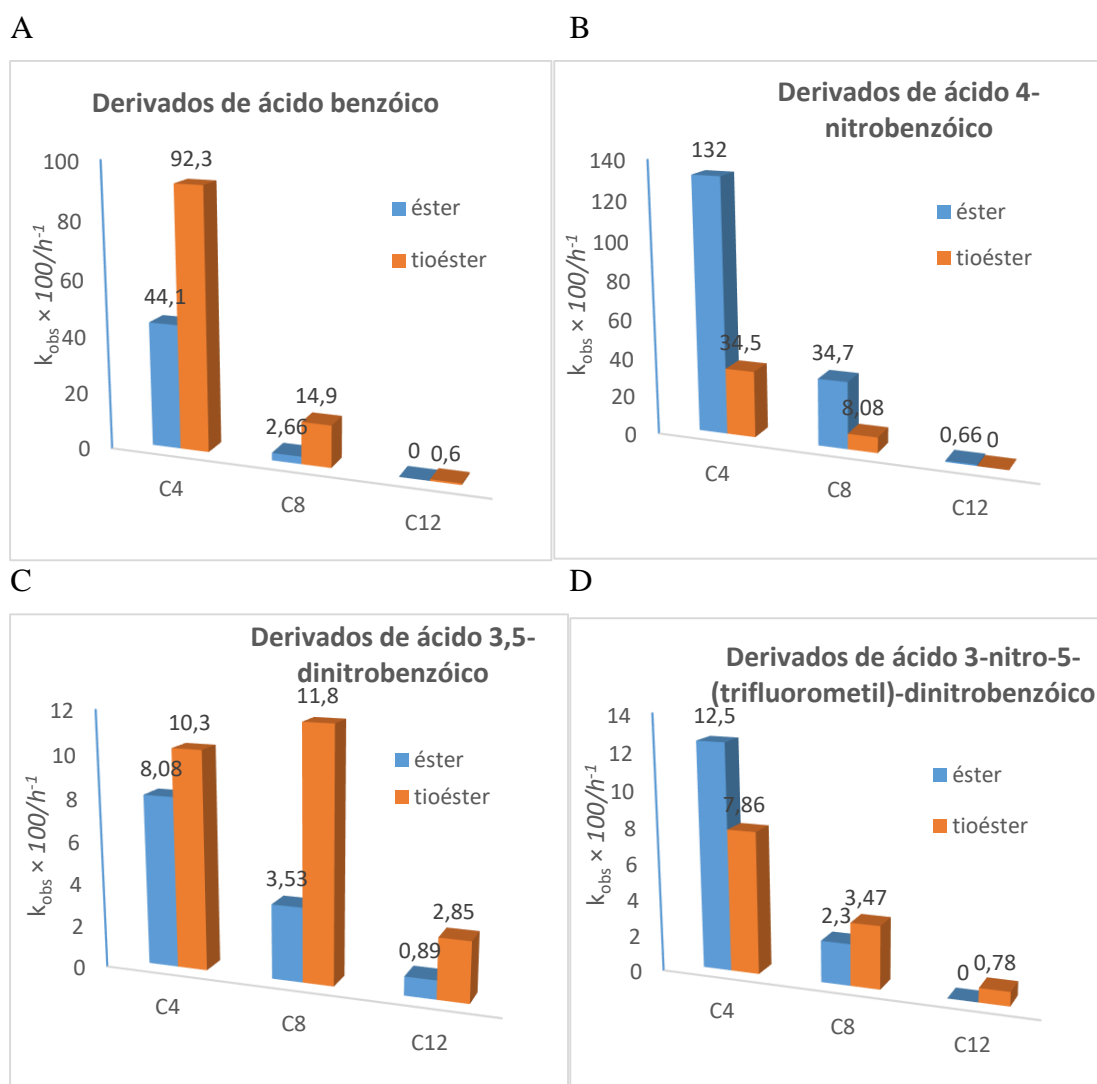
Tioesterases (E.C.3.1.2.) são principais enzimas responsáveis pela hidrólise dos tioésteres.

A butirilcolinestraxe é a principal enzima responsável pela hidrólise de ésteres no plasma humano (1.2.2.1).<sup>302</sup> Uma vez que não há carboxilesterase no plasma humano, a BuChE desempenha um papel no processamento, catabolismo e/ou desintoxicação de numerosos compostos contendo funções éster, tioéster e até amida.<sup>302</sup>

**A família das tioesterases.** As tioesterases são enzimas envolvidas na clivagem de ligações tioesteres, reação principalmente envolvida no metabolismo de lípidos. As acetil-CoA tioesterases (ACOT), nome mais correto para as tioesterases,, fazem parte de um grupo de enzimas que hidrolisam acetil-CoAs em ácidos gordos livres e coenzima A.<sup>295,296</sup> Também podem ser citadas como acetil-CoA hidrólases, acetil-CoA tioesters hidrólases e palmitiol-CoA hidrólases. Estas enzimas são localizadas em muitos compartimentos celulares tais como retículo endoplasmático, citosol, mitocôndria e peroxissomas. No entanto as funções fisiológicas destas enzimas ainda não foram totalmente elucidadas.<sup>295</sup> Apesar disso, se admite que estejam no controlo dos níveis de CoA ésteres, ácidos gordos livres e coenzimas. Desta forma controlaria os efeitos que as variações dos níveis destas moléculas possam ter em processos celulares. Podemos entender a importância das acetil-CoA tioesterases quando observamos a grande quantidade de processos que envolvem longas cadeias de acetil-CoA e ácidos gordos livres. Estas moléculas são importantes intermediários na síntese e degradação de ácidos gordos,<sup>295</sup> além de possuírem papéis importantes na distribuição de proteínas,<sup>297,298</sup> regulação alostérica de muitas enzimas, regulação dos canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP, ativação de ATP-ases de Ca<sup>2+</sup>, regulação da secreção de insulina, transdução de sinal através da quinase C, redução da indução de apoptose via ácido

retinóico e o envolvimento na ligação e na fusão de membranas intracelulares.<sup>295</sup> Além disso, foi demonstrado a participação de acetil-CoA na regulação transcricional através da interação com recetores nucleares. O acetil-CoA se comporta como ligante para o recetor nuclear hepático 4 alfa (HNF-4a) o qual é ativado ou inibido dependendo da presença, ou ausência de acetil-CoA.<sup>299</sup> Acetil-CoA também liga-se ao recetor nuclear da hormona tireoidiano e, portanto, inibe a ligação do T<sup>3</sup>.<sup>300</sup>

Estas enzimas são distribuídas em todo o corpo humano a grande quantidade devido à importância de processos que envolvem longas cadeias de acetil-CoA e ácidos gordos livres.<sup>301</sup>



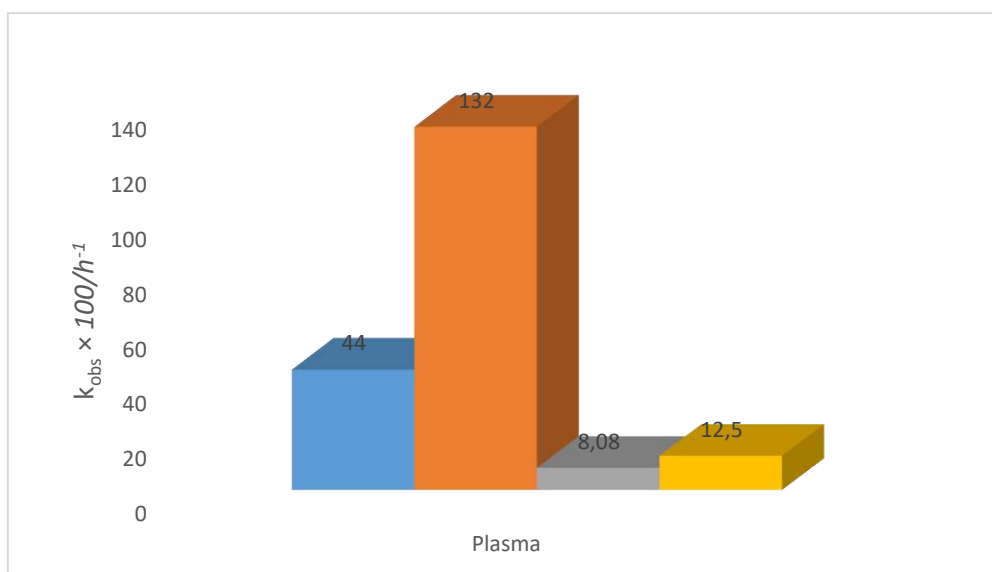
**Figura 51 Estudo da estabilidade enzimática comparativo dos ésteres e tioésteres de derivados de ácido benzóico substituído em plasma humano:**  
**A. Derivados de ácido benzóico; B. Derivados de ácido 4-nitrobenzóico; C. Derivados de ácido 3,5-dinitrobenzóico; D. Derivados de ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)-benzóico.**

Como foi dito anteriormente as amidas não apresentaram praticamente nenhuma degradação durante 72h e apenas uma amida, derivada de ácido 4-nitrobenzóico (**6a**) mostrou 32% de degradação ao longo de 72h. Uma vez que a taxa de degradação apresenta valor muito reduzido, não foi possível calcular as constantes de velocidade ( $k_{obs}$ ) nem os tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) calculando-se apenas a percentagem de degradação da amida. Para comparar a percentagem de degradação ao fim de 24h, 48h e 72h dos ésteres, tioésteres e amidas foi criada a Tabela 17.

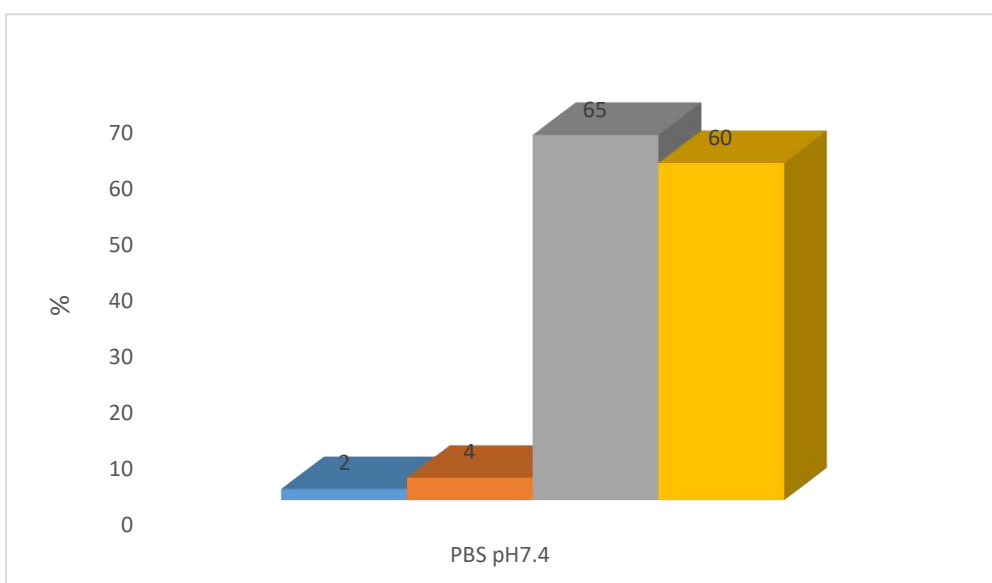
A Figura 52 representa o estudo comparativo de efeito do substituinte no anel aromático na estabilidade química e enzimática. O estudo foi realizado com quatro ésteres com cadeia alcoxílica igual (4 átomos de carbono) e diferente substituição no anel benzênico: H-benzoato de butilo (**1a**), 4-nitrobenzoato de butilo (**2a**), 3,5-dinitrobenzoato de butilo (**3a**) e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoato de butilo (**4a**). Construíram-se então os gráficos que ilustram a degradação desses compostos em plasma humano (representada por  $k_{obs}$ ) (Figura 52:A) e em PBS pH7.4 (representada pela percentagem de degradação ao fim de 14 dias de ensaio) (Figura 52:B).

Ao comparar estabilidade química e enzimática analisando os gráficos na Figura 52 verificou-se que em PBS (Figura 52:B), como foi esperado, os ésteres 3,5-dinitrosubstituídos e 3-nitro-5-(trifluorometil)substituídos degradam mais rapidamente do que os ésteres não substituídos e 4-nitrosubstituídos. Isto está de acordo com o que seria de esperar do que se conhece da química dos compostos, pois confirma a influência do efeito indutivo na taxa de hidrólise (2.7.1.1). No entanto, o mesmo não se observa na hidrólise em plasma humano. O gráfico na Figura 52:A demonstra que nos testes de estabilidade enzimática em plasma humano os ésteres não substituídos e 4-nitrosubstituídos degradam mais rapidamente do que os ésteres 3,5-dinitrosubstituídos e 3-nitro-5-(trifluorometil)substituídos. Este resultado parece demonstrar que a afinidade do composto para as esterases do plasma será o fator mais importante a ter em consideração, ou seja, neste caso os efeitos estéreos entendidos como a afinidade para a enzima, serão mais importantes que os efeitos eletrônicos.

A



B



■ H-benzoatos   ■ 4-nitrobenzoatos   ■ 3,5-dinitrobenzoatos   ■ 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoatos

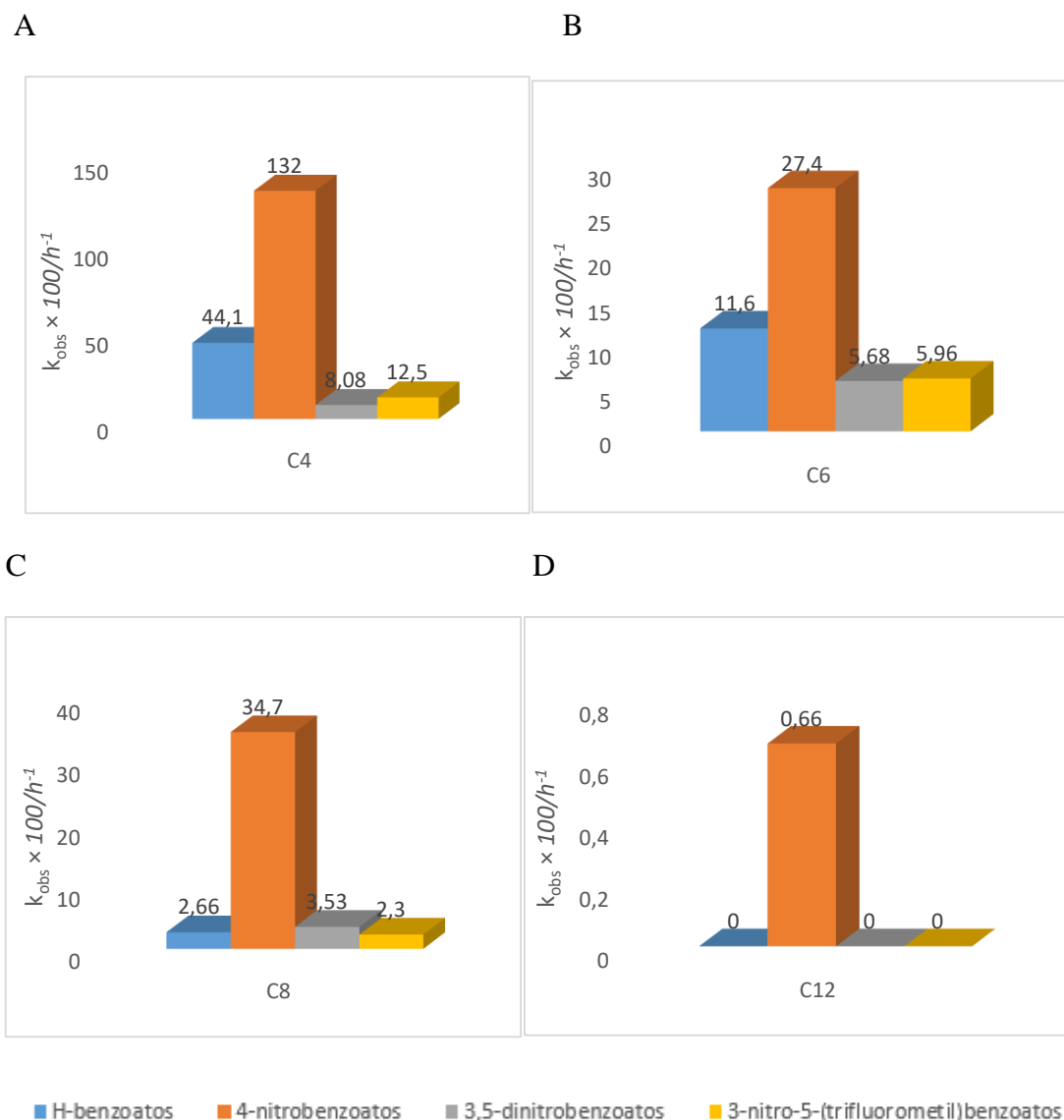
**Figura 52** Velocidade de degradação química e enzimática de H-benzoato de butilo (1a), 4-nitrobenzoato de butilo (2a), 3,5-dinitrobenzoato de butilo (3a) e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoato de butilo (4a):

A. Em plasma humano (representado em  $k_{obs}$ ); B. em PBS pH7.4 (representado em percentagem de degradação ao fim de 14 dias de ensaio).

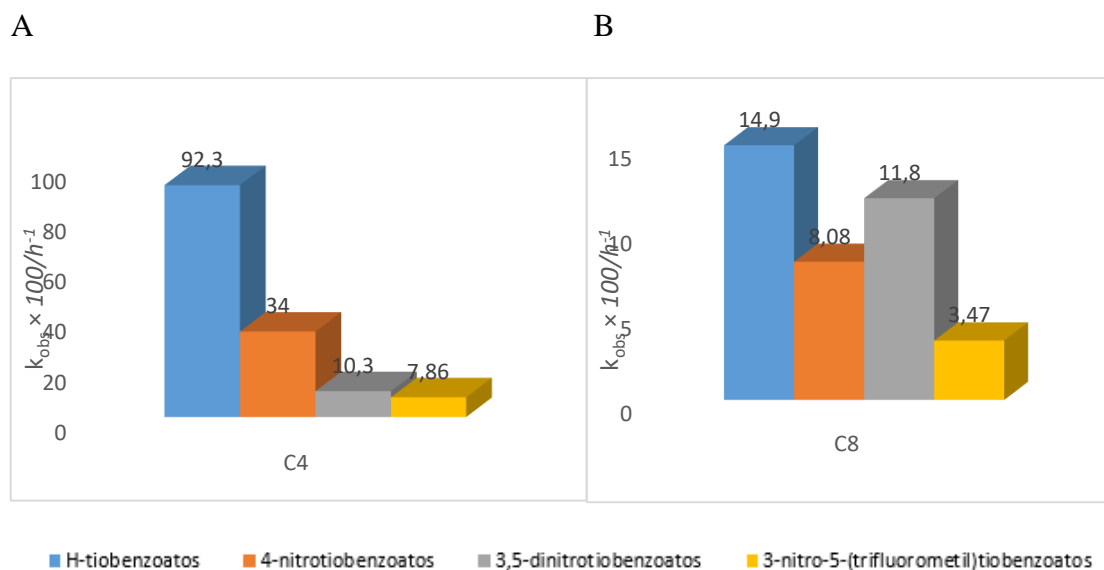
Ao avaliar os diferentes substituintes no anel aromático no estudo de estabilidade em plasma humano verificou-se entre os ésteres (Figura 53) os compostos que

apresentam menor estabilidade são derivados de ácido 4-nitrobenzóico, os derivados de ácido benzóico não substituído apresentam alta estabilidade e os mais estáveis são derivados de ácido 3.5-dinitrobenzóico e de ácido 3-nitro-5(trifluorometil)benzóico. Ao contrário com a estabilidade química (Figura 52) , onde a velocidade de degradação depende de influência do efeito indutivo, no estabilidade enzimática a velocidade de degradação depende da capacidade de composto interagir com o sítio ativo da enzima responsável pelo hidrólise e a presença dos grupos volumosos ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{CF}_3$ ) nos compostos em estudo podem criar o impedimento estérico, diminuindo a afinidade dos compostos com enzima, o que, provavelmente, aumentam a estabilidade enzimática desses.

Entre os tioésteres (Figura 54) os compostos que apresentam menor estabilidade são derivados de ácido benzóico não substituído, os derivados de ácido 4-nitrobenzóico e 3.5-dinitrobenzóico apresentam alta estabilidade e os mais estáveis são derivados de ácido 3-nitro-5(trifluorometil)benzóico.



**Figura 53** Estudo da estabilidade enzimática dos benzoatos em plasma humano em função do substituintes no anel aromático:  
**A.** quatro átomos de carbonos na cadeia alquílica; **B.** seis átomos de carbonos na cadeia alquílica; **C.** oito átomos de carbonos na cadeia alquílica; **D.** doze átomos de carbonos na cadeia alquílica.



**Figura 54 Estudo da estabilidade enzimática dos tioésteres em plasma humano em função do substituintes no anel aromático:**

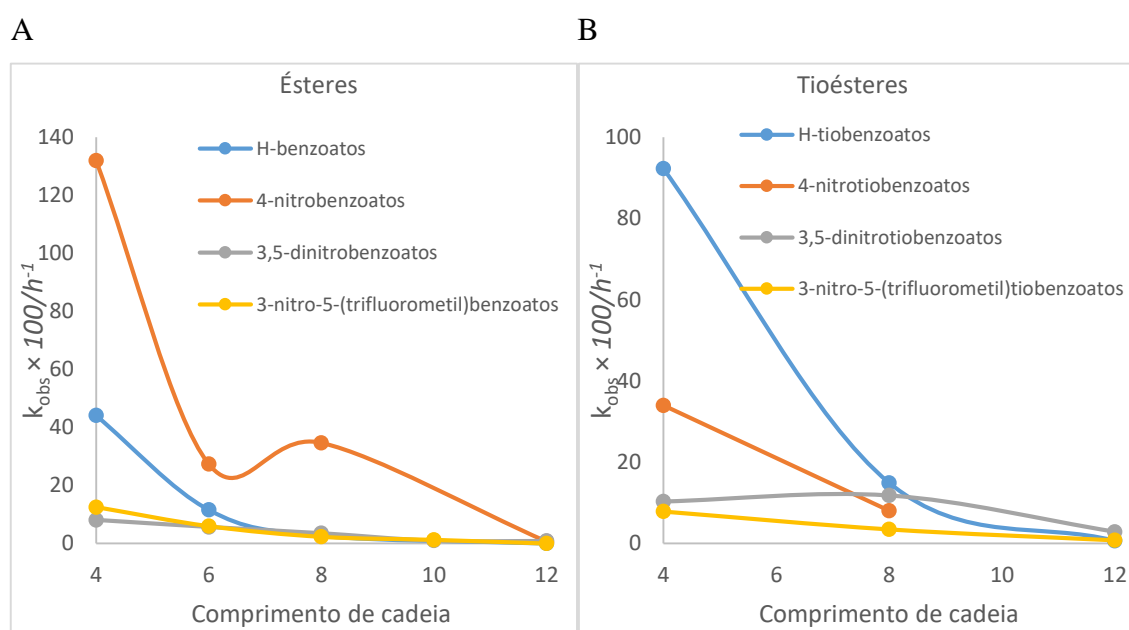
**A. quatro átomos de carbonos na cadeia alquílica; B. oito átomos de carbonos na cadeia alquílica.**

Para avaliar a dependência de velocidade da degradação com comprimento de cadeia alcóxílica foram construídos então os gráficos dos ésteres (Figura 55:A) e tioésteres (Figura 55:B) com diferentes cadeias do grupo alcóxilo (de 4 a 14). Ao analisar os resultados obtidos na Tabela 16 foi concluído que com aumento de cadeia alcóxílica, ou seja, aumento de lipofilia, a taxa de hidrólise diminui. Para moléculas com estrutura semelhante, em que apenas se varia o comprimento do grupo alcóxilo, quanto maior o número de carbonos, maior a lipofilia das moléculas (valores de Log P aumentam).<sup>293</sup> A lipofilia de um composto tem importância na atividade biológica, pois a afinidade para um ambiente lipofílico pode facilitar não só o transporte de químicos através das membranas de um sistema biológico assim como formação de complexos entre os fármacos e o local de ligação do recetor.<sup>60</sup> Além disso, com aumento de cadeia alcóxílica deverá também existir um efeito estereoquímico devido à presença de grupos volumosos nos compostos em estudo. Um substituinte volumoso pode agir como um escudo e impedir a interação ideal entre o fármaco e o sítio de ligação. Mas também poderá facilitar interações entre o fármaco e o local de ligação encaixando, por exemplo, numa cavidade hidrofóbica do alvo.<sup>60</sup>

Ao analisar os gráficos na Figura 55 verificou-se que nos compostos derivados de ácido benzóico e derivados de ácido 4-nitrobenzóico observa-se uma grande diferença nas velocidades de degradação entre as cadeias curtas e as cadeias longas. Por exemplo,

a velocidade de degradação de H-benzoato de butilo (**1a**) ( $k_{obs}=44,1$ ) é 17 vezes mais rápida do que a velocidade de degradação de H-benzoato de octilo (**1c**) ( $k_{obs}=2,66$ ). De maneira semelhante, a velocidade de degradação de 4-nitrobenzoato de butilo (**2a**) ( $k_{obs}=132$ ) é 14 vezes mais rápida do que a velocidade de degradação de 4-nitrobenzoato de octilo (**2c**) ( $k_{obs}=9,73$ ). Ao contrário, nos compostos derivados de ácido 3.5-dinitrobenzóico e derivados de ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)-benzóico não se observa uma diferença tão grande nas velocidades de degradação entre as cadeias curtas e as cadeias longas. Assim, a velocidade de degradação de 3.5-dinitrobenzoato de butilo (**3a**) ( $k_{obs}=8,08$ ) é apenas 2 vezes mais rápido do que a velocidade de degradação de 3.5-dinitrobenzoato de octilo (**3c**) ( $k_{obs}=3,53$ ) e a velocidade de degradação de 3-nitro-5-(trifluorometil)-benzoato de butilo (**4a**) ( $k_{obs}=12,5$ ) apenas 5 vezes mais rápido do que a velocidade de degradação de 3-nitro-5-(trifluorometil) benzoato de octilo (**4c**) ( $k_{obs}=2,30$ ).

Durante o ensaio de estabilidade em plasma humano foi observado que os compostos com cadeias longas (C12-C16) têm a tendência precipitar nas condições em que foi feito o ensaio, o que pode ser explicado por serem demasiado lipofílicas.



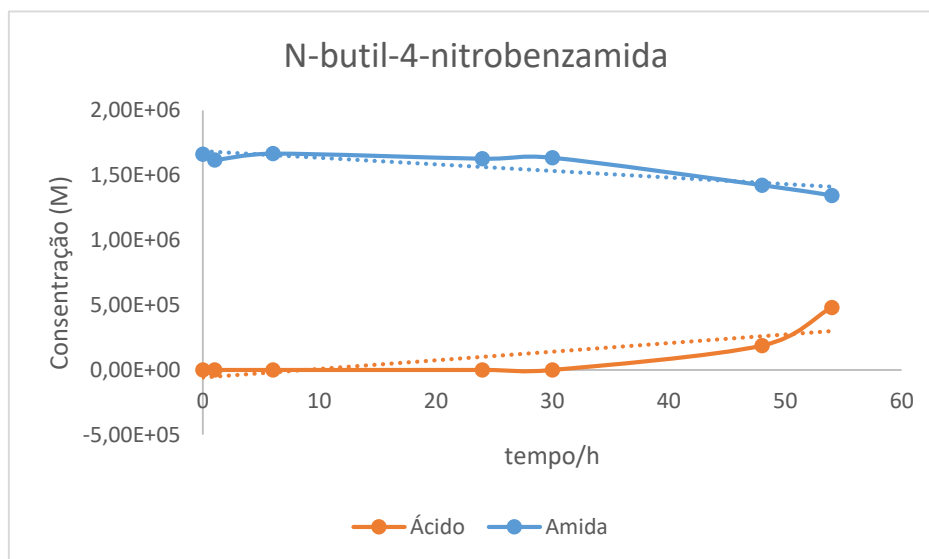
**Figura 55 Estudo da estabilidade enzimática em plasma humano dependendo do comprimento de cadeia alquílica:**

**A. Ésteres; B. Tioésteres**

**Tabela 17 Resultados obtidos dos valores de percentagem de degradação de ésteres/amidas, ao fim de 72 horas, em ensaio de estabilidade enzimática, plasma humano.**

| ésteres   | X                                    | R                               | Degradação (%) |     |     | amidas    | X                                    | R                               | Degradação (%) |     |     | tioésteres | X                                    | R                               | Degradação (%) |     |     |
|-----------|--------------------------------------|---------------------------------|----------------|-----|-----|-----------|--------------------------------------|---------------------------------|----------------|-----|-----|------------|--------------------------------------|---------------------------------|----------------|-----|-----|
|           |                                      |                                 | 24h            | 48h | 72h |           |                                      |                                 | 24h            | 48h | 72h |            |                                      |                                 | 24h            | 48h | 72h |
| <b>1a</b> | H                                    | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 100            | 100 | 100 | <b>5a</b> | H                                    | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0              | 0   | 0   | <b>9a</b>  | H                                    | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 100            | 100 | 100 |
| <b>1b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 94             | 100 | 100 | <b>5b</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   | <b>9b</b>  |                                      | -                               | -              | -   | -   |
| <b>1c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 45             | 71  | 84  | <b>5c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 0   | 0   | <b>9c</b>  |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 98             | 100 | 100 |
| <b>1e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 3              | 6   | 9   | <b>5e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 0   | <b>9e</b>  |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 13             | 25  | 35  |
| <b>2a</b> | 4-NO <sub>2</sub>                    | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 100            | 100 | 100 | <b>6a</b> | 4-NO <sub>2</sub>                    | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 12             | 23  | 32  | <b>10a</b> | 4-NO <sub>2</sub>                    | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 100            | 100 | 100 |
| <b>2b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 100            | 100 | 100 | <b>6b</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   | <b>10b</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   |
| <b>2c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 100            | 100 | 100 | <b>6c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 0   | 1   | <b>10c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 86             | 98  | 100 |
| <b>2e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 15             | 27  | 38  | <b>6e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 1   | <b>10e</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   |
| <b>3a</b> | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 86             | 98  | 100 | <b>7a</b> | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0              | 0   | 0   | <b>11a</b> | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 91             | 99  | 100 |
| <b>3b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 74             | 93  | 98  | <b>7b</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   | <b>11b</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   |
| <b>3c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 57             | 81  | 92  | <b>7c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 0   | 0   | <b>11c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 94             | 100 | 100 |
| <b>3d</b> |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 18             | 32  | 44  | <b>7d</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   | <b>11d</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   |
| <b>3e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 29             | 50  | 65  | <b>7e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 0   | <b>11e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 49             | 74  | 87  |
| <b>3f</b> |                                      | C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> | 23             | 51  | 65  | <b>7f</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   | <b>11f</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   |
| <b>3g</b> |                                      | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> | 1              | 3   | 4   | <b>7g</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   | <b>11g</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   |
| <b>4a</b> | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 95             | 100 | 100 | <b>8a</b> | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0              | 0   | 0   | <b>12a</b> | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 85             | 98  | 100 |
| <b>4b</b> |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 72             | 94  | 98  | <b>8b</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   | <b>12b</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   |
| <b>4c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 42             | 67  | 81  | <b>8c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0              | 0   | 0   | <b>12c</b> |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 56             | 81  | 91  |
| <b>4d</b> |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 26             | 45  | 60  | <b>8d</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   | <b>12d</b> |                                      | -                               | -              | -   | -   |
| <b>4e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 1              | 2   | 3   | <b>8e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | 0   | <b>12e</b> |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 17             | 31  | 43  |

Na Figura 56 encontra-se representado um gráfico que mostra um exemplo da variação da concentração da amida **5a** e do ácido correspondente, ao longo de 72h.



**Figura 56** Variação da concentração de éster e ácido durante o ensaio em plasma humano do composto **6a**.

Observou-se que tal como no tampão fosfato as amidas são muito mais resistentes à hidrólise que os correspondentes ésteres e tioésteres. Observações semelhantes de uma taxa de hidrólise reduzida das amidas em comparação com ésteres em plasma humano foi relatado também para amidas e ésteres derivados de ácido pirazinóico,<sup>5</sup> de ibuprofeno, de cetoprofeno, de ácido mefenâmico,<sup>305</sup> de ácido para-aminobenzóico (procaína e procainamida)<sup>306</sup> etc.

As amidas e os ésteres são metabolizados de formas diferentes. Ésteres são rapidamente metabolizados por esterases plasmáticas em metabólitos inativos, e consequentemente apresentam curta meia vida. Os metabólitos dos ésteres são excretados pelos rins.<sup>304</sup>

As amidas são metabolizadas pelas amidases hepáticas. Esse processo é mais lento, o que determina uma meia vida mais longa, por isso podem apresentar efeito cumulativo em caso de doses repetidas.<sup>304</sup>

### 2.7.3 Estabilidade em homogenato de *M. smegmatis*

Estes estudos foram efetuados em soluções de homogenato de micobactérias diluído a 2% em tampão fosfato pH = 7,4 de concentração total 0,05M e força iónica a 0,15M à temperatura de 37°C. O meio reacional continha sempre 2% de acetonitrilo, sendo

adicionadas quantidades de substratos diluídas a partir de soluções mães de concentração igual a  $2,5 \times 10^{-2}$  M. As reações de hidrólise processaram-se sempre partindo de uma concentração inicial de substrato no meio reacional de  $5 \times 10^{-4}$  M.

Os valores das constantes de pseudo-primeira ordem ( $k_{obs}$ ) obtidos para a ativação dos pró-fármacos por homogenato de *M. smegmatis* estão representados na Tabela 18, tendo sido realizados 3 ensaios para cada composto.

Verificou-se, tal como nos outros meios biológicos estudados anteriormente, que as amidas são muito mais resistentes à hidrólise que os correspondentes ésteres e tioésteres. Uma vez que a taxa de degradação das amidas apresenta valor muito reduzido, as constantes de velocidade ( $k_{obs}$ ) e os tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) foram calculados apenas para cadeias curtas, que apresentam mais alto nível de degradação. Para cadeias compridas são apenas apresentadas as percentagens de degradação da amida (Tabela 19).

**Tabela 18 Estudo da hidrólise enzimática. Constantes de velocidade de reação e tempos de semivida de ésteres/amidas derivado de ácido benzóico substituído em homogenato de *M. smegmatis* à temperatura 37°C durante 48h. Concentração inicial de substrato (éster/amida) -  $5 \times 10^{-4} \text{M}$  com 2% de ACN.**

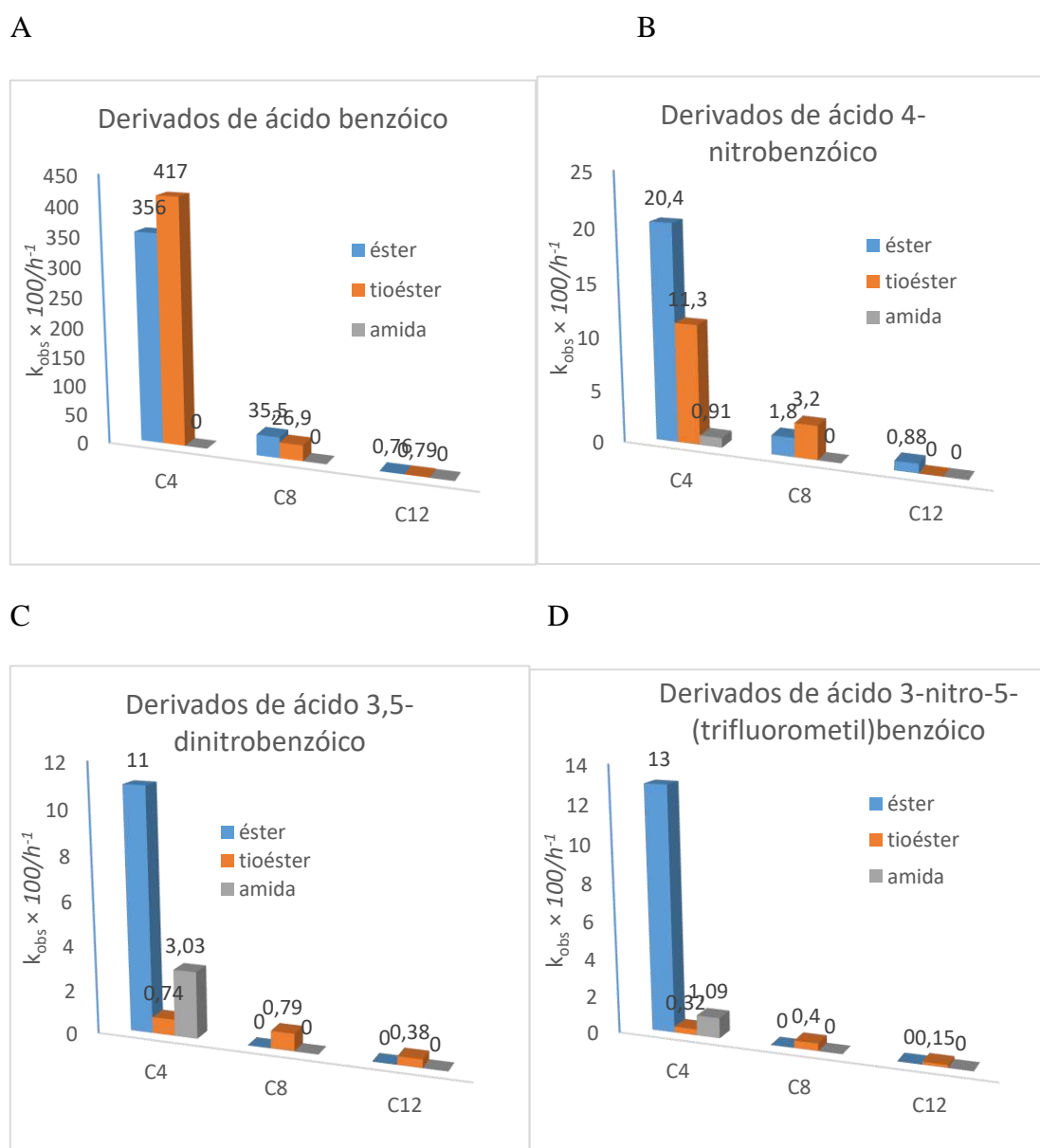
| ésteres   | X  | R                               | $k_{\text{obs}} \times 100$<br>(h <sup>-1</sup> ) | t <sub>1/2</sub> (h) | amidas    | X  | R                               | $k_{\text{obs}} \times 100$<br>(h <sup>-1</sup> ) | t <sub>1/2</sub> (h) | tióésteres | X  | R                               | $k_{\text{obs}} \times 100$<br>(h <sup>-1</sup> ) | t <sub>1/2</sub> (h) |
|-----------|--|---------------------------------|---|----------------------|-----------|--|---------------------------------|---|----------------------|------------|--|---------------------------------|---|----------------------|
| <b>1a</b> | H  | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 356 ± 17  | 0,20 ± 0,01          | <b>5a</b> | H  | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | n/d   | n/d                  | <b>9a</b>  | H  | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 417 ± 10  | 0,17 ± 0,00          |
| <b>1b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 332 ± 19  | 0,21 ± 0,01          | <b>5b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | n/d   | n/d                  |            |  | -                               | -   | -                    |
| <b>1c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 35,5 ± 0,3  | 1,96 ± 0,02          | <b>5c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | n/d   | n/d                  | <b>9c</b>  |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 26,9 ± 1,9  | 2,59 ± 0,18          |
| <b>1e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0,76 ± 0,02                                       | 91,4 ± 3,1           | <b>5e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | n/d   | n/d                  | <b>9c</b>  |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0,79 ± 0,08                                       | 88,4 ± 9,8           |
| <b>2a</b> | 4-NO <sub>2</sub>                        | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 20,4 ± 3,3  | 3,46 ± 0,49          | <b>6a</b> | 4-NO <sub>2</sub>                        | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0,91 ± 0,07                                       | 76,5 ± 5,3           | <b>10a</b> | 4-NO <sub>2</sub>                        | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 11,3 ± 0,8  | 6,18 ± 0,45          |
| <b>2b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 6,05 ± 0,31                                       | 11,5 ± 0,6           | <b>6b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 0,80 ± 0,05                                       | 87,2 ± 5,8           |            |  | -                               | -   | -                    |
| <b>2c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 1,80 ± 0,38                                       | 39,0 ± 7,7           | <b>6c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | n/d   | n/d                  | <b>10c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 3,20 ± 0,11                                       | 21,7 ± 0,7           |
| <b>2e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0,88 ± 0,05                                       | 79,4 ± 4,7           | <b>6e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | n/d   | n/d                  |            |  | -                               | -   | -                    |
| <b>3a</b> | 3,5-dNO <sub>2</sub>                     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 11,0 ± 0,8  | 6,32 ± 0,44          | <b>7a</b> | 3,5-dNO <sub>2</sub>                     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 3,03 ± 0,20                                       | 22,9 ± 1,5           | <b>11a</b> | 3,5-dNO <sub>2</sub>                     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0,74 ± 0,03                                       | 94,0 ± 4,2           |
| <b>3b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 0,86 ± 0,06                                       | 80,9 ± 5,5           | <b>7b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 0,84 ± 0,01                                       | 82,5 ± 1,4           |            |  | -                               | -   | -                    |
| <b>3c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | n/d   | n/d                  | <b>7c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | n/d   | n/d                  | <b>11c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0,79 ± 0,02                                       | 88,3 ± 2,0           |
| <b>3d</b> |  | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | n/d   | n/d                  | <b>7d</b> |  | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | n/d   | n/d                  |            |  | -                               | -   | -                    |
| <b>3e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | n/d   | n/d                  | <b>7e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | n/d   | n/d                  | <b>11e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0,38 ± 0,02                                       | 180 ± 12             |
| <b>3f</b> |  | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> | n/d   | n/d                  | <b>7f</b> |  | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> | n/d   | n/d                  |            |  | -                               | -   | -                    |
| <b>3g</b> |  | C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> | n/d   | n/d                  | <b>7g</b> |  | C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> | n/d   | n/d                  |            |  | -                               | -   | -                    |
| <b>4a</b> | 3-NO <sub>2</sub> -<br>5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 13,0 ± 1,1  | 5,36 ± 0,44          | <b>8a</b> | 3-NO <sub>2</sub> -<br>5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 1,09 ± 0,07                                       | 63,8 ± 4,1           | <b>12a</b> | 3-NO <sub>2</sub> -<br>5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0,32 ± 0,03                                       | 216 ± 22             |
| <b>4b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 0,67 ± 0,06                                       | 105 ± 10             | <b>8b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | n/d   | n/d                  |            |  | -                               | -   | -                    |
| <b>4c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | n/d   | n/d                  | <b>8c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | n/d   | n/d                  | <b>12c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0,40 ± 0,02                                       | 174 ± 10             |
| <b>4d</b> |  | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | n/d   | n/d                  | <b>8d</b> |  | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | n/d   | n/d                  |            |  | -                               | -   | -                    |
| <b>4e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | n/d   | n/d                  | <b>8e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | n/d   | n/d                  |            |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0,15 ± 0,01                                       | 453 ± 30             |

n/d – não degrada

**Tabela 19** Estudo da hidrólise enzimática. Percentagem de degradação de ésteres/amidas derivadas de ácido benzóico substituído em homogenato de *M. smegmatis* à temperatura 37°C durante 48h. Concentração inicial de substrato (éster/amida) -  $5 \times 10^{-4}$ M com 2% de ACN.

| ésteres   | X  | R                               | Degradação (%) |     | amidas    | X  | R                               | Degradação (%) |     | tioésteres | X  | R                               | Degradação (%) |     |  |
|-----------|--|---------------------------------|----------------|-----|-----------|--|---------------------------------|----------------|-----|------------|--|---------------------------------|----------------|-----|--|
|           |  |                                 | 24h            | 48h |           |  |                                 | 24h            | 48h |            |  |                                 | 24h            | 48h |  |
| <b>1a</b> | H  | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 100            | 100 | <b>5a</b> | H  | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 2              | 3   | <b>9a</b>  | H  | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 100            | 100 |  |
| <b>1b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 100            | 100 | <b>5b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 1              | 2   |            |  |                                 |                |     |  |
| <b>1c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 100            | 100 | <b>5c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 1              | 2   | <b>9c</b>  |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 100            | 100 |  |
| <b>1e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 16             | 30  | <b>5e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0              | 0   | <b>9c</b>  |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 17             | 32  |  |
| <b>2a</b> | 4-NO <sub>2</sub>                        | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 99             | 100 | <b>6a</b> | 4-NO <sub>2</sub>                        | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 20             | 35  | <b>10a</b> | 4-NO <sub>2</sub>                        | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 93             | 100 |  |
| <b>2b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 77             | 94  | <b>6b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 17             | 32  |            |  |                                 |                |     |  |
| <b>2c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 35             | 58  | <b>6c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 3              | 5   | <b>10c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 54             | 79  |  |
| <b>2e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 19             | 34  | <b>6e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 2              | 3   |            |  |                                 |                |     |  |
| <b>3a</b> | 3,5-dNO <sub>2</sub>                     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 93             | 99  | <b>7a</b> | 3,5-dNO <sub>2</sub>                     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 52             | 77  | <b>11a</b> | 3,5-dNO <sub>2</sub>                     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 16             | 30  |  |
| <b>3b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 19             | 34  | <b>7b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 18             | 33  |            |  |                                 |                |     |  |
| <b>3c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 10             | 19  | <b>7c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 3              | 5   | <b>11c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 17             | 31  |  |
| <b>3d</b> |  | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 5              | 9   | <b>7d</b> |  | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 1              | 2   |            |  |                                 |                |     |  |
| <b>3e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 4              | 8   | <b>7e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 1              | 2   | <b>11e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 9              | 17  |  |
| <b>3f</b> |  | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> | 3              | 6   | <b>7f</b> |  | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> | 1              | 2   |            |  |                                 |                |     |  |
| <b>3g</b> |  | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> | 2              | 4   | <b>7g</b> |  | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> | 0              | 0   |            |  |                                 |                |     |  |
| <b>4a</b> | 3-NO <sub>2</sub> -<br>5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 95             | 100 | <b>8a</b> | 3-NO <sub>2</sub> -<br>5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 23             | 41  | <b>12a</b> | 3-NO <sub>2</sub> -<br>5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 7              | 14  |  |
| <b>4b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 15             | 27  | <b>8b</b> |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 7              | 14  |            |  |                                 |                |     |  |
| <b>4c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 8              | 16  | <b>8c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 5              | 11  | <b>12c</b> |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 9              | 17  |  |
| <b>4d</b> |  | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 5              | 10  | <b>8d</b> |  | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 2              | 3   |            |  |                                 |                |     |  |
| <b>4e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 3              | 6   | <b>8e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 1              | 3   | <b>11e</b> |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 4              | 7   |  |

Ao comparar estabilidade em homogenato de *M. smegmatis* de ésteres e tioésteres entre si (Figura 57), verificou-se que os ésteres e tioésteres derivados de ácido benzóico não substituído apresentam estabilidade semelhante (Figura 57:A). Nos derivados de ácido benzóico 4-nitrosubstituídos (Figura 57:B) observa-se uma situação semelhante. Os ésteres derivados de ácido 3,5-dinitrobenzóico (Figura 57:C) e derivados de ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico (Figura 57:D) degradam mais rapidamente do que os tioésteres, que praticamente não mostram degradação em homogenato de *M. smegmatis*. As amidas são extremamente estáveis em homogenato de *M. smegmatis* e apenas as cadeias curtas apresentam os primeiros sinais de degradação conforme se pode depreender da Tabela 19.

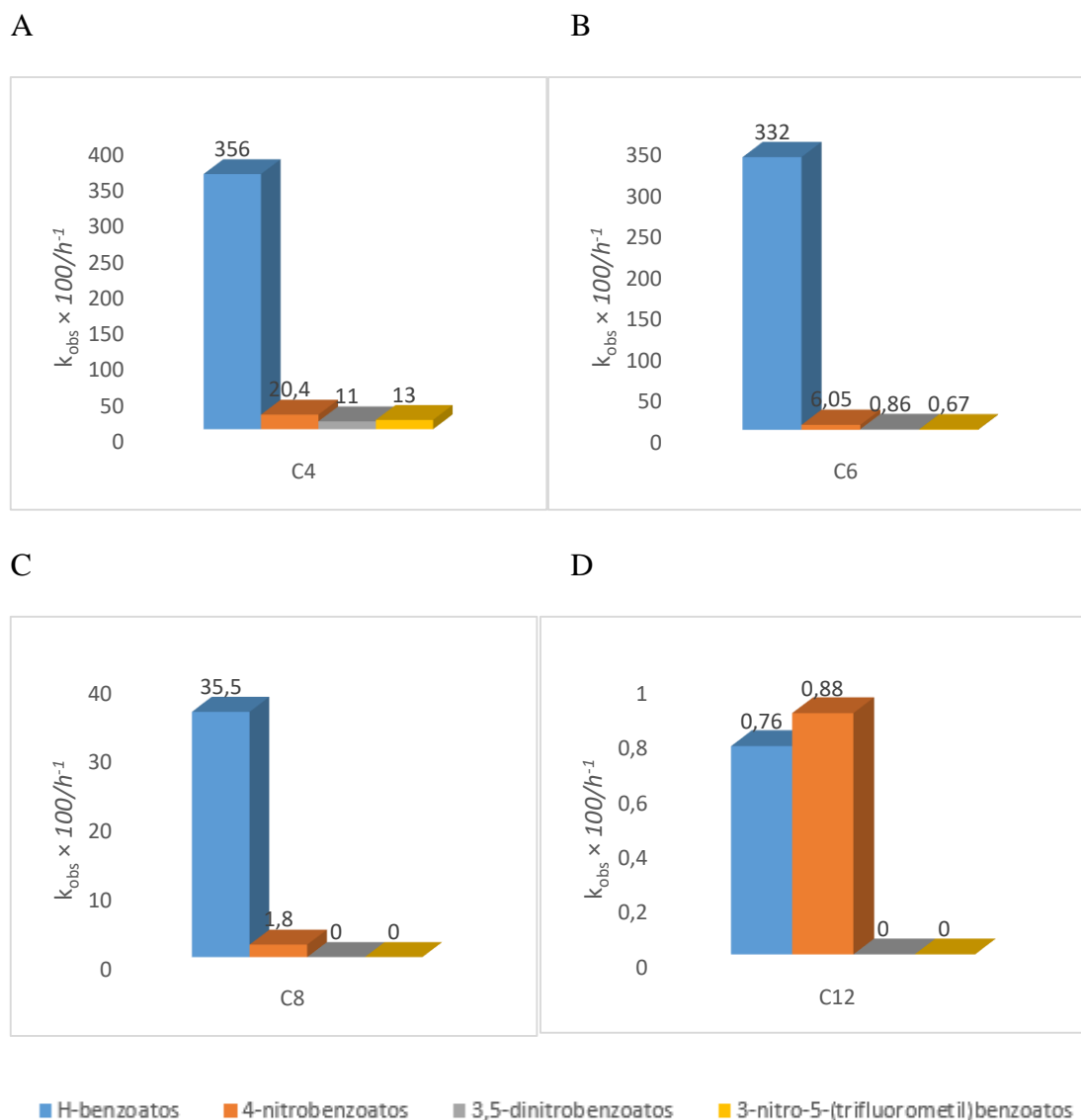


**Figura 57** Estudo da estabilidade enzimática comparativo dos ésteres, tioésteres e amidas de derivados de ácido benzóico substituído em homogenato de *M. smegmatis*:  
**A.** Derivados de ácido benzóico; **B.** Derivados de ácido 4-nitrobenzóico; **C.** Derivados de ácido 3,5-dinitrobenzóico; **D.** Derivados de ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)-benzóico.

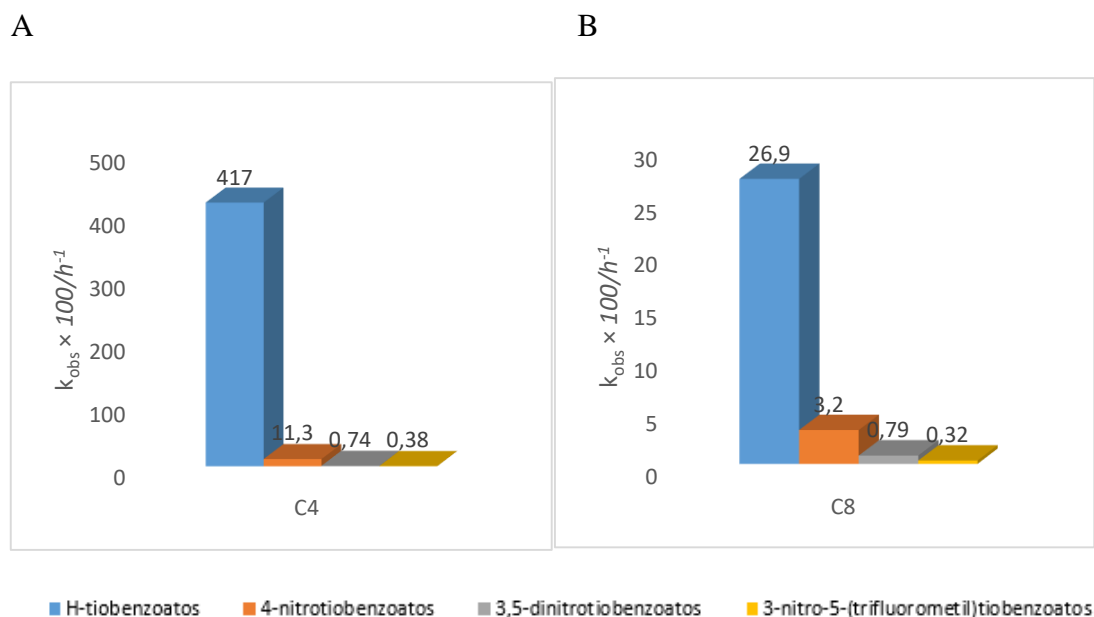
Ao avaliar os diferentes substituintes no anel aromático no estudo de estabilidade em homogenato de *M. smegmatis* verificou-se que entre os ésteres (Figura 58) os compostos que apresentam menor estabilidade são derivados de ácido benzóico não substituído os derivados de ácido 4-nitrobenzóico apresentam alta estabilidade e mais estáveis são derivados de ácido 3,5-dinitrobenzóico e de ácido 3-nitro-5(trifluorometil)benzóico (Figura 58). Os grupos volumoso (NO<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>) poderão diminuir a afinidade do composto com enzima, relacionado com impedimento estérico formado pelo estes grupos.

Entre os tioésteres (Figura 59) os compostos que apresentam menor estabilidade são derivados de ácido benzóico não substituído, os derivados de ácido 4-nitrobenzóico apresentam alta estabilidade e derivados de ácido 3,5-dinitrobenzóico e de ácido 3-nitro-5(trifluorometil)benzóico são extremamente estáveis.

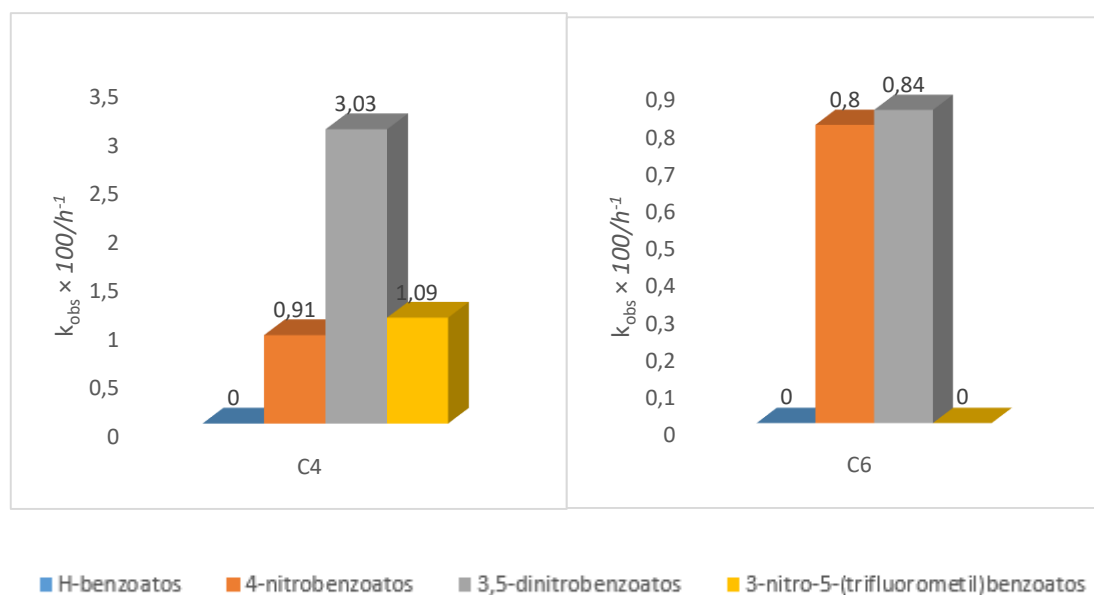
Curiosamente, as amidas derivadas de ácido benzóico não substituído não demonstram nenhuma degradação (ao contrário com os ésteres e tioésteres) e outras amidas, derivadas de ácido 4-nitrobenzóico, de ácido 3,5-dinitrobenzóico e de ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico demonstram baixo nível de degradação entre as quais as amidas 3,5-dinitrosubstituídas são menos estáveis (Figura 60).



**Figura 58** Estudo da estabilidade enzimática em homogenato de *M. smegmatis* dependendo dos substituintes no anel aromático no exemplo dos ésteres:  
**A.** quatro átomos de carbonos na cadeia alquílica; **B.** seis átomos de carbonos na cadeia alquílica; **C.** oito átomos de carbonos na cadeia alquílica; **D.** doze átomos de carbonos na cadeia alquílica.



**Figura 59** Estudo da estabilidade enzimática em homogenato de *M. smegmatis* dependendo dos substituintes no anel aromático no exemplo dos tioésteres:  
**A.** quatro átomos de carbonos na cadeia alquílica; **B.** oito átomos de carbonos na cadeia alquílica.

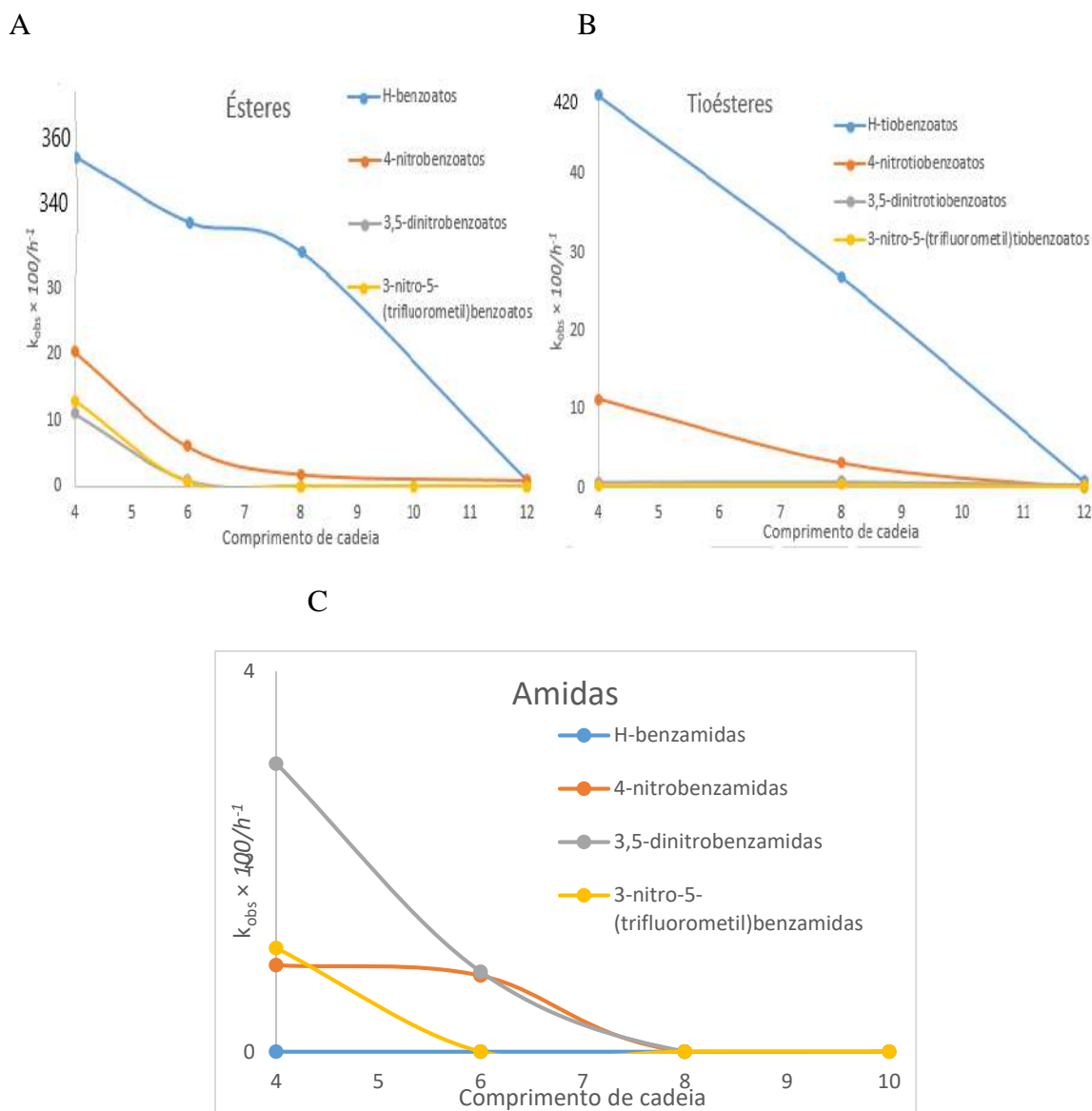


**Figura 60** Estudo da estabilidade enzimática em homogenato de *M. smegmatis* dependendo dos substituintes no anel aromático no exemplo das amidas:  
**A.** quatro átomos de carbonos na cadeia alquílica; **B.** seis átomos de carbonos na cadeia alquílica.

Ao analisar os resultados obtidos na Tabela 19 foi concluído que a estabilidade aumenta com o aumento de cadeia alquílica, ou seja, aumento de lipofilia (Figura 61), que foi observado em todos os compostos testados. Para moléculas com estrutura semelhante, em que apenas se varia o comprimento do grupo alquilo, quanto maior o número

de carbonos, maior a lipofilia das moléculas (valores de Log P aumentam).<sup>293</sup> As amidas apresentam alto nível de estabilidade e degradação apresentam apenas os compostos com cadeias curtas. (Figura 61:C).

Os compostos que apresentam menor estabilidade em homogenato de *M. smegmatis* são ésteres (Figura 61:A) e tioésteres (Figura 61:B) derivados de ácido benzoico não substituído. Por exemplo, o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) para H-benzoato de butilo (**1a**) corresponde apenas 12 minutos e para H-tiobenzoato de butilo (**9a**) apenas 10 minutos respectivamente. Os compostos derivados de ácido 4-nitrobenzóico apresentam alta estabilidade. Entre os ésteres e tioésteres testados em homogenato de *M. smegmatis* os compostos que apresentam maior estabilidade são derivados de ácido 3,5-dinitrobenzóico e derivados de ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico, entre os quais é observada apenas degradação significativa no 3,5-dinitrobenzoato de butilo (**3a**) ( $t_{1/2}$ =6,32 horas) e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoato de butilo (**4a**) ( $t_{1/2}$ =5,36 horas). As amidas, como foi dito anteriormente, apresentam alto nível de estabilidade em homogenato de *M. smegmatis* e apresentam degradação apenas nos compostos com cadeias curtas. A degradação significativa é observada apenas em N-butil 3,5-dinitrobenzamida (**7a**).



**Figura 61** Estudo da estabilidade enzimática em homogenato de *M. smegmatis* dependendo do comprimento de cadeia alquílica:

A. Ésteres; B. Tioésteres; C. Amidas.

#### 2.7.4 A razão entre velocidades de degradação em plasma humano e em homogenato de *M. smegmatis*.

Para avaliar a sua capacidade atuar com pró-fármacos foi realizada uma análise comparativa das velocidades de hidrólise em plasma humano e homogenato de *M. smegmatis*. Um bom pró-fármaco destinado a ser ativado pelas micobactérias precisa de ser estável em plasma humano, mas suficientemente lábil frente às esterases micobacterianas para sofrer ativação pelas mesmas. O presente estudo relata os resultados e hidrólise dos ésteres (Tabela 20; Figura 62) e tioésteres (Tabela 21; Figura 63). As amidas não foram analisados nesse estudo devido ao facto que as amidas não

apresentaram degradação em plasma humano durante 72h de estudo (Tabela 17) e apenas apresentam uma degradação residual durante 48h em homogenato de *M. smegmatis* (Tabela 19).

Na Tabela 20 estão representadas as constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem dos ésteres ( $k_{obs} \times 100 \text{ h}^{-1}$ ) para ensaio de estabilidade em plasma humano e para ensaio de estabilidade em homogenato de *M. smegmatis* assim como a razão entre as mesmas constantes ( $k_{obs}$ ) e a constante de velocidade de pseudo-primeira ordem para benzoato de butilo (**1a**) ( $M(k_{obs}/k_{obs1a})$ ) no mesmo meio biológico e sua finalidade é obter uma razão que permita eliminar da análise o efeito de diferentes concentrações de esterase em cada um dos dois meios biológicos utilizados. Com base nos dados obtidos na Tabela 20, foram construídos os gráficos na Figura 62 para cada série dos ésteres testados: H-benzoatos (Figura 62:A), 4-nitrobenzoatos (Figura 62:B), 3,5-dinitrobenzoatos (Figura 62:C), 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoatos (Figura 62:D).

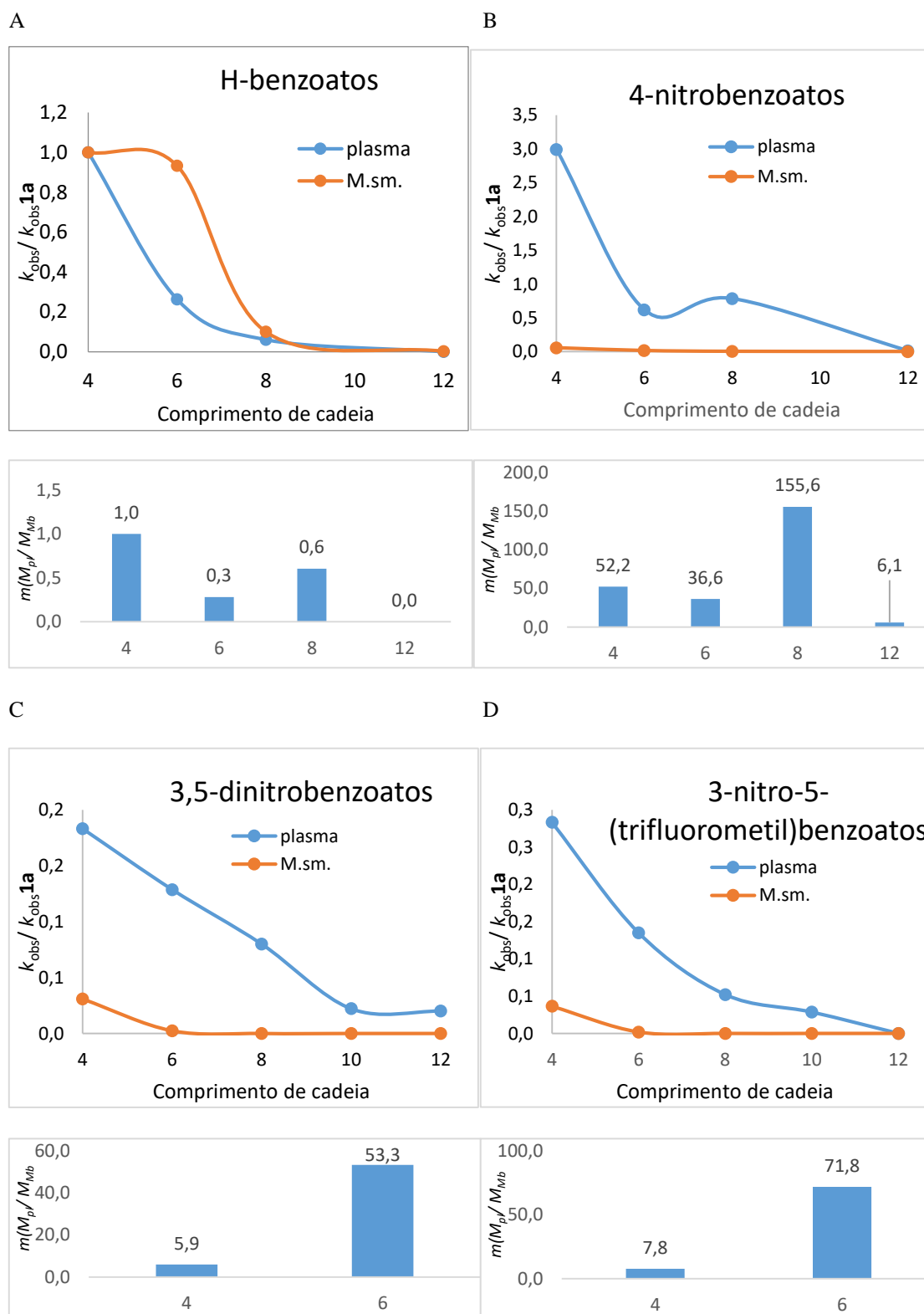
Ao avaliar os gráficos construídos verificou-se que apenas os ésteres derivados de ácido benzóico não substituído (Figura 62:A) demonstram degradar mais rápido em homogenato de *M. smegmatis* do que em plasma humano. Usando os valores ( $M$ ) da Tabela 20, calculou-se a razão entre ( $M$ ) para o mesmo composto no plasma humano sobre o homogenato micobacteriano de  $m(M_{pl}/M_{Mb})$ . Um valor  $m$  alto condiz com um fármaco que pode ser facilmente degradado em plasma humano, mas apresentam estabilidade em homogenato de *M. smegmatis*. Por exemplo, para o 4-nitrobenzoato de octilo (**2c**) o valor  $m=155,6$ , o que significa que o composto **2c** degrada 155,6 vezes mais rapidamente em plasma humano do que em homogenato de *M. smegmatis* (Figura 62:B).

**Tabela 20 Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem ( $k_{obs} \times 100 \text{ h}^{-1}$ ) dos ésteres nos estudos de estabilidade enzimática em plasma humano e em homogenato de *M. smegmatis* e a razão entre as mesmas constantes ( $k_{obs}$ ) e a constante de velocidade pseudo-primeira ordem para H-benzoato de butilo (**1a**)  $M(k_{obs}/k_{obs1a})$  no mesmo meio biológico.**

| ésteres   | X                               | R                               | $k_{obs} \times 100$<br>( $\text{h}^{-1}$ )/(plasma) | $M_{pl}$<br>( $k_{obs}/k_{obs1a}$ ) | $k_{obs} \times 100$<br>( $\text{h}^{-1}$ )/( <i>M.sm</i> ) | $M_{Mb}$<br>( $k_{obs}/k_{obs1a}$ ) | $m(M_{pl}/M_{Mb})$ |
|-----------|---------------------------------|---------------------------------|--|-------------------------------------|---|-------------------------------------|--------------------|
| <b>1a</b> | H                               | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 44,1 ± 6,1   | 1,000                               | 356 ± 17  | 1,000                               | 1,0                |
| <b>1b</b> |                                 | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 11,6 ± 1,2   | 0,263                               | 332 ± 19  | 0,933                               | 0,3                |
| <b>1c</b> |                                 | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 2,66 ± 0,23  | 0,060                               | 35,5 ± 0,3  | 0,100                               | 0,6                |
| <b>1e</b> |                                 | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | n/d  | -                                   | 0,76 ± 0,02   | 0,002                               | -                  |
| <b>2a</b> |                                 | 4-NO <sub>2</sub>               | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>                        | 132 ± 6                             | 2,993   | 20,4 ± 3,3                          | 0,057              |
| <b>2b</b> | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  |                                 | 27,4 ± 5,8   | 0,621                               | 6,05 ± 0,31   | 0,017                               | 36,6               |
| <b>2c</b> | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  |                                 | 9,73 ± 1,20  | 0,787                               | 1,80 ± 0,38   | 0,005                               | 155,6              |
| <b>2e</b> | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> |                                 | 0,66 ± 0,10  | 0,015                               | 0,88 ± 0,05   | 0,002                               | 6,1                |

| <b>ésteres</b> | <b>X</b>                             | <b>R</b>                        | $k_{\text{obs}} \times 100$<br>(h <sup>-1</sup> )/(plasma) | $M_{pl}$<br>( $k_{\text{obs}}/k_{\text{obs1a}}$ ) | $k_{\text{obs}} \times 100$<br>(h <sup>-1</sup> )/(M.sm) | $M_{Mb}$<br>( $k_{\text{obs}}/k_{\text{obs1a}}$ ) | $m(M_{pl}/M_{Mb})$ |
|----------------|--------------------------------------|---------------------------------|--|---|--|---|--------------------|
| <b>3a</b>      | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 8,08 ± 0,29  | 0,183   | 11,0 ± 0,8   | 0,031   | 5,9                |
| <b>3b</b>      |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 5,68 ± 0,47  | 0,129   | 0,86 ± 0,06  | 0,002   | 53,3               |
| <b>3c</b>      |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 3,53 ± 0,44  | 0,080   | n/d  | -   | -                  |
| <b>3d</b>      |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 0,98 ± 0,07  | 0,022   | n/d  | -   | -                  |
| <b>3e</b>      |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0,89 ± 0,13  | 0,020   | n/d  | -   | -                  |
| <b>3f</b>      |                                      | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> | 0,97 ± 0,23  | 0,022   | n/d  | -   | -                  |
| <b>3g</b>      |                                      | C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> | n/d  | -   | n/d  | -   | -                  |
| <b>4a</b>      | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 12,5 ± 1,8   | 0,283   | 13,0 ± 1,1   | 0,037   | 7,8                |
| <b>4b</b>      |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 5,96 ± 1,28  | 0,135   | 0,67 ± 0,06  | 0,002   | 71,8               |
| <b>4c</b>      |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 2,30 ± 0,06  | 0,052   | n/d  | -   | -                  |
| <b>4d</b>      |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 1,26 ± 0,04  | 0,029   | n/d  | -   | -                  |
| <b>4e</b>      |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | n/d  | -   | n/d  | -   | -                  |

n/d – não degrada



**Figura 62** Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem de hidrólise dos ésteres em plasma humano e em homogenato de *M. smegmatis* normalizado em relação constante de velocidade de pseudo-primeira ordem para H-benzoato de butilo (1a) ( $k_{obs}/k_{obs,1a}$ ) no mesmo meio biológico.

**A.** Derivados de ácido benzóico; **B.** Derivados de ácido 4-nitrobenzóico; **C.** Derivados de ácido 3,5-dinitrobenzóico; **D.** Derivados de ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)-benzóico.

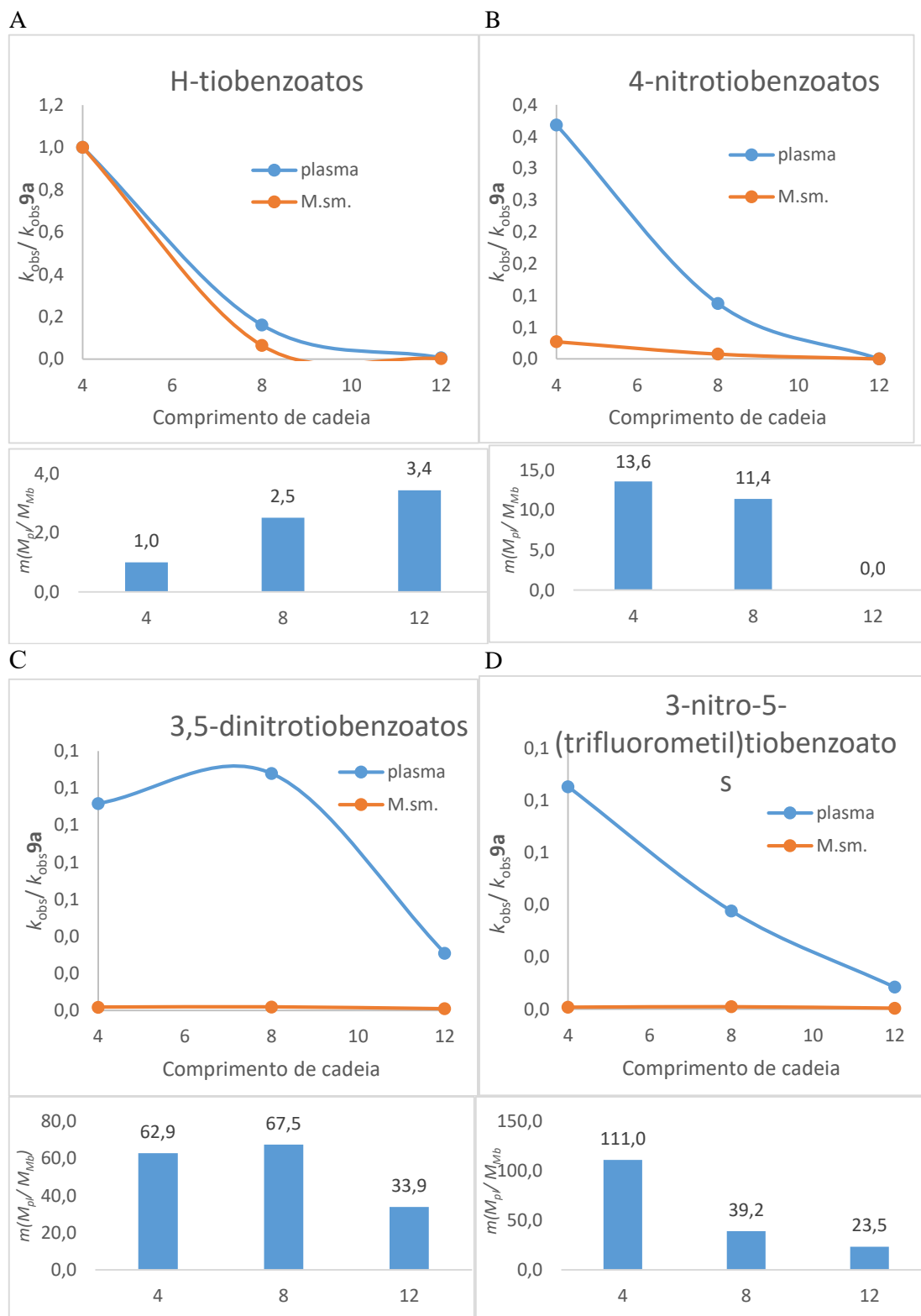
Para analisar os tioésteres foi criada a Tabela 21 que inclui as constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem ( $k_{\text{obs}} \times 100 \text{ h}^{-1}$ ) para ensaio de estabilidade em plasma humano e para ensaio de estabilidade em homogenato de *M. smegmatis* e a razão entre as mesmas constantes ( $k_{\text{obs}}$ ) e a constante de velocidade pseudo-primeira ordem para tiobenzoato de butilo (9a) ( $M$ ) ( $k_{\text{obs}}/ k_{\text{obs}9a}$ ) no mesmo meio biológico. A sua finalidade é obter uma razão que permita eliminar da análise o efeito de diferentes concentrações de esterase nos meios biológicos utilizados. Com base nos valores obtidos na Tabela 21, foram construídos os gráficos na Figura 63 para cada uma das séries dos tioésteres testados: H-tiobenzoatos (Figura 63:A), 4-nitrotiobenzoatos (Figura 63:B), 3,5-dinitrotiobenzoatos (Figura 63:C) e 3-nitro-5-(trifluorometil)tiobenzoatos (Figura 63:D).

Ao comparar a estabilidade enzimática dos tioésteres nos gráficos construídos pode-se afirmar que os tioésteres testados são mais estáveis em homogenato de *M. smegmatis* do que em plasma humano. Usando os valores ( $M$ ) da Tabela 21, calculou-se a razão entre ( $M$ ) para o mesmo composto em plasma humano sobre homogenato micobacteriano  $m_{(M_{\text{pl}}/ M_{\text{Mb}})}$ . Um valor  $m$  alto condiz com um fármaco que podem facilmente degradar em plasma humano, mas apresentam estabilidade em homogenato de *M. smegmatis*. Verificou-se que tiobenzoatos (Figura 63:A) apresentam baixos valores  $m$  ( $m=1$  para tiobenzoato de butilo,  $m=2,5$  para tiobenzoato de octilo e  $m=3,4$  para tiobenzoato de dodecilo), o que significa que estes compostos apresentam velocidades de degradação semelhantes em plasma humano e em homogenato micobacteriano. Pelo contrário, os 3,5-dinitrotiobenzoatos (Figura 63:C) e 3-nitro-5-(trifluorometil)tiobenzoatos (Figura 63:D) apresentem elevados valores  $m$ , o que significa que estes séries de compostos muito mais facilmente degradam em plasma humano do que em homogenato micobacteriano. Por exemplo, 3-nitro-5-(trifluorometil)tiobenzoato de butilo (12a) ( $m=111$ ) degrada 111 vezes mais rapidamente em plasma humano do que em homogenato de *M. smegmatis* (Figura 63:D).

**Tabela 21 Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem ( $k_{\text{obs}} \times 100 \text{ h}^{-1}$ ) dos tioésteres nos estudos de estabilidade enzimática em plasma humano e em homogenato de *M. smegmatis* e a razão entre as mesmas constantes ( $k_{\text{obs}}$ ) e a constante de pseudo-primeira ordem para tiobenzoato de butilo (9a) ( $k_{\text{obs}}/ k_{\text{obs}9a}$ ) no mesmo meio biológico.**

| tioésteres | X                                    | R                               | $k_{\text{obs}} \times 100$<br>( $\text{h}^{-1}$ )/(plasma) | $M_{\text{pl}}$<br>( $k_{\text{obs}}/ k_{\text{obs}9a}$ ) | $k_{\text{obs}} \times 100$<br>( $\text{h}^{-1}$ ) | $M_{\text{Mb}}$<br>( $k_{\text{obs}}/ k_{\text{obs}9a}$ ) | $m(M_{\text{pl}}/ M_{\text{Mb}})$ |
|------------|--------------------------------------|---------------------------------|---|---|--|---|-----------------------------------|
| 9a         | H                                    | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 92,3 ± 1,8  | 1,000   | 417 ± 10   | 1,000   | 1,0                               |
| 9c         |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 14,9 ± 0,9  | 0,161   | 26,9 ± 1,9   | 0,065   | 2,5                               |
| 9e         |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0,60 ± 0,07   | 0,007   | 0,79 ± 0,08  | 0,002   | 3,4                               |
| 10a        | 4-NO <sub>2</sub>                    | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 34,5 ± 1,3  | 0,368   | 11,3 ± 0,8   | 0,027   | 13,6                              |
| 10c        |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 8,08 ± 0,21   | 0,088   | 3,20 ± 0,11  | 0,008   | 11,4                              |
| 11a        | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 10,3 ± 1,9  | 0,112   | 0,74 ± 0,03  | 0,002   | 62,9                              |
| 11c        |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 11,8 ± 1,9  | 0,128   | 0,79 ± 0,02  | 0,002   | 67,5                              |
| 11e        |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 2,85 ± 0,21   | 0,031   | 0,38 ± 0,02  | 0,001   | 33,9                              |
| 12a        | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 7,86 ± 0,64   | 0,085   | 0,32 ± 0,03  | 0,001   | 111,0                             |
| 12c        |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 3,47 ± 0,54   | 0,038   | 0,40 ± 0,02  | 0,001   | 39,2                              |
| 12e        |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0,78 ± 0,01   | 0,008   | 0,15 ± 0,01  | 0,000   | 23,5                              |

n/d – não degrada



**Figura 63** Constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem de hidrólise dos tioésteres em plasma humano e em homogenato de *M. smegmatis* normalizado em relação constante de velocidade de pseudo-primeira ordem para tiobenzoato de butilo (9a) ( $k_{obs}/k_{obs9a}$ ) no mesmo meio biológico.

**A.** Derivados de ácido benzóico; **B.** Derivados de ácido 4-nitrobenzóico; **C.** Derivados de ácido 3,5-dinitrobenzóico; **D.** Derivados de ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)-benzóico.

## 2.8 Ensaaios de atividade *in vitro*

### 2.8.1 Ensaaios de atividade em *M. tuberculosis*

Os estudos de atividade antimicobacteriana foram realizados pelo Doutor David Pires do grupo de investigação Host-Pathogen Interaction da Faculdade de Farmácia Universidade de Lisboa. Os procedimentos experimentais dos estudos de atividade encontram-se descritos no Subcapítulo 3.4 do Procedimento Experimental.

Com o intuito de avaliar se os derivados sintetizados dos ácidos benzóicos substituídos inibiam o crescimento ou se levavam à morte da micobactéria, foram feitos ensaios de atividade *in vitro*, usando a estirpe *M. tuberculosis* H37Rv. Os resultados dos ensaios de atividade estão representados em Concentração Inibitória Mínima (CIM) e em Concentração Bactericida Mínima (CBM), em  $\mu\text{g/mL}$ , na Tabela 22.

CIM - é a mais baixa concentração de um composto responsável por limitar o crescimento visível de uma bactéria (ou seja, que tem atividade bacteriostática). CBM corresponde à concentração mínima de agente antimicrobiano que resulta na morte bacteriana (ou seja, a concentração a partir da qual um agente é bactericida). Quanto mais próximos forem os valores destas duas variáveis, mais letal será o antibiótico.



A partir da observação dos resultados da Tabela 22, verificou-se inesperadamente que os compostos que apresentam maior atividade são amidas derivadas de ácido 3,5-dinitrobenzóico e derivadas de ácido 3-nitro-5-(trifluorometil) benzóico (Figura 64:B; Figura 65:C; Figura 65:D). Os resultados do estudo de atividade destes compostos foram encorajadores, pois os valores de CIM (de 2 µg/mL a 0.016 µg/mL) que apresentam estas séries de compostos são muito baixos, sendo que alguns dos compostos demonstraram no ensaio uma atividade superior à isoniazida (CIM ≈ 0.05). A isoniazida é um fármaco de primeira linha de tratamento de tuberculose que foi usado como um controle positivo nesse ensaio. As amidas derivadas de ácido benzóico e de ácido 4-nitrobenzóico apresentam um nível de atividade bastante inferior (Figura 64:B; Figura 65:A; Figura 65:B).

Foi observado que, todas as amidas aumentam a sua atividade com aumento da cadeia alcoxílica até cerca de oito átomos de carbono (cerca de seis átomos de carbono no caso de amidas derivadas de ácido benzóico não substituído), e diminuíram além deste ponto. O aumento da atividade destes compostos pode ser explicado pela maior capacidade de penetração dos compostos nas membranas das micobactérias devido ao aumento da sua lipofilia. Fármacos muito hidrofílicos são pouco absorvidos, devido à sua impossibilidade de atravessar membranas celulares ricas em lípidos.<sup>294</sup> Depois de oito átomos de carbono, a atividade das amidas diminuiu com o aumento da lipofilia. Possivelmente estes compostos (C12 a C16) são demasiado lipofílicos e difundem dificilmente nas membranas celulares bacterianas, uma vez que em condições de lipofilia em excesso, a solubilidade dos ésteres é reduzida em água.<sup>303</sup> Logo a difusão dos ésteres através da parede celular bacteriana é dificultada e compromete a sua atividade.<sup>293, 303</sup> Para que um fármaco seja bem absorvido, ele deve ser basicamente lipofílico, mas ter alguma solubilidade em soluções aquosas.<sup>294</sup> Assim os compostos que conferem a lipofilia ótima são derivados de ácido benzóico substituído, com cadeia alcoxílica de C6 a C10. Os compostos onde se obtiveram menores valores de CIM foram as amidas derivadas de ácido 3,5-dinitrobenzóico com 6, 8 e 10 (**7b,7c,7d**) carbonos na cadeia alcoxílica, respetivamente.

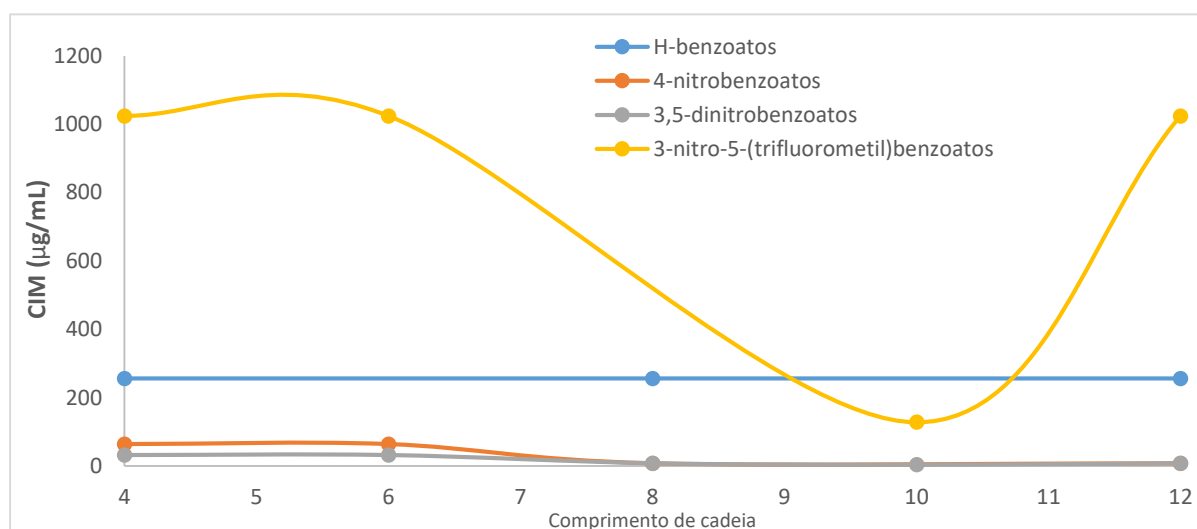
Os ésteres mais eficazes contra a estirpe estudada foram os 3,5-dinitrobenzoatos e os 4-nitrobenzoatos (Figura 64:A). Curiosamente, que os ésteres derivados de ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico não apresentaram nenhuma atividade ao contrário das amidas derivadas do mesmo ácido. A atividade comparativa entre ésteres e amidas pode ser observada na Figura 65.

Todos os tioésteres testados não apresentam atividade significativa e têm valores de CIM superiores aos valores de CIM dos ésteres derivados dos mesmos ácidos (Tabela 22).

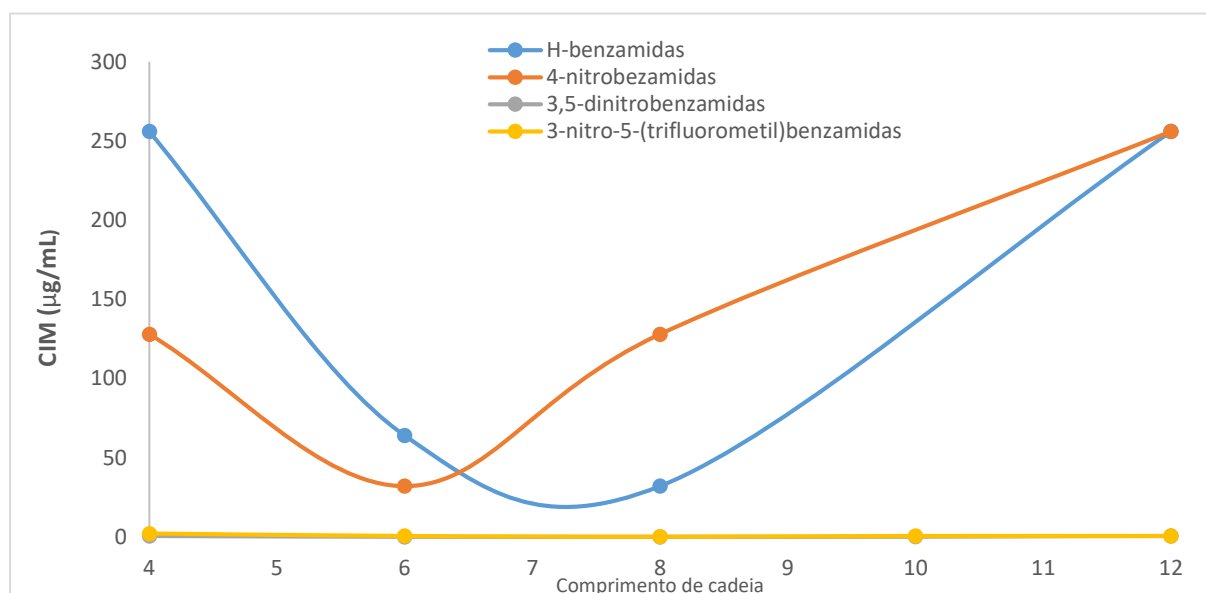
Em relação aos resultados de CBM, os compostos que mostraram apresentar maior atividade foram as 3,5-dinitrobenzamidas e as 3-nitro-5(trifluorometil)-benzamidas, sendo que os valores de CIM e de CBM obtidos são muito próximos. Se os valores obtidos de CIM

e de CBM foram iguais ou próximos, tal indica que o composto é bactericida porque a concentração que inibe o crescimento é a mesma que provoca a morte bacteriana. Se os valores obtidos de CIM e de CBM forem muito afastados, a concentração que inibe o crescimento não tem efeito na viabilidade bacteriana, pelo que o efeito observado é bacteriostático. Neste estudo, observou-se que todos os compostos testados, exceto os compostos **2c**, **2e**, **3a** e **3f** e , são compostos bactericidas (sendo que **2c**, **2e**, **3a** e **3f** são classificados como bacteriostáticos).

A

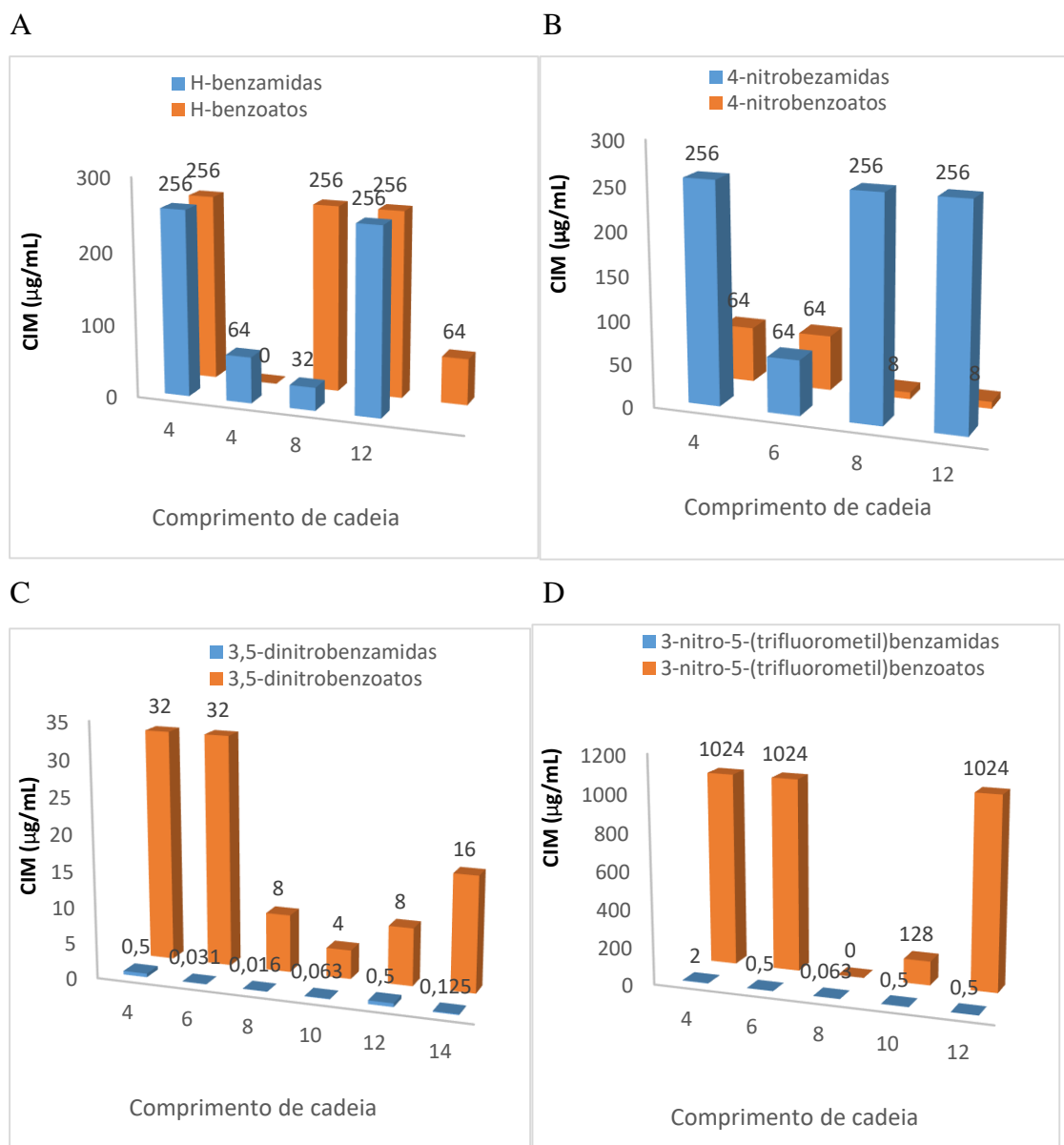


B



**Figura 64** Atividade dos compostos dependendo do comprimento de cadeia alquílica apresentado em CIM (µg/mL):

A. Ésteres; B. Amidas.



**Figura 65** Atividade comparativa entre ésteres e amidas com diferentes cadeias alquílicas (de 4 a 14 átomos de carbono) apresentado em CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ):  
**A.** Derivados de ácido benzóico; **B.** Derivados de ácido 4-nitrobenzóico; **C.** Derivados ácido 3,5-dinitrobenzóico; **D.** Derivados de ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico.

### 2.8.2 Ensaio de atividade comparativo em várias estirpes micobacterianas.

Ao avaliar os resultados de estabilidade e atividade dos compostos testados, verificou-se que não exista a relação entre estabilidade, ativação e atividade nos compostos testados. Esta observação não é compatível atuação dos compostos como pró-fármacos libertando um ácido fraco. Surgiu a ideia que os compostos que apresentam maior atividade (3,5-dinitrobenzamidas e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzamidas) não necessitam de hidrólise enzimática e atuam por outro mecanismo de ação. Uma explicação atrativa para a sua

atividade seria terem um mecanismo de ação semelhante às benzotiazinonas (BTZ) (1.2.4.3), ou às dinitrobenzamidas como a DNB1, fármacos já conhecidos na terapia antimicobacteriana e que atuam na decaprenilfosforil- $\beta$ -d-ribose 2'-epimerase DprE1). É de notar que as dinitrobenzamidas (DNB) que têm similaridade estrutural com os compostos testados nesta tese.

A DprE1 é uma enzima vital para a síntese da parede celular, desempenha um papel crucial na formação de lipoarabinomanano e arabinogalactano. Catalisa uma reação de epimerização única que resulta na síntese de decaprenilfosforil arabinose, o único doador de resíduos de arabinosil para acumulação de arabinanos, componentes fundamentais da parede celular micobacteriana.<sup>287</sup>

O grupo nitro das benzotiazinonas e das dinitrobenzamidas é convertido em nitroso pela enzima (nitrorredutase), que faz uma interação covalente com o resíduo Cys387, causando a inativação da enzima. (Figura 39)<sup>259,260</sup>

Uma primeira abordagem para verificar se a DprE1 poderia ser um alvo para os nossos compostos mais ativos consistiu em realizar um estudo de atividade dos compostos sobre micobactérias com diferentes suscetibilidades aos fármacos conhecidos que atuam sobre a DprE1 e verificar se os nossos compostos seguiriam a mesma tendência.

Foi realizado uma experiência em que se testou a atividade dos compostos sobre quatro espécies de micobactérias: *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis*: espécie *M. avium* DSM não possui o gene que codifica para Cys387 na enzima DprE1 sendo a cisteína é substituída por alanina.<sup>288</sup> Essas mutações conferem resistência natural aos compostos testados. *M. smegmatis* mc2 possui superexpressão da nitrorredutase NfnB levando à potencial inativação do fármaco por redução de um grupo nitro a um grupo amino.<sup>289</sup> As outras duas espécies (*M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37Rv) são suscetíveis a inibidores da DprE1.

Ao avaliar os valores obtidos na Tabela 23 verificou-se que amidas testados apresentaram alta atividade em *M. bovis* e *M. tuberculosis*, no entanto, a atividade perde-se completamente em *M. avium*, que tem mutação na enzima DprE1. Os resultados semelhantes foram apresentados pelo benzotiazinona BTZ047 que foi testado por *Caroline et al*, onde o BTZ047 apresentou alta atividade em *M. tuberculosis*, no entanto, a atividade perdeu-se em *M. avium* onde o resíduo Cys387 é substituída por alanina.<sup>288</sup> Pois, o resíduo C387 de DprE1 é necessário para a interação covalente com inibidores nitroaromáticos e substituições neste resíduo conferem resistência aos compostos testados.

Apesar da atividade em *M. smegmatis* não se perder completamente, é diminuída o que pode significar que alguma quantidade de composto sofreu a redução de grupo nitro antes de entrar ao sítio ativo de DprE1. Em particular, foi mostrado que a superexpressão da NfnB nitrorredutase dependente de FMN em *M. smegmatis* talvez seja um novo mecanismo para resistência parcial de compostos testados envolvendo inativação de compostos, além da já marcado em cima substituição de aminoácido para Cys387 DprE. Como o grupo nitroaromático é necessário para a atividade antimicrobiana desses compostos o possível desenvolvimento de resistência devido à superexpressão da nitrorredutase é um problema que deve ser considerado.

O conjunto destes resultados indica que o alvo para os nossos compostos mais ativos poderá ser a enzima DprE1. Evidentemente serão necessários outros estudos fora do âmbito desta tese para comprovar o alvo dos compostos.

**Tabela 23 Resultados obtidos dos ensaios de atividade in vitro, em *M. avium* DSM 44156, *M. smegmatis* mc2 155, *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv, dos valores obtidos de CIM em µg/mL e dos valores obtidos de CBM em µg/mL.**

| compo<br>sto                   | R                               | <i>M. avium</i> DSM<br>44156 |                | <i>M. smegmatis</i><br>mc2 155 |                | <i>M. bovis</i> BCG |                | <i>M. tuberculosis</i><br>H37Rv |                |
|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------|----------------|--------------------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------------------|----------------|
|                                |                                 | MIC<br>[µg/mL]               | MBC<br>[µg/mL] | MIC<br>[µg/mL]                 | MBC<br>[µg/mL] | MIC<br>[µg/mL]      | MBC<br>[µg/mL] | MIC<br>[µg/mL]                  | MBC<br>[µg/mL] |
| <b>BTZ<br/>043<sup>a</sup></b> |                                 | >100                         |                |                                |                |                     |                | 0,002                           |                |
| <b>7a</b>                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 64                           | 512            | 4                              | 4              | 0.5                 | 1              | 0.5                             | 0.5            |
| <b>7b</b>                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | ND                           | ND             | 1                              | 1              | 0.25                | 0.25           | ≤0,5                            | ≤0,5           |
| <b>7c</b>                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 32                           | 64             | 0,25                           | 4              | 0,015               | 0,015          | ≤0,062                          | ≤0,062         |
| <b>7d</b>                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | ND                           | ND             | 1                              | 1              | 0,062               | 0,062          | ≤0,5                            | ≤0,5           |
| <b>7e</b>                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | >341                         | >341           | 0,66                           | >2,66          | 0,083               | 0,166          | 0,5                             | 0,5            |
| <b>7f</b>                      | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> | ND                           | ND             | 1                              | 4              | 0.25                | 0.25           | ≤0,5                            | ≤0,5           |
| <b>7g</b>                      | C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> | ND                           | ND             | 32                             | >64            | 2                   | 4              | 2                               | 2              |

ND – Não apresentam atividade.

a - Caroline Shi-Yan Foo et al. <sup>288</sup>

### 2.8.3 Ensaios de atividade em macrófagos

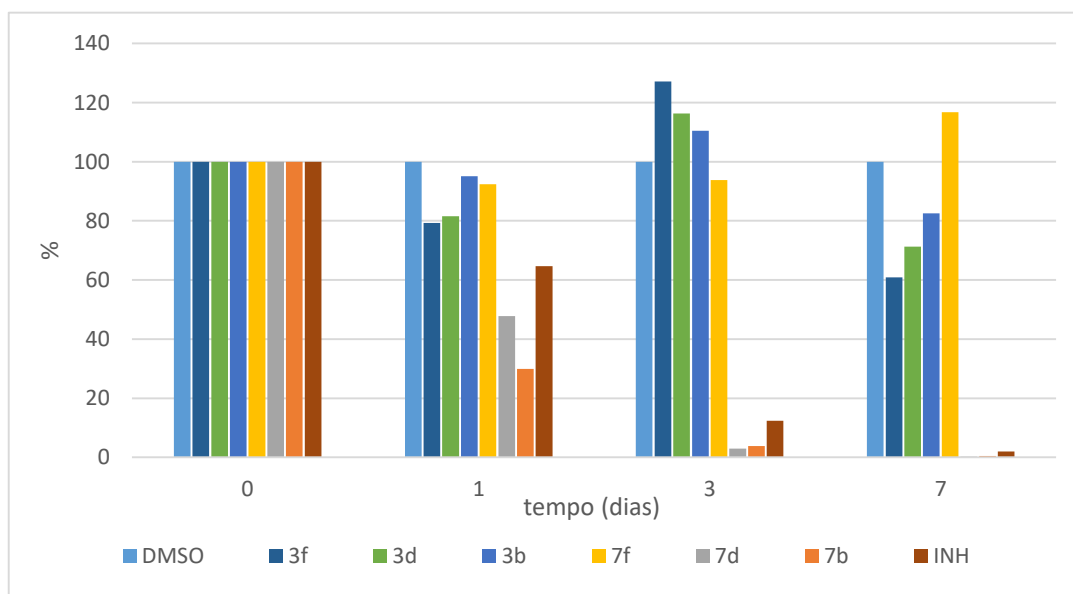
Para avaliar a sua capacidade dos compostos em estudo atuarem dentro de célula hospedeiro foi avaliada atividade em macrófagos humanos THP-1 infectados pelo *M. bovis* BCG. Foram avaliados três ésteres (3,5-dinitrobenzoato de hexilo (**3b**), 3,5-dinitrobenzoato de decilo (**3d**), 3,5-dinitrobenzoato de tetradecilo (**3f**)) e três amidas (N-hexil-3,5-dinitrobenzamida (**7b**), N-decetil-3,5-dinitrobenzamida (**7d**), N-tetradecil-

3.5-dinitrobenzamida (**7f**) derivados de ácido 3.5-dinitrobenzóico. Como controle negativo foi usado **DMSO** e como controle positivo foi usado **isoniazida (INH)**.

A Figura 66 mostra os efeitos antimicrobacterianos na estirpe suscetível nos macrófagos THP-1. A percentagem de sobrevivência intracelular é representada nos dias 0, 1, 3 e 7.

Os compostos **7b** e **7d** apresentaram atividade antimicrobacteriana aproximadamente 50% maior que **isoniazida** (Figura 66). Esta atividade foi mantida durante toda a experiência. O composto **7f**, provavelmente, não apresente atividade por ser demasiado lipofílico. Fármacos muito hidrofílicos são pouco absorvidos, devido à sua impossibilidade de atravessar membranas celulares ricas em lípidos. Paradoxalmente, os fármacos extremamente lipofílicos são também pouco absorvidos, pois são totalmente insolúveis nos líquidos aquosos do organismo, portanto, não têm acesso à superfície das células. Para que um fármaco seja bem absorvido, ele deve ser basicamente lipofílico, mas ter alguma solubilidade em soluções aquosas.<sup>294</sup> Os ésteres testados não apresentam atividade em macrófagos.

Os valores em CFU<sup>7</sup> são apresentados na Tabela 32 do anexo A7.



**Figura 66 Atividade antimicrobiana intracelular de compostos testados contra *Mycobacterium bovis* BCG infetando macrófagos humanos THP-1. Os resultados apresentados em percentagem.**

<sup>7</sup> Uma unidade formadora de colônia (CFU, UFC, Cfu) é uma unidade usada em microbiologia. Ele avalia o número de bactérias viáveis ou células fúngicas numa amostra que podem se multiplicar por fissão binária sob condições controladas.

## 2.9 Ensaios de citotoxicidade

A metabolização de nitrocompostos pode levar à formação de intermediários tóxicos, genotóxicos, mutagénicos e/ou carcinogénicos<sup>209,210</sup> e esta é indubitavelmente a razão para evitar estes compostos na maior parte dos casos. Muitos nitrocompostos podem gerar espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio (ERO e ERNs, respetivamente) que podem reagir com biomoléculas.<sup>211</sup> Desta forma, esses compostos têm atraído considerável atenção devido ao seu risco potencial para a saúde humana.<sup>167</sup> (1.2.4.1.3)

Para se estudar se os ésteres/amidas derivados de nitro BA apresentaram toxicidade procedeu-se ao estudo de citotoxicidade destes ésteres em linha celular monocítica humana THP-1 (ATCC56 TIB202). Os resultados de citotoxicidade foram obtidos através da concentração letal para 50% da população de células,  $CL_{50}$ .<sup>286</sup> Quanto mais baixo for o valor de  $CL_{50}$ , menor é a concentração letal do composto utilizada na morte celular de macrófagos THP-1 in vitro em 50% das células, pelo que o composto aplicado será mais tóxico para as células.

Na Tabela 24 estão apresentados os valores de concentração letal a 50% ( $CL_{50}$ ) em  $\mu\text{g/mL}$ , concentração inibitória mínima (CIM) em  $\mu\text{g/mL}$  e índice de toxicidade/atividade (T/A). O índice T/A quantitativamente é razão entre a concentração tóxica ( $CL_{50}$ ) dada pela concentração inibitória mínima (CIM). Um T/A baixo indica que potencialmente os compostos que se podem atingir níveis tóxicos com extrema facilidade.

Verificou-se que os ésteres testados não apresentaram toxicidade nas doses máximas que foram testados (512  $\mu\text{g/mL}$ ) com a exceção de um composto (**3a**) que apresentou  $LC_{50}$  igual a 456  $\mu\text{g/mL}$  formando assim o índice  $T/A \approx 14$ .

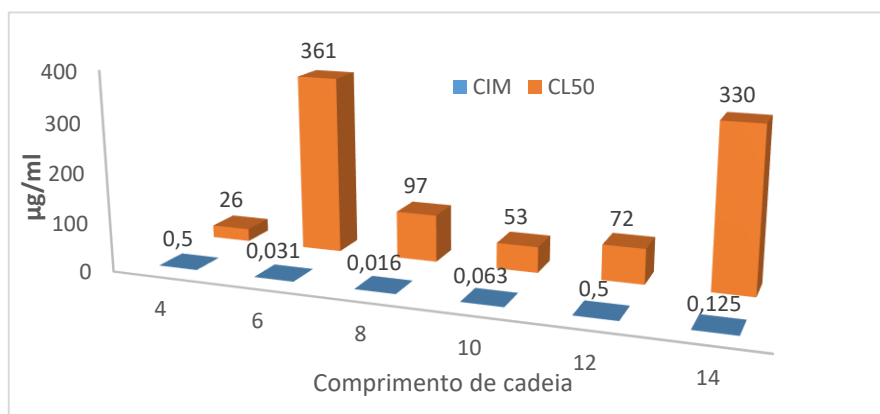
As amidas por sua vez apresentam  $LC_{50}$  entre 14  $\mu\text{g/mL}$  e 360  $\mu\text{g/mL}$ . No entanto, a  $CL_{50}$  das amidas que apresentam atividade (3.5-dinitrobenzamidas e 3-nitro-5(trifluorometil)benzamidas) é muito maior em relação à CIM, resultando em altos níveis do índice de toxicidade/atividade (Figura 67). Por exemplo, o composto **7b** tem índice  $T/A=11645$ , o que significa que o  $CL_{50}$  desse composto 11645 vezes maior do que o CIM do mesmo.

**Tabela 24 Resultados obtidos dos ensaios de citotoxicidade, representados por CL<sub>50</sub> em µg/mL, dos ensaios de atividade, representados por CIM, em µg/mL e índice de toxicidade/atividade**

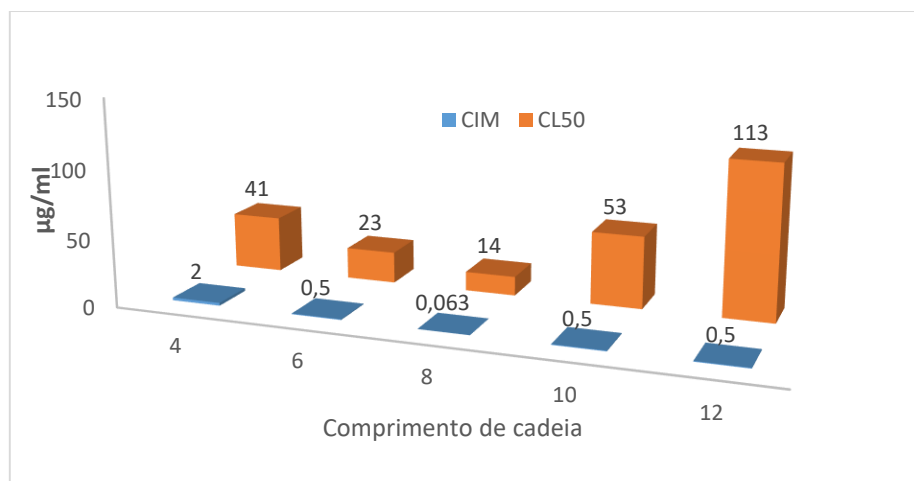
| ésteres | X  | R                               | CIM (µg/mL) | CL <sub>50</sub> (µg/mL) | T/A  | amidas | X  | R                               | CIM (µg/mL) | CL <sub>50</sub> (µg/mL) | T/A   |
|---------|--|---------------------------------|-------------|--------------------------|------|--------|--|---------------------------------|-------------|--------------------------|-------|
| 1c      | H  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 256         | 1646                     | 6    | 5c     | H  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 32          | 188                      | 6     |
| 2c      | 4-NO <sub>2</sub>                        | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 8           | 657                      | 82   | 6c     | 4-NO <sub>2</sub>                        | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 128         | 308                      | 2     |
| 3a      | 3,5-dNO <sub>2</sub>                     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 32          | 456                      | 14   | 7a     | 3,5-dNO <sub>2</sub>                     | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 0,5         | 26                       | 52    |
| 3b      |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 32          | 528                      | 17   | 7b     |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 0,031       | 361                      | 11645 |
| 3c      |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 8           | n/d                      | -    | 7c     |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0,016       | 97                       | 6063  |
| 3d      |  | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 4           | n/d                      | -    | 7d     |  | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 0,063       | 53                       | 841   |
| 3e      |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 8           | n/d                      | -    | 7e     |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0,5         | 72                       | 144   |
| 3f      |  | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> | 16          | n/d                      | -    | 7f     |  | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> | 0,125       | 330                      | 2640  |
| 3g      |  | C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> | n/d         | n/d                      | -    | 7g     |  | C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> | 2           | n/d                      | -     |
| 4a      | 3-NO <sub>2</sub> -<br>5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 1024        | 552                      | 0.54 | 8a     | 3-NO <sub>2</sub> -<br>5-CF <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 2           | 41                       | 21    |
| 4b      |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 1024        | 639                      | 0.62 | 8b     |  | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | ≤0,5        | 23                       | 46    |
| 4c      |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | -           | -                        | -    | 8c     |  | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 0,063       | 14                       | 222   |
| 4d      |  | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 128         | n/d                      | -    | 8d     |  | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 0,5         | 53                       | 106   |
| 4e      |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | >1024       | n/d                      | -    | 8e     |  | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 0,5         | 113                      | 226   |

n/d – Não apresentam toxicidade nenhuma em doses máximos que foram testados (512 µg/ml).

Estes resultados demonstraram que ao contrário do que se poderia esperar, tendo em atenção que grupo nitro está muitas vezes associados a fenómenos de toxicidade,<sup>209,210,211</sup> apesar de serem tóxicos para as micobactérias os compostos com grupo nitro afetaram pouca a sobrevivência dos macrófagos e não mostraram toxicidade elevada, principalmente nos compostos mais ativos, o que é uma característica importante para os compostos que estamos a desenvolver.



**Figura 67 Comparação atividade/toxicidade das 3,5-dinitromenzamidas (7) com diferentes cadeias alquílicas (de 4 a 14 átomos de carbono) apresentado em µg/mL.**



**Figura 68** Comparação atividade/toxicidade 3-nitro-5-( trifluorometil)benzamidases (8) com diferentes cadeias alquílicas (de 4 a 12 átomos de carbono) apresentado em μg/mL.

### 3 Parte Experimental

Nesta secção é descrita a síntese e caracterização de treze ésteres, vinte amidas e cinco tioésteres de derivados de ácido benzóico. São igualmente descritos os estudos de estabilidade em vinte ésteres, vinte amidas e dez tioésteres de ácido benzóico substituído. Por fim descrevem-se os estudos de atividade antimicobacteriana em *M. tuberculosis* e estudos de citotoxicidade na linha celular monocítica humana THP-1.

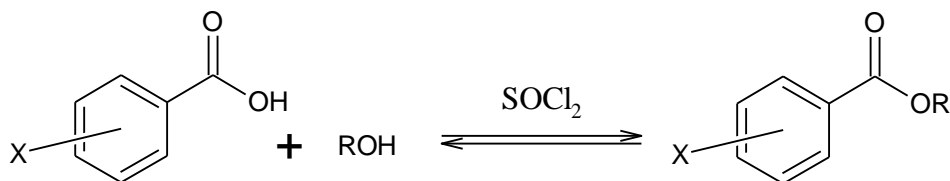
#### 3.1 Síntese e Purificação dos Ésteres

Os ésteres foram sintetizados partindo dos ácidos benzóicos substituídos correspondentes, os quais, após conversão nos respetivos cloretos de ácido (Método A) ou após a protonação do ácido carboxílico (Método B) reagiram com diferentes álcoois (butanol a hexadecanol). Recorrendo ao Método A foram testadas duas condições de reação diferentes: A1, A2.

##### 3.1.1 Método A

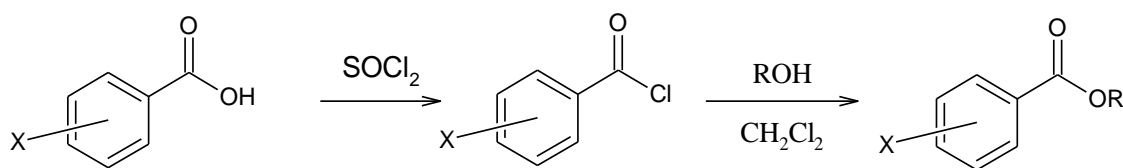
Neste método, primeiramente, procede-se a uma reação entre o derivado de ácido benzóico e o cloreto de tionilo ( $\text{SOCl}_2$ ) para sintetizar o intermediário cloreto de ácido. Seguidamente, o álcool reage com cloreto de ácido para formar o éster (mecanismo em A2. ):

Método A1 - A reação é realizada numa etapa, onde um excesso de álcool serve como solvente.



**Figura 69 Síntese de ésteres de derivados de ácido benzóico substituído usando  $\text{SOCl}_2$ . Método A1.**

Método A2 - Neste método, a reação ocorre em duas etapas, onde o cloreto de ácido é formado na primeira etapa, após o qual o álcool é adicionado, onde o DCM serve como solvente.



X = H, 4- $\text{NO}_2$  e 3,5-d $\text{NO}_2$

R = butilo a hexadecilo

**Figura 70 Síntese de ésteres de derivados de ácido benzóico substituído usando  $\text{SOCl}_2$ . Método A2.**

### 3.1.1.1 Procedimento geral de preparação de H-benzoatos, de 4-nitrobenzoatos, de 3,5-dinitrobenzoatos e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoatos – Método A1

Dissolveram-se 1 eq. de ácido correspondente (ácido benzóico, ácido 4-nitrobenzóico, ácido 3,5-dinitrobenzóico, ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico) em 25 eq. do álcool (butanol a hexadecanol) e adicionou-se gota a gota 1,5 eq. de cloreto de tionilo e colocou-se a reação sob aquecimento durante 5h a 50°C para se formem os ésteres respetivos. O álcool foi simultaneamente reagente e solvente da reação. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada fina (TLC) com o tolueno até a reação estar completa. Para a revelação da placa utilizou-se radiação ultravioleta (UV) e o revelador químico permanganato de potássio. Após agitação da mistura reacional durante 5 h são adicionados 25 ml de água. O éster separado é extraído com diclorometano e lavado com 10 ml de solução saturada de bicarbonato de sódio. A secagem ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e a evaporação do DCM deram o éster. À purificação do produto foi feita por cromatografia em coluna *flash* usando como eluente o tolueno.

A Tabela 25 apresenta as condições experimentais da síntese dos ésteres derivados de ácido benzóico substituído pelo método A1:

**Tabela 25 Condições experimentais da síntese de ésteres derivados de ácido benzóico substituído pelo método A1**

| Composto  | R                               | T°refluxo/°C | t° refluxo/ h | Rendimento / $\eta$ (%) |
|-----------|---------------------------------|--------------|---------------|-------------------------|
|           |                                 | + agitação   |               |                         |
| <b>1a</b> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 50           | 5             | 79                      |
| <b>1c</b> | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 50           | 5             | 86                      |
| <b>1e</b> | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 50           | 5             | 72                      |
| <b>2c</b> | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 50           | 5             | 88                      |
| <b>3d</b> | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 50           | 5             | 99                      |

Por este método foram obtidos 5 compostos (1a, 1c, 1e, 2c e 3d) com bom rendimento (Tabela 25) e efetuada a sua caracterização estrutural por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.

### 3.1.1.2 Procedimento geral de preparação de H-benzoatos, de 4-nitrobenzoatos, de 3,5-dinitrobenzoatos e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoatos – Método A2

Adicionaram-se 25 eq. de cloreto de tionilo a eq. de ácido correspondente (ácido benzóico, ácido 4-nitrobenzóico, ácido 3,5-dinitrobenzóico, ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico) e colocou-se a reação sob refluxo durante 3h a 88°C para se formem os cloretos de benzoílo respetivos. Durante a reação ocorreu a libertação de dióxido de enxofre até se formar o cloreto de ácido pretendido. O cloreto de tionilo foi simultaneamente reagente e solvente da reação. Após o término da reação, evaporou-se o cloreto de tionilo em excesso.

De seguida, dissolveram-se 2eq. de álcool em diclorometano (DCM) seco. O solvente DCM foi seco previamente com cloreto de sódio anidro. A reação ocorreu sob refluxo 24h até se formar o éster pretendido. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada fina (TLC) com o tolueno até a reação estar completa. Para a revelação da placa utilizou-se radiação ultravioleta (UV) e o revelador químico permanganato de potássio.

Terminada a reação procedeu-se à evaporação do solvente DCM e à purificação do produto por cromatografia em coluna *flash* usando como eluente o tolueno.

A Tabela 26 apresenta as condições experimentais da síntese dos ésteres derivados de ácido benzóico substituído pelo método A2:

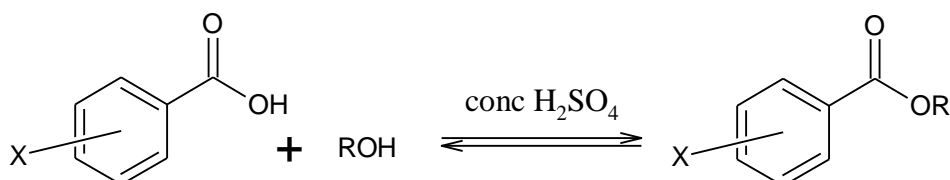
**Tabela 26 Condições experimentais da síntese de ésteres derivados de ácido benzóico substituído pelo método A2**

| Composto  | R                               | T <sub>1</sub> <sup>o</sup> refluxo/ °C<br>+ agitação | T <sub>1</sub> <sup>o</sup> refluxo/ h | T <sub>2</sub> <sup>o</sup> refluxo/ °C<br>+ agitação | T <sub>2</sub> <sup>o</sup> refluxo/<br>h | Rendimento<br>/ η (%) |
|-----------|---------------------------------|---|--|---|---|-----------------------|
| <b>3g</b> | C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> | 88  | 3                                      | 50  | 24  | 28                    |

Por este método foi obtido 1 composto (**3g**) (Tabela 26) e efetuada a sua caracterização estrutural por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.

### 3.1.2 Método B

Esterificação de Fisher é um tipo especial de esterificação pelo refluxo de um ácido carboxílico e um álcool na presença de um catalisador ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A reação realizada sem solvente (especialmente quando um grande excesso de álcool reagente é usado). (mecanismo em A2. )



**Figura 71 Síntese de ésteres de derivados de ácido benzóico substituído por catálise ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).**

#### 3.1.2.1 Procedimento geral de preparação de H-benzoatos, de 4-nitrobenzoatos, de 3,5-dinitrobenzoatos e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzoatos – Método B.

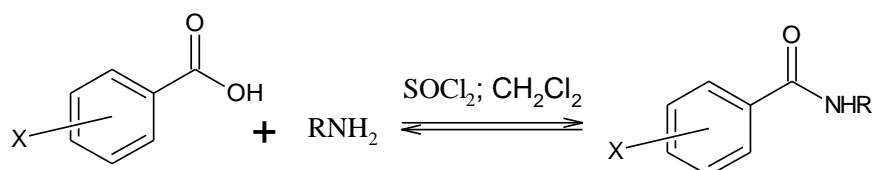
Dissolveram-se 1 eq. de ácido correspondente (ácido benzóico, ácido 4-nitrobenzóico, ácido 3,5-dinitrobenzóico, ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico) em 25 eq. do álcool (butanol a hexadecanol) e adicionou-se gota a gota 0,5 eq. de ácido sulfúrico e colocou-se a reação sob refluxo durante 24h a 120°C para se formem os ésteres respetivos. O álcool foi simultaneamente reagente e solvente da reação. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada fina (TLC) com o tolueno até a reação estar completa. Para a revelação da placa utilizou-se radiação ultravioleta (UV) e o revelador químico permanganato de potássio. Após agitação da mistura

reacional durante 24 h são adicionados 25 ml de água. O éster separado é extraído com diclorometano (DCM) e lavado com 10 ml de solução saturada de bicarbonato de sódio. A secagem (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a evaporação do DCM deram o éster. À purificação do produto foi feita por cromatografia em coluna *flash* usando como eluente o tolueno.

### 3.1.3 Método C

Neste método, primeiramente, procede-se a uma reação entre o derivado de ácido benzóico e o cloreto de tionilo (SOCl<sub>2</sub>) para sintetizar o intermediário cloreto de ácido. Seguidamente, a amina reage com cloreto de ácido para formar a amida (mecanismo em A2.):

Método C1 - A reação é realizada numa etapa, onde o DCM serve como solvente.

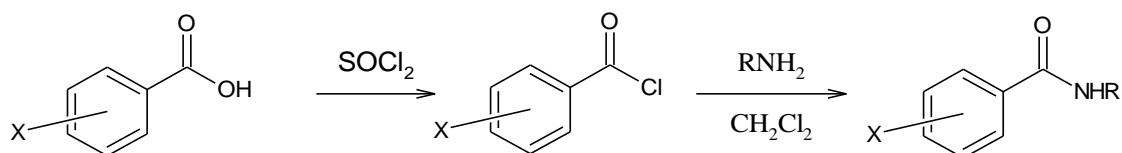


X = H, 4-NO<sub>2</sub> e 3,5-dNO<sub>2</sub>

R = butilo a hexadecilo

**Figura 72 Síntese das amidas de derivadas de ácido benzóico substituído usando SOCl<sub>2</sub>. Método C1.**

Método C2 - Neste método, a reação ocorre em duas etapas, onde o cloreto de ácido é formado na primeira etapa, após o qual amina é adicionado, onde o DCM serve como solvente.



X = H, 4-NO<sub>2</sub> e 3,5-dNO<sub>2</sub>

R = butilo a hexadecilo

**Figura 73 Síntese de amidas de derivados de ácido benzóico substituído usando SOCl<sub>2</sub>. Método C2.**

#### 3.1.3.1 Procedimento geral de preparação de derivados de H-benzamidas, de 4-nitrobenzamidas, de 3,5-dinitrobenzamidas e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzamida – Método C1.

Dissolveram-se 1 eq. de ácido correspondente (ácido benzóico, ácido 4-nitrobenzóico, ácido 3,5-dinitrobenzóico, ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico) em diclorometano e adicionaram-se 3 eq. da amina (butilamina a hexadecilamina). A mistura reacional adicionou-se gota a gota 1,5 eq. de cloreto de tionilo e colocou-se a reação sob refluxo durante 5h a 50°C para se formem as amidas respetivas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada fina (TLC) com uma

mistura de n-hexano e acetato de etilo (7:3) até a reação estar completa. Para a revelação da placa utilizou-se radiação ultravioleta (UV) e o revelador químico permanganato de potássio. Após são adicionados 25 ml de água. A amida separada é extraído com diclorometano (DCM) e lavada com 10 ml de solução saturada de bicarbonato de sódio. A secagem (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a evaporação do DCM deram a amida. À purificação do produto foi feita por cromatografia em coluna *flash* usando como eluente uma mistura de n-hexano e acetato de etilo (7:3).

### 3.1.3.2 Procedimento geral de preparação de derivados de H-benzamidas, de 4-nitrobenzamidas, de 3,5-dinitrobenzamidas e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzamida – Método C2.

O primeiro etapa da reação é o mesmo que o primeiro etapa da reação de esterificação no Método A2. Adicionaram-se 25 eq. de cloreto de tionilo a eq. de ácido correspondente (ácido benzóico, ácido 4-nitrobenzóico, ácido 3,5-dinitrobenzóico, ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico) e colocou-se a reação sob refluxo durante 3h a 88°C para se formem os cloretos de benzoílo respetivos. Durante a reação ocorreu a libertação de dióxido de enxofre até se formar o cloreto de ácido pretendido. O cloreto de tionilo foi simultaneamente reagente e solvente da reação. Após o término da reação, evaporou-se o cloreto de tionilo em excesso.

De seguida, dissolveram-se 3eq. de amida em diclorometano (DCM) seco. O solvente DCM foi seco previamente com cloreto de sódio anidro. A reação ocorreu a temperatura ambiente 24h até se formar amida pretendido. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada fina (TLC) com uma mistura de n-hexano e acetato de etilo (7:3) até a reação estar completa. Para a revelação da placa utilizou-se radiação ultravioleta (UV) e o revelador químico permanganato de potássio.

Terminada a reação procedeu-se à evaporação do solvente DCM e à purificação do produto por cromatografia em coluna *flash* usando como eluente uma mistura de n-hexano e acetato de etilo (7:3).

A Tabela 27 apresenta as condições experimentais da síntese das amidas derivadas de ácido benzóico substituído pelo método C2:

**Tabela 27 Condições experimentais da síntese de amidas derivadas de ácido benzóico substituído pelo método C2**

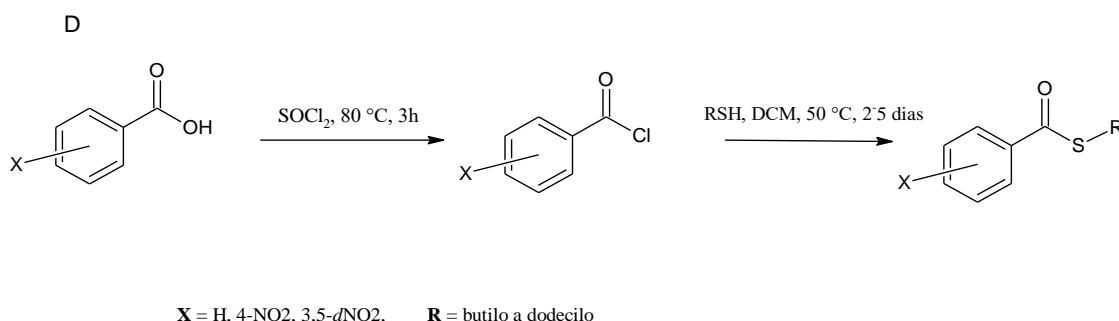
| Composto | R                               | T <sub>1</sub> °refluxo/ °C | T <sub>1</sub> °refluxo/ h | T <sub>2</sub> °refluxo/ °C | T <sub>2</sub> °/ h | Rendimento / η (%) |
|----------|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------|--------------------|
|          |                                 | + agitação                  |                            | + agitação                  |                     |                    |
| 4a       | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 88                          | 3                          | t/a                         | 24                  | 84                 |
| 4c       | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 88                          | 3                          | t/a                         | 24                  | 80                 |
| 4e       | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 88                          | 3                          | t/a                         | 24                  | 78                 |
| 5a       | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 88                          | 3                          | t/a                         | 24                  | 93                 |
| 5c       | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 88                          | 3                          | t/a                         | 24                  | 40                 |
| 5e       | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 88                          | 3                          | t/a                         | 24                  | 50                 |
| 6a       | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | 88                          | 3                          | t/a                         | 24                  | 47                 |

| Composto | R                               | T <sub>1</sub> °refluxo/°C | T <sub>1</sub> °refluxo/h | T <sub>2</sub> °refluxo/°C | T <sub>2</sub> /h | Rendimento / η (%) |
|----------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------|--------------------|
|          |                                 | + agitação                 |                           | + agitação                 |                   |                    |
| 6b       | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | 88                         | 3                         | t/a                        | 24                | 59                 |
| 6c       | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 88                         | 3                         | t/a                        | 24                | 43                 |
| 6d       | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | 88                         | 3                         | t/a                        | 24                | 41                 |
| 6e       | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 88                         | 3                         | t/a                        | 24                | 93                 |
| 6f       | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> | 88                         | 3                         | 40                         | 24                | 10                 |
| 6g       | C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> | 88                         | 3                         | 50                         | 24                | 86                 |

t/a – temperatura ambiente

### 3.1.4 Método D

Neste método, primeiramente, procede-se a uma reação entre o derivado de ácido benzóico e o cloreto de tionilo (SOCl<sub>2</sub>) para sintetizar o intermediário cloreto de ácido. Seguidamente, o tiol reage com cloreto de ácido para formar o tioéster.



**Figura 74 Síntese dos tioésteres de derivados de ácido benzóico substituído usando SOCl<sub>2</sub>. Método D.**

#### 3.1.4.1 Procedimento geral de preparação de H-tiobenzoatos, de 4-nitrotiobenzoatos, de 3,5-dinitrotiobenzoatos e 3-nitro-5-(trifluorometil)tiobenzoatos – Método D.

O primeiro etapa da reação é o mesmo que o primeiro etapa da reação de esterificação no Método A2. Adicionaram-se 25 eq. de cloreto de tionilo a eq. de ácido correspondente (ácido benzóico, ácido 4-nitrobenzóico, ácido 3,5-dinitrobenzóico, ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico) e colocou-se a reação sob refluxo durante 3h a 88°C para se formem os cloretos de benzoílo respetivos. Durante a reação ocorreu a libertação de dióxido de enxofre até se formar o cloreto de ácido pretendido. O cloreto de tionilo foi simultaneamente reagente e solvente da reação. Após o término da reação, evaporou-se o cloreto de tionilo em excesso.

De seguida, dissolveram-se 3eq. de tioéster em diclorometano (DCM) seco. O solvente DCM foi seco previamente com cloreto de sódio anidro. A reação ocorreu sob refluxo 1-5 dias até se formar o tioéster pretendido. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada fina (TLC) com o tolueno até a reação estar completa. Para a revelação da placa utilizou-se radiação ultravioleta (UV) e o revelador químico permanganato de potássio.

Terminada a reação procedeu-se à evaporação do solvente DCM e à purificação do produto por cromatografia em coluna *flash* usando como eluente o tolueno.

A Tabela 27 apresenta as condições experimentais da síntese das amidas derivadas de ácido benzóico substituído pelo método C2:

**Tabela 28 Condições experimentais da síntese de tioésteres derivados de ácido benzóico substituído pelo método D**

| Composto | R                              | T <sub>1</sub> °refluxo/ °C<br>+ agitação | T <sub>1</sub> °refluxo/ h | T <sub>2</sub> °refluxo/ °C<br>+ agitação | T <sub>2</sub> °refluxo/<br>h | Rendimento<br>/ η (%) |
|----------|--------------------------------|---|----------------------------|---|-------------------------------|-----------------------|
| 9a       | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>  | 88  | 3                          | 50  | 24                            | 46                    |
| 10a      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>  | 88  | 3                          | 50  | 24                            | 55                    |
| 10c      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> | 88  | 3                          | 50  | 120                           | 28                    |
| 11a      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>  | 88  | 3                          | 50  | 24                            | 75                    |
| 11c      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> | 88  | 3                          | 50  | 120                           | 15                    |

## 3.2 Análise e Identificação Estrutural

Após a síntese dos derivados do ácido benzóico substituído, procedeu-se à análise e identificação estrutural dos compostos através da técnica de Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), para o estudo dos compostos quanto à sua estrutura molecular e à sua pureza.

### 3.2.1 Ressonância Magnética Nuclear

Através da técnica RMN foram obtidos os espectros de protão (<sup>1</sup>H-RMN) e carbono (<sup>13</sup>C-RMN) em clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) e em metanol deuterado (MeOD).

A partir dos vários espectros obtidos, que estão representados no A3. foi possível fazer a caracterização de cada um dos compostos sintetizados. Na Figura 45 estão representadas as estruturas químicas base dos ésteres e das amidas derivados dos ácidos benzóicos substituídos. Na Tabela 7 e na Tabela 12 estão indicados os sinais de protões e de carbonos, em partes por milhão (ppm), dos compostos em estudo.

Através da análise dos <sup>1</sup>H-RMN, observou-se que os desvios químicos dos protões do farmacóforo dos derivados do ácido benzóico são muito próximos ou mesmo iguais entre os vários compostos e corresponderam à atribuição correta ao respetivo carbono. Relativamente à multiplicidade, esta também foi a mesma para todos os protões. Relativamente aos <sup>13</sup>C-RMN, observou-se também que, para os vários derivados do ácido benzóico substituído, os carbonos também apresentaram desvios químicos muito semelhantes ou mesmo iguais e concordantes com estruturas.

**Caracterização Estrutural por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ésteres derivados de ácido benzóico substituído.**

- **Benzoato de butilo (1a)**

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ 8.11 – 8.02 (m, 2H), 7.62 – 7.46 (m, 2H), 7.46 – 7.39 (m, 1H), 4.35 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 1.85 – 1.70 (m, 2H), 1.62 – 1.32 (m, 2H), 1.00 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ 166.85 (C7), 132.77 (C4), 130.64 (C1), 129.53 (C2 e C6), 128.22 (C3 e C5), 65.02 (C9), 30.76 (C10), 19.27 (C11), 13.75 (C12).

- **Benzoato de hexilo (1b)**

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ 8.11 – 8.01 (m, 2H), 7.62 – 7.53 (m, 2H), 7.67 – 7.53 (m, 1H), 4.33 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.48 – 1.24 (m, 13H), 0.92 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ 166.78 (C7), 132.76 (C4), 130.56 (C1), 129.53 (C2 e C6), 128.30 (C3 e C5), 65.34 (C9), 31.56 (C10), 25.69 (C11-C13), 13.99 (C14).

- **Benzoato de octilo (1c)**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 8.11 – 8.02 (m, 2H), 7.63 – 7.48 (m, 1H), 7.48 – 7.39 (m, 2H), 4.33 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 1.86 – 1.71 (m, 2H), 1.52 – 1.40 (m, 2H), 1.38 – 1.26 (m, 8H), 0.90 (t, J = 7.4 Hz 3H).

<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ 166.85 (C7), 132.76 (C4), 130.70 (C1), 129.53 (C2 e C6), 128.30 (C3 e C5), 65.14 (C9), 31.71 (C10), 26.11 (C11-C15), 14.07 (C16).

- **Benzoato de dodecilo (1e)**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 8.11 – 8.01 (m, 2H), 7.62 – 7.53 (m, 1H), 7.53 – 7.39 (m, 2H), 4.33 (t, J = 6.7 Hz, 3H), 1.84 – 1.71 (m, 2H), 1.36 – 1.25 (m, 24H), 0.88 (t, J = 7.4 3H).

<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ 166.88 (C7), 132.76 (C4), 130.71 (C1), 129.53 (C2 e C6), 128.30 (C3 e C5), 65.34 (C9), 31.17 (C10), 26 (C11-C19), 14.10 (C20).

- **4-nitrobenzoato de octilo (2c)**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 8.36 – 8.26 (ddd, J<sub>o</sub> = 9 e J<sub>m</sub> = 1,8; 2,1 Hz, 2H, C3-H e C5-H), 8.26 – 8.17 (ddd, J<sub>o</sub> = 9 e J<sub>m</sub> = 1,8; 2,1 Hz, 2H, C2-H e C6-H), 4.38 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 1.88 – 1.73 (m, 1H), 1.40 – 1.26 (m, 8H), 0.90 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ 164.92 (C7), 150.49 (C4), 136.21 (C1), 130.64 (C2 e C6), 123.50 (C3 e C5), 66.24 (C9), 32 (C10), 25.80 (C11-C15), 14.06 (C16).

- **3,5-dinitrobenzoato de decacilo (3d)**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 9.24 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 9.17 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 4.47 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.52 – 1.24 (m, 14H), 0.95 – 0.84 (t, J = 7.4, 3H).

<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ 162.53 (C7), 122.26 (C4), 134.13 (C1), 129.38 (C2 e C6), 148.84 (C3 e C5), 67.30 (C9), 31.81 (C10), 25.51 (C11-C17), 14.08 (C18).

- **3,5-dinitrobenzoato de hexadecacilo (3g)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)** δ 9.24 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 9.17 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 4.47 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.85 (m, 2H), 1.27 (m, 26H), 0.89 (t, J = 7.4, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)** δ 162.66 (C7), 122.27 (C4), 134.18 (C1), 129.39 (C2 e C6), 148.74 (C3 e C5), 67.12 (C9), 31.96 (C10), 25.92 (C11-C23), 14.10 (C24).

- **3-nitro-5-(trifluorometil)-benzoato de butilo (4a)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)** δ 9.05 (dd, J = 1.9; 2.0 Hz, 1H), 8.69 (dd, J = 2.3; 1.9 Hz, 1H), 8.63 (dd, J = 2.3; 2.0 Hz, 1H), 4.45 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 1.91-1.75 (m, 2H), 1.60 – 1.34 (m, 2H) 0.98 (t, J = 7.4, 3H).

- **3-nitro-5-(trifluorometil)-benzoato de hexilo (4b)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)** δ 9.05 (dd, J = 1.9; 2.1 Hz, 1H), 8.69 (dd, J = 2.1; 1.7 Hz, 1H), 8.63 (dd, J = 1.7; 2.0 Hz, 1H), 4.44 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.84 (m, 2H), 1.55 – 1.25 (m, 6H) 0.93 (t, J = 7.4, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)** δ 163.50 (C7), 120.61 (C4), 131.25 (C1), 127.57 (C2), 124.42 (C6), 148.84 (C3), 133.85 (C5), 66.84 (C9), 31.38 (C10), 26 (C11-C13), 14.05 (C14).

- **3-nitro-5-(trifluorometil)-benzoato de octilo (4c)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)** δ 9.05 (dd, J = 1.9; 2.0 Hz, 1H), 8.69 (dd, J = 2.1; 2.0 Hz, 1H), 8.63 (dd, J = 1.7; 1.8 Hz, 1H), 4.44 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.84 (m, 2H), 1.31 (m, 10H), 0.89 (t, J = 7.4, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)** δ 163.20 (C7), 124.34 (C4), 133.29 (C1), 131.75 (C2), 127.71 (C6), 148.86 (C3), 133.64 (C5), 66.76 (C9), 31.84 (C10), 25.91 (C11-C15), 14.03 (C16).

- **3-nitro-5-(trifluorometil)-benzoato de decacil (4d)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)** δ 9.05 (dd, J = 1.9; 2.0 Hz, 1H), 8.68 (dd, J = 2.2; 2.1 Hz, 1H), 8.63 (dd, J = 1.7; 1.8 Hz, 1H), 4.44 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.91 – 1.76 (m, 2H), 1.36 – 1.24 (m, 10H), 0.95 – 0.82 (t, J = 7.4, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)** δ 163.45 (C7), 124.40 (C4), 133.19 (C1), 132.69 (C2), 127.45 (C6), 148.74 (C3), 133.83 (C5), 66.82 (C9), 31.66 (C10), 25.91 (C11-C17), 14.06 (C18).

- **3-nitro-5-(trifluorometil)-benzoato de dodecilo (4e)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)** δ 9.05 (dd, J = 1.8; 1.9 Hz, 1H), 8.69 (dd, J = 2.0; 1.9 Hz, 1H), 8.63 (dd, J = 1.6; 1.8 Hz, 1H), 4.44 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.91 – 1.76 (m, 2H), 1.29 (m, 20H), 0.95 – 0.84 (t, J = 7.4, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)** δ 163.18 (C7), 120.70 (C4), 132.13 (C1), 127.35 (C2), 124.59 (C6), 148.77 (C3), 133.68 (C5), 67.02 (C9), 31.88 (C10), 25.93 (C11-C19), 14.07 (C20).

**Caracterização Estrutural por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear das amidas derivadas de ácido benzóico substituído.**

- **N-butil-benzamida (5a)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)**  $\delta$  7.82 – 7.72 (m, 2H), 7.56 – 7.46 (m, 1H), 7.46 – 7.37 (m, 2H), 6.15 (s, 1H), 3.47 (td, J = 7.1, 5.7 Hz, 2H), 1.68 – 1.54 (m, 2H), 1.52 – 1.34 (m, 2H), 0.98 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)**  $\delta$  167.74 (C7), 131.23 (C4), 134.95 (C1), 128.46 (C2 e C6), 126.89 (C3 e C5), 40.25 (C9), 31.82 (C10), 20.24 (C11), 13.77 (C12).

- **N-hexil-benzamida (5b)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)**  $\delta$  7.83 – 7.72 (m, 2H), 7.57 – 7.44 (m, 2H), 7.44 – 7.38 (m, 1H), 6.10 (s, 1H), 3.47 (td, J = 7.1, 5.7 Hz, 2H), 1.71 – 1.56 (m, 2H), 1.52 – 1.34 (m, 6H), 0.98 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)**  $\delta$  167.63 (C7), 131.24 (C4), 134.84 (C1), 128.49 (C2 e C6), 126.85 (C3 e C5), 40.31 (C9), 31.73 (C10), 26.59 (C11-C13), 14 (C14).

- **N-octil-benzamida (5c)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)**  $\delta$  7.82 – 7.72 (m, 2H), 7.57 – 7.47 (m, 1H), 7.47 – 7.38 (m, 2H), 6.11 (s, 1H), 3.47 (td, J = 7.2, 5.6 Hz, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.42 – 1.24 (m, 10H), 0.96 – 0.84 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)**  $\delta$  167.52 (C7), 131.24 (C4), 134.92 (C1), 128.49 (C2 e C6), 126.86 (C3 e C5), 40.26 (C9), 32.03 (C10), 27.10 (C11-C15), 14.07 (C16).

- **N-dodecil-benzamida (5e)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)**  $\delta$  7.82 – 7.72 (m, 2H), 7.57 – 7.47 (m, 1H), 7.47 – 7.38 (m, 2H), 6.11 (s, 1H), 3.47 (td, J = 7.2, 5.7 Hz, 2H), 1.71 – 1.55 (m, 2H), 1.45 – 1.28 (m, 11H), 1.28 (m, 7H), 0.95 – 0.84 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)**  $\delta$  167.49 (C7), 131.25 (C4), 134.92 (C1), 128.51 (C2 e C6), 126.84 (C3 e C5), 40.26 (C9), 31.88 (C10), 27.03 (C11-C19), 14.10 (C20).

- **N-butil-4-nitrobenzamida (6a)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)**  $\delta$  8.34 – 8.25 (ddd,  $J_o = 9$  e  $J_m = 1,8$ ; 2,1 Hz, 2H, C3-H e C5-H), 7.98 – 7.88 (ddd,  $J_o = 9$  e  $J_m = 1,8$ ; 2,1 Hz, 2H, C2-H e C6-H), 6.19 (s, 1H), 3.50 (td, J = 7.2, 5.7 Hz, 2H), 1.66 (m, 2H), 1.43 (m 2H), 0.99 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)**  $\delta$  165.60 (C7), 149.44 (C4), 140.55 (C1), 128.09 (C2 e C6), 123.74 (C3 e C5), 40.31 (C9), 31.94 (C10), 20.01 (C11), 13.72 (C12).

- **N-hexil-4-nitrobenzamida (6b)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)**  $\delta$  8.36 – 8.25 (ddd,  $J_o = 9$  e  $J_m = 1,8$ ; 2,1 Hz, 2H, C3-H e C5-H), 7.99 – 7.88 (ddd,  $J_o = 9$  e  $J_m = 1,8$ ; 2,1 Hz, 2H, C2-H e C6-H), 6.14 (s, 1H), 3.50 (td, J = 7.2, 5.7 Hz, 2H), 1.66 (m, 2H), 1.49 – 1.24 (m, 6H), 0.99 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ** 165.46 (C7), 149.60 (C4), 140.49 (C1), 128.07 (C2 e C6), 123.77 (C3 e C5), 40.51 (C9), 31.31 (C10), 26.65 (C11-C13), 13.98 (C14).

- **N-octil-4-nitrobenzamida (6c)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ** 8.27 – 8.16 (ddd,  $J_o = 9$  e  $J_m = 1,8$ ; 2,1 Hz, 2H, C3-H e C5-H), 7.90 – 7.80 (ddd,  $J_o = 9$  e  $J_m = 1,8$ ; 2,1 Hz, 2H, C2-H e C6-H), 6.10 (s, 1H), 3.41 (td,  $J = 7.2, 5.7$  Hz, 2H), 1.37 – 1.15 (m, 12H), 0.87 – 0.76 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ** 165.54 (C7), 149.56 (C4), 140.47 (C1), 128.08 (C2 e C6), 123.76 (C3 e C5), 40.68 (C9), 31.64 (C10), 26.84 (C11-C15), 14.05 (C16).

- **N- dodecil-4-nitrobenzamida (6e)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ** 8.35 – 8.25 (ddd,  $J_o = 9$  e  $J_m = 1,8$ ; 2,1 Hz, 2H, C3-H e C5-H), 7.98 – 7.88 (ddd,  $J_o = 9$  e  $J_m = 1,8$ ; 2,1 Hz, 2H, C2-H e C6-H), 6.17 (s, 1H), 3.49 (td,  $J = 7.2, 5.7$  Hz, 2H), 1.67 (m, 4H), 1.28 (m, 16H), 0.95 – 0.82 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

- **N-butil-3.5-dinitrobenzamida (7a)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ** 9.18 (t,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 8.96 (d,  $J = 2.1$  Hz, 2H), 6.40 (s, 1H), 3.56 (td,  $J = 7.3, 5.7$  Hz, 2H), 1.77 – 1.61 (m, 2H), 1.56 – 1.37 (m, 2H), 1.01 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ** 162.93 (C7), 120.95 (C4), 138.36 (C1), 127.21 (C2 e C6), 148.55 (C3 e C5), 40.72 (C9), 31.63 (C10), 19.95 (C11), 13.70 (C12).

- **N-hexil-3.5-dinitrobenzamida (7b)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ** 9.17 (t,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 8.96 (d,  $J = 2.1$  Hz, 2H), 6.42 (s, 1H), 3.55 (td,  $J = 7.3, 5.7$  Hz, 2H), 1.77 – 1.64 (m, 2H), 1.37 – 1.33 (m, 6H), 0.98 – 0.87 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ** 162.96 (C7), 120.95 (C4), 138.35 (C1), 127.17 (C2 e C6), 148.87 (C3 e C5), 40.89 (C9), 31.36 (C10), 26.79 (C11-C13), 13.98 (C14).

- **N-octil-3.5-dinitrobenzamida (7c)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ** 9.18 (t,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 8.95 (d,  $J = 2.1$  Hz, 2H), 6.37 (s, 1H), 3.54 (td,  $J = 7.3, 5.7$  Hz, 2H), 1.71 (m, 2H), 1.30 (dq,  $J = 7.9, 4.3$  Hz, 10H), 0.95 – 0.85 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ** 162.68 (C7), 120.95 (C4), 138.16 (C1), 127.17 (C2 e C6), 148.87 (C3 e C5), 40.90 (C9), 31.83 (C10), 26.90 (C11-C15), 14.05 (C16).

- **N-decakil-3.5-dinitrobenzamida (7d)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ** 9.18 (t,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 8.96 (d,  $J = 2.1$  Hz, 2H), 6.39 (s, 1H), 3.54 (td,  $J = 7.3, 5.7$  Hz, 2H), 1.69 (m, 2H), 1.41 – 1.24 (m, 14H), 0.95 – 0.84 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ** 162.98 (C7), 120.94 (C4), 138.23 (C1), 127.18 (C2 e C6), 148.68 (C3 e C5), 41.05 (C9), 31.93 (C10), 27.05 (C11-C17), 14.08 (C18).

- **N-dodecil-3.5-dinitrobenzamida (7e)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ** 9.18 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 8.96 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 6.40 (s, 1H), 3.54 (td, J = 7.3, 5.7 Hz, 2H), 1.69 (m, 2H), 1.38 (m, 2H), 1.29 (m, 16H), 0.96 – 0.84 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ** 162.74 (C7), 120.94 (C4), 138.39 (C1), 127.16 (C2 e C6), 148.88 (C3 e C5), 40.96 (C9), 31.94 (C10), 26.91 (C11-C19), 14.09 (C20).

- **N-tetradecilo-3.5-dinitrobenzamida (7f)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ** 9.14 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 9.01 (d, J = 2.0 Hz, 2H), 7.08 (s, 1H), 3.58 – 3.45 (td, J = 7.3, 5.7 Hz, 2H), 1.76 (m, 2H), 1.65 (m, 2H), 1.35 (m, 2H), 1.29 – 1.22 (m, 18H), 0.93 – 0.82 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ** 162.94 (C7), 121.25 (C4), 138.56 (C1), 127.50 (C2 e C6), 148.92 (C3 e C5), 41.39 (C9), 32.10 (C10), 27.32 (C11-C21), 14.36 (C22).

- **N-hexadecilo-3.5-dinitrobenzamida (7g)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ** 9.18 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 8.95 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 6.36 (s, 1H), 3.54 (td, J = 7.3, 5.7 Hz, 2H), 1.69 (m, 3H), 1.39 (m, 3H), 1.33 – 1.28 (m, 6H), 1.27 (s, 16H), 0.95 – 0.84 (J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ** 162.90 (C7), 120.95 (C4), 138.21 (C1), 127.14 (C2 e C6), 148.85 (C3 e C5), 40.93 (C9), 32.05 (C10), 26.93 (C11-C23), 14.10 (C24).

- **N-butil-3-nitro-5-(trifluorometil)-benzamida (8a)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ** 8.68 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H), 8.57 (dd, J = 2.0, 1.9 Hz, 1H), 8.34 (dd, J = 1.7, 1.9 Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 3.45 (td, J = 7.2, 5.7 Hz, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.46 – 1.28 (m, 2H), 0.91 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ** 164.15 (C7), 120.70 (C4), 130.13 (C1), 125.05 (C2), 123.03 (C6), 148.55 (C3), 137.94 (C5), 40.41 (C9), 31.72 (C10), 26.08 (C11), 13.80 (C12).

- **N-hexil-3-nitro-5-(trifluorometil)-benzamida (8b)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ** 8.76 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H), 8.63 (dd, J = 2.0, 1.9 Hz, 1H), 8.42 (dd, J = 1.7, 1.9 Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 3.53 (td, J = 7.3, 5.7 Hz, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.48 – 1.32 (m, 6H), 0.91 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d) δ** 163,72 (C7), 120.90 (C4), 129,95 (C1), 124,68 (C2), 122,82 (C6), 148.32 (C3), 137.85 (C5), 40.65 (C9), 31.37 (C10), 26.76 (C11-C13), 13.95 (C14).

- **N-octil-3-nitro-5-(trifluorometil)-benzamida (8c)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)** δ 8.76 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H), 8.63 (dd, J = 2.0, 1.9 Hz, 1H), 8.42 (dd, J = 1.6, 1.9 Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 3.53 (td, J = 7.3, 5.7 Hz, 2H), 1.67 (m, 2H), 1.41 – 1.25 (m, 10H), 0.91 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)** δ 163,66 (C7), 122,44 (C4), 129,95 (C1), 124,68 (C2), 122,82 (C6), 148,32 (C3), 137,85 (C5), 40,87 (C9), 31,63 (C10), 29,48 (C11-C15), 14,03 (C16).

- **N-decakil-3-nitro-5-(trifluorometil)-benzamida (8d)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)** δ 8.77 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H), 8.63 (dd, J = 2.0, 1.9 Hz, 1H), 8.42 (dd, J = 1.7, 1.9 Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 3.52 (td, J = 7.3, 5.7 Hz, 2H), 1.69 (m, 2H), 1.39 (m, 4H), 1.34 – 1.24 (m, 10H), 0.91 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)** δ 163,91 (C7), 122,99 (C4), 132,91 (C1), 129,97 (C2), 124,75 (C6), 148,41 (C3), 137,61 (C5), 40,87 (C9), 31,73 (C10), 29,41 (C11-C17), 14,03 (C18).

- **N-dodecil-3-nitro-5-(trifluorometil)-benzamida (8e)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)** δ 8.76 (dd, J = 1.8, 1.9 Hz, 1H), 8.63 (dd, J = 2.0, 1.9 Hz, 1H), 8.42 (dd, J = 1.7, 1.9 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 3.52 (td, J = 7.3, 5.7 Hz, 2H), 1.76 – 1.63 (m, 2H), 1.38 (m, 4H), 1.29 (m, 14H), 0.91 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)** δ 163,78 (C7), 122,99 (C4), 132,91 (C1), 129,97 (C2), 124,75 (C6), 148,47 (C3), 137,80 (C5), 40,85 (C9), 31,38 (C10), 29,57 (C11-C19), 13,46 (C20).

### **Caracterização Estrutural por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de tioésteres derivados de ácido benzóico substituído.**

- **tiobenzoato de butilo (9a)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)** δ 8.04 – 7.94 (m, 2H), 7.64 – 7.51 (m, 1H), 7.51 – 7.39 (m, 2H), 3.10 (t, J = 7.3, 2H), 1.76 – 1.57 (m, 2H), 1.57 – 1.36 (m, 2H), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)** δ 192,23 (C7), 137,69 (C4), 134,16 (C1), 128,60 (C2 e C6), 127,05 (C3 e C5), 31,84 (C9), 28,73 (C10), 22,21 (C11), 12,88 (C12).

- **4-nitro-tiobenzoato de butilo (10a)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)** δ 8.32 – 8.18 (ddd, J<sub>o</sub> = 9 e J<sub>m</sub> = 1,8; 2,1 Hz, 2H, C3-H e C5-H), 8.10 – 7.99 (ddd, J<sub>o</sub> = 9 e J<sub>m</sub> = 1,8; 2,1 Hz, 2H, C2-H e C6-H), 3.06 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.70-1.4 (m, 2H), 1.49-1.29 (m, 2H), 0.90 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)** δ 190,81 (C7), 150,71 (C4), 141,84 (C1), 128,18 (C2 e C6), 123,83 (C3 e C5), 31,50 (C9), 29,53 (C10), 22,02 (C11), 13,52 (C12).

- **4-nitro-tiobenzoato de octilo (10b)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)** δ 8.37 – 8.26 (ddd,  $J_o = 9$  e  $J_m = 1,8$ ; 2,1 Hz, 2H, C3-H e C5-H), 8.18 – 8.08 (ddd,  $J_o = 9$  e  $J_m = 1,8$ ; 2,1 Hz, 2H, C2-H e C6-H), 3.14 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.79-1.63 (m, 2H), 1.51-1.38 (m, 2H), 1.38 – 1.25 (m, 8H), 0.90 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)** δ 190.82 (C7), 150.45 (C4), 141.98 (C1), 128.18 (C2 e C6), 123.83 (C3 e C5), 31.85 (C9), 29.92 (C10), 22.56 (C11-C15), 14.08 (C16).

- **3,5-dinitro-tiobenzoato de butilo (11a)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)** δ 9.24 (t,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 9.10 (d,  $J = 2.1$  Hz, 2H), 3.23 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.82 – 1.61 (m, 2H), 1.61 – 1.34 (m, 2H), 0.90 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)** δ 188.12 (C7), 122.15 (C4), 140.12 (C1), 126.88 (C2 e C6), 148.88 (C3 e C5), 30.92 (C9), 30.02 (C10), 22.15 (C11), 13.56 (C12).

- **3,5-dinitro-tiobenzoato de octilo (11b)**

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-d)** δ 9.24 (t,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 9.10 (d,  $J = 2.1$  Hz, 2H), 3.22 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.82 – 1.61 (m, 2H), 1.61 – 1.34 (m, 6H), 0.90 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C RMN (300 MHz, Chloroform-d)** δ 188.34 (C7), 122.15 (C4), 140.10 (C1), 126.88 (C2 e C6), 148.70 (C3 e C5), 30.92 (C9), 30.02 (C10), 21.75 (C11-C15), 14.11 (C16).

### 3.3 Ensaios de estabilidade

Os compostos sintetizados foram estudados quanto à estabilidade química e enzimática. Para tal, foram feitos ensaios de estabilidade da hidrólise dos compostos em tampão fosfato pH=7,4 e em plasma humano e em homogenato micobacteriano. O ensaio de estabilidade em homogenato de micobactérias foi elaborado para avaliar se o composto seria ativado pelas micobactérias ao ácido livre e ao álcool e para verificar se eventualmente se formariam outros produtos. A detecção dos compostos e dos seus metabolitos é feita através da técnica High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Na reação de hidrólise, os ésteres ou amidas são convertidos no seu respetivo ácido (produto), pelo que este estudo consistiu na análise da evolução da concentração do éster e do ácido ao longo do tempo. Fizeram-se ensaios prévios onde se obteve a área do pico do éster ou amida e do ácido correspondente e o respetivo tempo de retenção. Foi importante garantir que os tempos de retenção do éster ou amida e do respetivo ácido apresentavam um intervalo de tempo suficiente para ser possível distinguir os compostos.

Antes de começar os ensaios, determinou-se o valor máximo de absorção para cada um dos compostos derivados de ácido benzóico substituído e do correspondente ácido benzóico substituído, através do espectrofotómetro de ultravioleta (UV), de modo a se poder ajustar o valor

do comprimento de onda no detetor de UV do HPLC. Na Figura 48, estão representados os exemplos de espectros UV obtidos e na Tabela 13 serão apresentados os valores do comprimento de onda para cada um composto analisado e o ácido correspondente e os tempos de retenção dos mesmos.

Previamente aos ensaios de estabilidade, também foram preparadas soluções para estabelecer curvas de calibração, que representam a correlação entre a concentração e área de cada pico do éster/amida e ácido observado nos cromatogramas obtidos no HPLC. Para tal, os compostos são dissolvidos em acetonitrilo (ACN) em diferentes concentrações. Para cada curva de calibração, obteve-se uma equação da reta para o composto em estudo e para cada ácido correspondente, e, com esses dados, foi possível a conversão da área de cada pico na respetiva concentração. Tabela 29 apresentam-se os valores de declive obtidos ( $m$ ) e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) para cada um dos compostos. Em A4. estão representadas as curvas de calibração dos ésteres/das amidas testados e dos ácidos correspondentes.

### **3.3.1 Estabilidade em tampão fosfato pH 7,4**

A estabilidade química dos ésteres derivados de BA foi estudada em tampão fosfato pH 7,4 0,01M e força iónica de 0,15 M à temperatura de 37°C, com uma concentração inicial de substrato de  $5 \times 10^{-4}$  M. Os ensaios foram realizados em triplicado e acompanhados por um controlo negativo para se monitorizar a concentração de éster/amida não hidrolisado na reação em simultâneo com a concentração de éster/amida hidrolisado nos controlos positivos ao longo do tempo.

As amostras foram preparadas através da adição de 40  $\mu$ L de solução mãe de composto ( $2,5 \times 10^{-2}$ M) em 1600  $\mu$ L de solução tampão fosfato pH 7,4 e 360  $\mu$ L de ACN para facilitar a dissolução do éster, e colocadas num banho termostato a 37 °C.

O controlo negativo foi preparado através da adição de 40  $\mu$ L de solução mãe de composto ( $2,5 \times 10^{-2}$ M) em 1960  $\mu$ L de ACN.

Foram-se retirados amostras de 50  $\mu$ L ao longo do tempo que se diluíam de 1/10 com 450  $\mu$ L de ACN e injetaram-se, posteriormente, no HPLC. Sendo a concentração final a injetar no HPLC de  $5 \times 10^{-5}$ M.

O tempo de duração de cada ensaio foi de 336 h (14 dias).

### **3.3.2 Estabilidade em plasma humano**

Com o intuito de avaliar a suscetibilidade destes compostos à hidrólise enzimática pelas esterasas humanas, foram feitos estudos de estabilidade em plasma humano. Estes estudos

foram efetuados em suspensões de plasma humano diluído a 80% em tampão fosfato pH 7,4 de concentração total 0,05M e força iônica 0,15M à temperatura de 37°C e concentração inicial de substrato de  $5 \times 10^{-4}$  M. Os ensaios foram realizados em triplicado e acompanhados por um controlo negativo para se monitorizar a concentração de éster/amida não hidrolisado na reação em simultâneo com a concentração de éster/amida hidrolisado nos controlos positivos ao longo do tempo.

As amostras foram preparadas através da adição de 16  $\mu$ L de solução mãe de composto ( $2,5 \times 10^{-2}$ M) em 640  $\mu$ L de plasma humano e 160  $\mu$ L de solução tampão fosfato pH 7,4 e colocadas num banho termostato a 37 °C.

O controlo negativo foi preparado através da adição de 40  $\mu$ L de solução mãe de composto ( $2,5 \times 10^{-2}$ M) em 1960 $\mu$ L de ACN.

Foram-se retirados amostras de 50  $\mu$ L ao longo do tempo que se diluíam de 1/10 com 450  $\mu$ L de ACN e se e centrifugaram-se a 14 000rpm por 15 minutos e injetaram, posteriormente, no HPLC. Sendo a concentração final a injetar no HPLC de  $5 \times 10^{-5}$ M.

O tempo de duração de cada ensaio foi de 72 h (3 dias).

### **3.3.3 Estabilidade em homogenato de *M. smegmatis***

O *M. smegmatis* cresceu no meio de cultura Middlebrook 7H9 com OADC a T=37°C até se atingir na fase exponencial uma densidade ótica entre 0,8 e 1,0 no comprimento de onda de 600nm, tendo-se obtido um volume total de 2000mL. Retiraram-se porções de 200 mL de *M. smegmatis* para tubos de 200mL, que foram centrifugados a 3000 rotações por minuto durante 10 minutos à temperatura de 4°C. Separou-se o resíduo do sobrenadante e adicionou-se 35 mL de tampão fosfato salino PBS pH = 7,4 a cada tubo, procedendo-se à sua lavagem. Efetuou-se nova centrifugação retirando-se o sobrenadante, tendo-se procedido a uma segunda lavagem do resíduo com nova solução de PBS. Os resíduos foram congelados e ressuspensos posteriormente com cerca de 25 $\mu$ L de PBS (volume total  $\approx$  35 mL) sendo então colocados num banho com gelo no aparelho de ultrassons aplicando-se 5 ciclos alternados, de 2 minutos intermitentes, seguidos de 2 minutos de descanso em cada tubo. Depois da preparação do homogenato, procedeu-se à determinação da concentração total de proteína do homogenato pelos métodos de Bradford e de Lowry.<sup>282,283</sup> A concentração total de proteína assim obtida foi de 8.6  $\mu$ g/mL.

Para estabelecer qual a percentagem deste homogenato a utilizar nos estudos de estabilidade subsequentes para os compostos a estudar, tomou-se a hidrólise do benzoato de etilo anteriormente

descrita como padrão<sup>4</sup> sendo então estabelecido que a percentagem de homogenato a ser usada nos ensaios posteriores com os compostos em estudo deveria ser de 3.2%.

As amostras foram preparadas através da adição de 20 µL de solução mãe de composto ( $2,5 \times 10^{-2} \text{M}$ ) em 32 µL de homogenato de *M. smegmatis* e 948 µL de solução tampão fosfato pH 7,4 e colocadas num banho termostato a 37 °C.

O controlo negativo foi preparado através da adição de 20 µL de solução mãe de composto ( $2,5 \times 10^{-2} \text{M}$ ) em 980 µL de ACN.

Foram-se retirados amostras de 50 µL ao longo do tempo que se diluíam de 1/10 com 450 µL de ACN e se e centrifugaram-se a 14 000rpm por 15 minutos e injetaram, posteriormente, no HPLC. Sendo a concentração final a injetar no HPLC de  $5 \times 10^{-5} \text{M}$ .

O tempo de duração de cada ensaio foi de 48 h (2 dias).

### **3.4 Estudos de atividade Antimicobacteriana**

Os estudos de atividade antimicobacteriana foram realizados em quatro estirpes micobacterianas: *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. smegmatis* e *M. bovis*. Os estudos foram realizados pelo Doutor David Pires do grupo de investigação Host-Pathogen Interaction da Faculdade de Farmácia Universidade de Lisboa.

Estes estudos foram realizados em *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *M. avium* DSM 44156, *M. smegmatis* mc2 155, *M. bovis* BCG e através destes determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) para todos os ésteres sintetizados assim como a concentração bactericida mínima (CMB).

Todos as estirpes micobacterianas foram cultivados em meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose, catalase) e 0,05% de tiloxapol e incubadas a 37 °C até à fase de crescimento exponencial.

As CIM foram determinadas pelo método de microdiluição em meio líquido em placas de cultura de 96 poços. As culturas bacterianas de *M. tuberculosis* em fase de crescimento exponencial foram sedimentadas, lavadas em solução de tampão de fosfato a pH 7,4 e ressuspensas em meio Middlebrook. Os aglomerados de bactérias foram removidos por tratamento ultrassónico de suspensões de bactérias em banho-maria por 5 minutos, seguido de centrifugação em baixa velocidade (500 x g) por 2 minutos. A suspensão das células foi verificada por microscopia. As microplacas contendo uma suspensão bacteriana correspondente a aproximadamente a  $10^5$  unidades formadoras de colónias por ml foram incubadas com as concentrações selecionadas dos compostos. Em dias alternados, a densidade ótica dos poços foi medida em espectrofotómetro Tecan M200, após 30 s de agitação orbital. Esses valores foram usados para produzir as curvas de

crescimento. Após 10 dias de incubação a 37°C, determinaram-se as CIM, que correspondem à primeira concentração sem crescimento bacteriano visível através da turbidez do meio. As medidas de densidade ótica foram tomadas até o 15 dia de incubação, após o qual as amostras bacterianas foram recuperadas das microplacas de teste MIC e plaqueadas em meio sólido 7H10 + OADC. A CBM foi determinada após 3 semanas de incubação, correspondendo à concentração do composto que não produziu colônias no meio sólido. Bactérias tratadas com solvente DMSO nas mesmas proporções presentes durante os testes do composto foram usadas como controle. A isoniazida foi usada como controle positivo para a inibição do crescimento.

#### **3.4.1 Infecção de macrófagos e atividade de morte intracelular ex vivo.**

Macrófagos THP-1 (preparados como abaixo, Capítulo 3.5) semeados em placas de 96 poços foram inoculados com as micobactérias (preparados como acima, Capítulo 3.4) em um MOI de 1 em meio de cultura THP-1 por 3h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Após este período de internalização, as bactérias livres foram removidas lavando os poços três vezes com PBS. Os macrófagos infetados foram subsequentemente incubados com as concentrações selecionadas dos compostos em meio de cultura fresco. Em pontos de tempo discretos, as bactérias intracelulares viáveis foram quantificadas pelo ensaio de unidades formadoras de colônias. Os macrófagos foram lisados por tratamento com 0,05% de igepal por 15 min, seguido de diluições em série de 10 vezes dos lisados em água e plaqueamento em meio sólido 7H10 + OADC. Após 2-3 semanas de incubação a 37°C as colônias foram contadas.

### **3.5 Ensaios de citotoxicidade**

Utilizou-se a linha celular monocítica humana THP-1 (ATCC TIB202) para determinar o efeito do composto na viabilidade celular. As células foram cultivadas em RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro bovino fetal a 10% (FBS, (Gibco)), 10 mM de HEPES (Gibco), 1 mM de piruvato de sódio e mantidas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. A diferenciação de monócitos em macrófagos THP-1 foi induzida por 48 h com 20 nM de acetato de tetradecanoilforbol (PMA) após um período de repouso de 24 h sem PMA. Os macrófagos diferenciados em placas de 96 poços, 5 x 10<sup>4</sup> células por poço, foram tratados com os compostos. Após três dias de tratamento, a viabilidade celular foi determinada usando PrestoBlue (Invitrogen), seguindo as indicações do fabricante. Resumidamente, as células foram lavadas com solução tampão de fosfato salino (PBS) e incubadas com PrestoBlue 10% (v/v) em meio de cultura de células. Após 4 h de incubação, a fluorescência de cada poço foi medida num espectrofotômetro Tecan M 200 com 560 nm de excitação e 590 nm de emissão. A viabilidade foi calculada relativamente a células não tratadas. As células tratadas com solvente DMSO nas mesmas proporções foram usadas como controle. A puromicina foi usada como controle positivo para morte celular.

## Conclusões

Este trabalho teve como principal objetivo a síntese de ésteres/amidas derivados de ácidos fracos contendo o grupo nitro e álcoois/aminas com cadeia longa e avaliar a possibilidade de estes atuarem no *M. tuberculosis* como pró-fármacos. Para avaliar a nossa abordagem, foram sintetizados ésteres e amidas de ácido benzóico, ácido 4-nitrobenzóico, ácido 3,5-dinitrobenzóico e ácido 3-nitro-5-(trifluorometil)benzóico contendo comprimentos de cadeia linear de 4 a 16 átomos de carbono.

Foi efetuado a avaliação da atividade e da citotoxicidade destes compostos contra *M. tuberculosis* H37Rv, o estudo da estabilidade química e enzimática dos compostos e a possibilidade de ativação dos mesmos pelas esterases micobacterianas e, por fim, o estudo da citotoxicidade dos ésteres/amidas e dos ácidos numa linha celular monocítica humana THP-1.

Com base nos estudos de estabilidade e atividade, pretendeu-se escolher compostos que sejam ativos nas micobactérias, e, ao mesmo tempo, apresentem uma hidrólise lenta em plasma e na presença das micobactérias. Os compostos que apresentarem estas características poderão ser considerados potenciais pró-fármacos para o tratamento da tuberculose.

Primeiramente foram feitos os ensaios de estabilidade química, em plasma humano e em homogenatos de micobactérias, pois é preciso garantir que os compostos sejam estáveis em plasma humano para poderem atingir o alvo sem serem degradados. A estabilidade em tampão serve para verificar se a hidrólise em plasma pode ser explicada por uma hidrólise puramente química ou se corresponde a uma hidrólise enzimática (mais rápida). Nestes ensaios, observou-se que os compostos com maior comprimento de cadeia alquílica seriam mais estáveis e por isso mais difíceis de hidrolisar do que os de cadeia alquílica mais curta.

Os compostos nitrados mostraram ser quimicamente estáveis no intervalo de tempo necessário para efetuar os testes de atividade e estabilidade e a hidrólise enzimática não foi significativamente influenciada pela hidrólise química dos ésteres.

Em relação de estabilidade enzimática os ésteres apresentam uma estabilidade adequada em plasma humana, no entanto, na estabilidade nas micobactérias o valor de percentagem de degradação foi baixo. Assim, os ésteres nitrados, apesar de apresentarem uma estabilidade adequada em plasma humana, pelo que deveriam atingir o alvo sem serem degradados, são estáveis à hidrólise das esterases micobacterianas, pelo que não são transformados significativamente respetivo ácido livre. As amidas, por sua vez apresentam elevada estabilidade tanto em plasma humana, como em micobactérias. Assim, as amidas, apesar de serem estáveis em plasma humano, também são estáveis à hidrólise pelas esterases micobacterianas, pelo que não são transformadas na sua forma ativa.

Além da estabilidade, também foi avaliada a atividade destes compostos contra *M. tuberculosis* H37Rv, através da CIM e da CBM. Concluiu-se que os ésteres 3,5-dinitrobenzoatos foram os mais ativos do que os ésteres de 4-nitrobenzoatos. O que formou a ideia de que para atividade antimicobacterina é importante a posição de um grupo nitro na zona aromática. Inesperadamente as 3,5-dinitrobenzamidias (3-nitro-5-(trifluorometil)benzoatos) apresentaram atividade melhorada em comparação com 3,5-dinitrobenzoatos (3-nitro-5-(trifluorometil)benzoatos). Além disso, ao comparar atividade 3,5-dinitrobenzamidias e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzamidias verificou-se que ambos os grupos de compostos têm atividade semelhante o que permite nos concluir que apenas um grupo nitro na zona aromática tem importância para atividade antimicobacteriano.

Dado que o intuito deste trabalho era estudar a possibilidade de os compostos sintetizados atuarem como pró-fármacos, conclui-se que estes compostos estarão provavelmente a atuar como fármacos.

Para avaliar a sua capacidade atuar dentro de célula hospedeiro foram avaliados atividade em macrófago humanos THP-1 infetados pelo *M. bovis* BCG. Foi demonstrado que os compostos também pode penetrar em macrófagos e possuem atividade bactericida.

Ao avaliar estabilidade e atividade dos compostos sintetizados verificou-se que os compostos que apresentam maior atividade (3,5-dinitrobenzamidias e 3-nitro-5-(trifluorometil)benzamidias) também mostraram estabilidade enzimática elevada. Assim surgiu a ideia que esses compostos não necessitam ativação pelo hidrólases micobacterianas. Ao pesquisar na internet sobre compostos antimicobacterianos contendo o grupo nitro foi postulado que os nossos compostos atuam de maneira semelhante como os benzotiazinonas e dinitrobenzamidias. Uma série de compostos com atividade conhecida contra a tuberculose e que têm similaridade estrutural com os nossos compostos ativos e um alvo potencial para esses compostos é a enzima DprE1. Esses compostos podem interagir através do seu grupo nitro com um resíduo de cisteína da decaprenilfosforil- $\beta$ -d-ribose 2'-epimerase (DprE1), também covalentemente ou não, bloqueando assim a primeira etapa na reação de epimerização de decaprenil-fosforil-d-ribose (DPR) para decaprenil-fosforil-d-arabinose (DPA), o doador de arabinano para arabinogalactano.<sup>287</sup>

Por fim, foram feitos ensaios de citotoxicidade, em que se obteve o valor de CL<sub>50</sub> e índice de toxicidade/atividade para cada composto sintetizado. Estes resultados demonstraram que ao contrário do que se poderia esperar, apesar de serem tóxicos para as micobactérias os compostos com grupos nitro tiveram a capacidade de manter a sobrevivência dos macrófagos. Assim, o facto de os compostos não apresentarem toxicidade nas células humanas o que é uma característica importante para os pró-fármacos.

## Referências Bibliográficas

1. “WHO | Global tuberculosis report 2019,” WHO, 2020.
2. D. Pires, E. Valente, M. F. Simões, N. Carmo, B. Testa, L. Constantino, and E. Anes, Esters of pyrazinoic acid are active against pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and other naturally resistant mycobacteria in vitro and ex vivo within macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, no. 12, pp. 7693–7699, 2015. DOI: [10.1128/AAC.00936-15](https://doi.org/10.1128/AAC.00936-15).
3. E. Valente, M. F. Simões, B. Testa, and L. Constantino, Development of a method to investigate the hydrolysis of xenobiotic esters by a *Mycobacterium smegmatis* homogenate. *J. Microbiol. Methods*, vol. 85, no. 2, pp. 19–102, May 2011. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.003>.
4. E. Valente, Beta lactamas como inibidores de proteases de serina e ativação de pró-fármacos por esterases. Lisbon, Tese de doutoramento, Farmácia (Química Farmacêutica), Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia 2009. [/\(4\) 21732\\_ulsd057856\\_td.pdf](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.003)
5. M. F. Simões, E. Valente, M. J. R. Gómez, E. Anes, and L. Constantino, Lipophilic pyrazinoic acid amide and ester prodrugs stability, activation and activity against *M. tuberculosis*. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 37, 257–63, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.02.012>.
6. P. Gu, L. Constantino, and Y. Zhang, 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.*, vol. 57, no. Pt 9, pp. 1129–34, Sep. 2008. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/000786-0>.
7. Policarpo, M Uma nova abordagem na obtenção de fármacos ativos contra a tuberculose. Tese de Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica. FFUL, Lisboa, 2020.
8. Pratas, A.R. Prodrugs of weak acids with activity against *M. tuberculosis*. Tese de Mestrado em Bioquímica Médica. FCUL, Lisboa 2017.
9. Freire, R. Estudo de ésteres de derivados de ácido benzóico com álcoois de cadeia longa como pró-fármacos destinados ao tratamento da tuberculose. Tese do Mestrado em Química. FCUL.
10. Kunal Nepali, Hsueh-Yun Lee, and Jing-Ping Liou Nitro-Group-Containing Drugs. *J. Med. Chem.* 2019, 62, 6, 2851–2893. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00147>.
11. Marcus Vinícius Nora de Souza; Thatyana Rocha Alves Vasconcelos. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. *Quím. Nova* v.28 n.4 São Paulo jul./ago. 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000400022>.
12. Ahmad, S. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. *Respiratory Research* volume 11, Article number: 169 (2010). <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-169>.
13. Kenneth, J. R. & Ray, C. G. *Sherris Medical Microbiology*. McGraw-Hill 4TH EDITION (2004).
14. Maria De La Salette Valente, Lino Chieira. Tuberculose extrapulmonar Revisao teorica. *Rev Port Pneumol V (I)*: 75-89. [https://doi.org/10.1016/S0873-2159\(15\)30963-6](https://doi.org/10.1016/S0873-2159(15)30963-6).
15. Bermudez, L. E., Sangari, F. J., Petrofsky, M., Goodman, J. & Kolonoski, P. The Efficiency of the Translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a Bilayer of Epithelial and Endothelial Cells as a Model of the Alveolar Wall Is a Consequence of Transport within Mononuclear Phagocytes and Invasion of Alveolar Epithelial Cells. *Am. Soc. Microbiol.* 70, 140–146 (2002). DOI: [10.1128/IAI.70.1.140-146.2002](https://doi.org/10.1128/IAI.70.1.140-146.2002).
16. Hayley C. King, Tanya Khera-Butler, Phillip James, Brian B. Oakley, Girume Erenso, Abraham Aseffa, Rob Knight, Elizabeth M. Wellington, Orin Courtenay Environmental reservoirs of pathogenic mycobacteria across the Ethiopian biogeographical landscape. Published: March 23, 2017 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173811>.
17. Michael S. Phillips and C. Fordham von Reyn Nosocomial Infections Due to Nontuberculous Mycobacteria. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 33, Issue 8, 15 October 2001, Pages 1363–1374. <https://doi.org/10.1086/323126>.
18. Cassidy, P. M., Hedberg, K., Saulson, A., McNelly, E. & Winthrop, K. L. Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Risk Factors: A Changing Epidemiology. *Clin. Infect. Dis.* 49, e124–e129 (2009). <https://doi.org/10.1086/648443>.
19. Piersimoni, C. Nontuberculous mycobacteria infection in solid organ transplant recipients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 397–403 (2012). PMID: 21732201 DOI: [10.1007/s10096-011-1329-4](https://doi.org/10.1007/s10096-011-1329-4).

20. Warren, R. M. et al. Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 10, 818–822 (2006).
21. Marta Videira Magalhães Estudo da atividade antimicobacteriana e ativação biológica de ésteres de ácidos orgânicos fracos. Tese de Mestrado em Bioquímica FCUL, Lisboa 2012.
22. Schulz GE, Faller M, Niederweis M (2004). The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. *Science* 20 Feb 2004: Vol. 303, Issue 5661, pp. 1189-1192 DOI: 10.1126/science.1094114.
23. Lilian Nascimento Ribeiro. Aspectos da terapia antituberculose precinizada na atenção primária à saúde no Brasil. Monografia em Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte 2015.
24. Campos, Hisbello S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. *Rev. Pulmão*, Rio de Janeiro, v.15, n.1, p.29-35, 2006.
25. Ferreira, W e Sousa, J (2000). *Microbiologia*, Volume 2, Lisboa, Lidel, edições técnicas,Lda.
26. Today's Mycobacterium tuberculosis and Tuberculosis Online Text Book of Bacteriology. (2012). Disponível em: <http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>
27. Murray, Patrick R. et al. *Microbiologia médica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. ISBN: 978-0-323-29956-5.
28. M S Glickman 1, J S Cox, W R Jacobs Jr. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Cell* 2000 Apr;5(4):717-27. PMID: 10882107. DOI: [10.1016/s1097-2765\(00\)80250-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80250-6).
29. Amani M. Alnimir. Dormancy models for Mycobacterium tuberculosis: A minireview. *Braz. J. Microbiol.* vol.46 no.3 São Paulo July/Sept. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246320140507>.
30. Niederweis M, Danilchanka O, Huff J, Hoffmann C, Engelhardt H. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol.* 2010 Mar;18(3):109-16. DOI: [10.1016/j.tim.2009.12.005](https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.005).
31. Antony T. Vincent, Sammy Nyongesa, Isabelle Morneau, Michael B. Reed, Elitza I. Tocheva and Frederic J. Veyrier. The Mycobacterial Cell Envelope: A Relict From the Past or the Result of Recent Evolution? *Front. Microbiol.*, 09 October 2018 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02341>.
32. Jackson M. The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(10):a021105. doi:[10.1101/cshperspect.a021105](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021105).
33. N. Rastogi, E. Legrand & C. Sola. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2001,20 (1), 21-54. DOI: 10.20506/rst.20.1.1265.
34. Boris A. Dmitriev, Stefan Ehlers, Ernst T. Rietschel, Patrick J. Brennan. Molecular mechanics of the mycobacterial cell wall: From horizontal layers to vertical scaffolds. Received April 13,2000· Accepted May 2, 2000. DOI: 10.1016/S1438-4221(00)80122-8.
35. Mary Jackson, Dean C. Crick, and Patrick J. Brennan. Phosphatidylinositol Is an Essential Phospholipid of Mycobacteria. *J Biol Chem.* 2000 Sep 29;275(39):30092-9. DOI: [10.1074/jbc.M004658200](https://doi.org/10.1074/jbc.M004658200).
36. Betty A. Forbes, Geraldine S. Hall, Melissa B. Miller, Susan M. Novak, Marie-Claire Rowlinson, Max Salfinger, Akos Somoskövi, David M. Warshauer, Michael L. Wilson. Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. DOI: [10.1128/CMR.00038-17](https://doi.org/10.1128/CMR.00038-17).
37. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. *Respir Res.* 2001;2(3):164-8. PMC2002067; DOI: [10.1186/rr54](https://doi.org/10.1186/rr54).
38. Giovanni Piccaro, Federico Giannoni, Perla Filippini, Alessandro Mustazzolu, Lanfranco Fattorini Activities of Drug Combinations against Mycobacterium tuberculosis Grown in Aerobic and Hypoxic Acidic Conditions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Mar; 57(3): 1428–1433. doi: [10.1128/AAC.02154-12](https://doi.org/10.1128/AAC.02154-12).
39. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2003;83(1-3):91-7. DOI: [10.1016/s1472-9792\(02\)00089-6](https://doi.org/10.1016/s1472-9792(02)00089-6).
40. Wang L, Slayden RA, Barry CE, 3rd, Liu J. Cell wall structure of a mutant of Mycobacterium smegmatis defective in the biosynthesis of mycolic acids. *J Biol Chem.* 2000 Mar 10;275(10):7224-9. DOI: [10.1074/jbc.275.10.7224](https://doi.org/10.1074/jbc.275.10.7224).
41. Nikaido H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol.* 2001 Jun;12(3):215-23. DOI: 10.1006/scdb.2000.0247.

42. Niederweis M. Mycobacterial porins--new channel proteins in unique outer membranes. *Mol Microbiol.* 2003 Sep;49(5):1167-77. DOI: [10.1046/j.1365-2958.2003.03662.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03662.x).
43. Katzung, Bertram G. *Farmacologia Básica & Clínica* - 13ª Ed. Porto Alegre AMGH, 2017.
44. Goodman & Gilman: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 13.ed. Porto Alegre: Ed. 2019.
45. Ahmed Kamal, Shaik Azeza, M. Shaheer Malik, Ahmad Ali Shaik and Maddamsetty V. Rao. Efforts Towards the Development of New Antitubercular Agents: Potential for Thiolactomycin Based Compounds. *J Pharm Pharmaceut Sci* (www. cpsCanada.org) 11 (2): 56s-80s, 2008. DOI: 10.18433/J36K5K.
46. Tortora, Gerard J.; Funke, Berdell R.; Case, Christine L. *Microbiologia*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
47. Rama P. Tripathi, Neetu Tewari, Namrata Dwivedi, Vinod K. Tiwari *Fighting Tuberculosis: An Old Disease with New Challenges*. (2004) Medicinal and Process Chemistry Division, Central Drug Research Institute, Lucknow, 226001, India. <https://doi.org/10.1002/med.20017>.
48. Yves L. Janin. Antituberculosis drugs: Ten years of research. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (2007) 2479–2513. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.030>.
49. Y. Zhang, D. Mitchison. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* 7(1):6–21 © 2003 IUATLD. PMID: 12701830.
50. Ying Zhang. The Magic Bullets And Tuberculosis Drug Targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005. 45:529–64 doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.100120.
51. Almeida Da Silva PE , Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1417–30. DOI: [10.1093/jac/dkr173](https://doi.org/10.1093/jac/dkr173).
52. Ying Zhang, Wanliang Shi1, Wenhong Zhang and Denis Mitchison. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr.* 2013 ; 2(4): 1–12. DOI: [10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013).
53. Lima, C. H. S.; Bispo, M. L. F.; de Souza, M. V. N. Pirazinamida: Um Fármaco Essencial no Tratamento da Tuberculose. *Rev. Virtual Quim.*, 2011, 3 (3), 159-180.
54. Baulard AR, Betts JC, Engohang N, Quan S, McAdam RA, Brennan PJ, Locht C, Besra GS. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J Biol Chem* 2000; 275: 28326–28331. DOI: 10.1074/jbc.M003744200.
55. Vannelli, T. A. et al. (2002). The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. *J Biol Chem*, 277, pp. 12824-12829. Disponível em: <https://www.jbc.org/content/277/15/12824.long>.
56. Peter N. Bennett, Morris J. Brown and Pankaj Sharma. *Clinical Pharmacology* (Eleventh Edition) 2012, Elsevier Ltd. All ISBN 978-0-7020-4084-9.
57. Veziris, N.; Truffot-Pernot, C.; Aubry, A.; Jarlier, V.; Lounis, N. Fluoroquinolone-Containing Third-Line Regimen against *Mycobacterium tuberculosis* In Vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 3117–3122. doi: [10.1128/AAC.47.10.3117-3122.2003](https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3117-3122.2003).
58. Yew, W. W.; Chan, C. K.; Leung, C. C.; Chau, C. H.; Tam, C. M.; Wong, P. C.; Lee, J. Comparative Roles of Levofloxacin and Ofloxacin in the Treatment of MultidrugResistant Tuberculosis. *Chest* 2003, 124, 1476–1481. <https://doi.org/10.1378/chest.124.4.1476>.
59. MedicineNet. Medical Definition of Prodrug. <http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=23992>.
60. Patrick, E. J. *An Introduction to Medicinal Chemistry* (Third Edition). vol. 6 (Oxford University Press Inc., United Kingdom, 2013).
61. Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T. & Oliyai, R. Prodrugs: design and clinical applications. *Nature Reviews* 7, 255–270 (2008). DOI: 10.1038/nrd2468.
62. Shirke, S., Shewale, S. & Satpute, M. Design: An Overview. *IJPRBS* 5, 232–241 (2015).
63. Liederer, B. M. & Borchardt, R. T. Enzymes Involved in the Bioconversion of EsterBased Prodrugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 95, 1177–1195 (2006). <https://doi.org/10.1002/jps.20542>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jps.20542>.
64. Testa, B. & Mayer, J. M. *Hydrolysis in drug and prodrug metabolism: Chemistry, biochemistry, and enzymology* (First Edition), Wiley-VCH GmbH & Co, KGaA e Veriag Hekvetica Chimica Acta. (2006).

65. Wu, K.M., 2009. A new classification of prodrugs: Regulatory perspectives. *Pharmaceuticals* 2, 77–81. <https://doi.org/10.3390/ph2030077>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3978533/>.
66. Testa, B., 2009. Prodrugs: bridging pharmacodynamic/pharmacokinetic gaps. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.620>.
67. Huttunen, K.M., Raunio, H., Rautio, J., 2011. Prodrugs—from Serendipity to Rational Design. *Pharmacol. Rev.* 63, 750–771. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003459>.
68. Stella, V.J., 2010. Prodrugs: Some Thoughts and Current Issues. *J. Pharm. Sci.* 101, 2271–2280. <https://doi.org/10.1002/jps.22205>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jps.22205>.
69. Müller, C. E. Prodrug approaches for enhancing the bioavailability of drugs with low solubility. *Chem. Biodivers.* 6, 2071–2083 (2009). DOI: 10.1002/cbdv.200900114.
70. Zawilska, J.B., Wojcieszak, J., Olejniczak, A.B., 2013. Prodrugs: A challenge for the drug development. *Pharmacol. Reports* 65, 1–14. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)70959-9](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)70959-9).
71. Das, N., Dhanawat, M., Dash, B., Nagarwal, R.C., Shrivastava, S.K., 2010. Codrug: An efficient approach for drug optimization. *Eur. J. Pharm. Sci.* 41, 571–588. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.09.014>.
72. Kokil, G.R., Rewatkar, P. V, 2010. Bioprecursor Prodrugs: Molecular Modification of the Active Principle. *Mini-Reviews Med. Chem.* 10, 1316–1330. <https://doi.org/10.2174/138955710793564179>.
73. Graf, N., Lippard, S.J., 2012. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 993–1004. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.01.007>.
74. Man-Chin Chung; Antonio Távora de Albuquerque Silva; Lúcia Fioravanti Castro; Rafael Victório Carvalho Güido; José Carlos Nassute; Elizabeth Igne Ferreira. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* vol.41 no.2 São Paulo Apr./June 2005. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322005000200004>.
75. Etmayer, P.; Amidon, G. L.; Clement, B.; Testa, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.*, v. 47, p. 2393-2404, 2004. <https://doi.org/10.1021/jm0303812>.
76. Wermuth, C. G. Designing prodrugs and bioprecursors In: 3 ed. *The practice of medicinal chemistry*, London: Academic Press, 2008. p. 697-716.
77. Giorgia Mori, Laurent Roberto Chiarelli, Giovanna Riccardi and Maria Rosalia Pasca. New prodrugs against tuberculosis. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.09.006>.
78. Man Chin Chung, Elizabeth Igne Ferreira, Jean Leandro Santos, Jeanine Giarolla, Daniela Gonçalves Rando, Adélia Emília Almeida, Priscila Longhin Bosquesi, Renato Farina Menegon and Lorena Blau. Prodrugs for the Treatment of Neglected Diseases. *Molecules* 2008, 13(3), 616-677; <https://doi.org/10.3390/molecules13030616>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6245083/>.
79. Erik M. Larsen, Dominique C. Stephens, Nathan H. Clarke, and R. Jeremy Johnson. Ester-prodrugs of ethambutol control its antibacterial activity and provide rapid screening for mycobacterial hydrolase activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017 Oct 1; 27(19): 4544–4547. doi: [10.1016/j.bmcl.2017.08.057](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.057).
80. Vale, N. et al. (2013) Metabolism of the antituberculosis drug ethionamide. *Curr. Drug. Metab.* 14, 151–158. DOI: 10.2174/138920013804545151.
81. Njire, M. et al. (2016) Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: review and update. *Adv. Med. Sci.* 61, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2015.09.007>.
82. Whitfield, M.G. et al. (2015) A global perspective on pyrazinamide resistance: systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 10, e0133869. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133869>.
83. Ghiladi, R. A.; Medzihardsky, K. F.; Rusnak, F. M.; de Montellano, P. R. O. Correlation between isoniazid resistance and superoxide reactivity in mycobacterium tuberculosis katG. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 13428–13442. <https://doi.org/10.1021/ja054366t>.
84. Vilche`ze, C. and Jacobs, W.R., Jr (2014) Resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: genes, mutations, and causalities. *Microbiol. Spectr.* 2 MGM2-0014-2013. DOI: [10.1128/microbiolspec.MGM2-0014-2013](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0014-2013).
85. Belardinelli, J.M. and Morbidoni, H.R. (2012) Mutations in the essential FAS II bhydroxyacyl ACP dehydratase complex confer resistance to thiacetazone in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium kansasii*. *Mol. Microbiol.* 86, 568–579. <https://doi.org/10.1111/mmi.12005>.

86. Erik M. Larsen, R. Jeremy Johnson. Microbial esterases and ester prodrugs: An unlikely marriage for combating antibiotic resistance. (2018) *Drug Dev Res.* 2019;80:33–47. <https://doi.org/10.1002/ddr.21468>.
87. Tian L, Yang Y, Wysocki LM, et al. Selective esterase–ester pair for targeting small molecules with cellular specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012; 109(13):4756–4761. DOI: [10.1073/pnas.1111943109](https://doi.org/10.1073/pnas.1111943109).
88. Tallman KR, Levine SR, Beatty KE. Small-molecule probes reveal esterases with persistent activity in dormant and reactivating *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Infect Dis.* 2016; 2(12): 936–944. PubMed: 27690385. <https://doi.org/10.1021/acinfecdis.6b00135>.
89. Simon GM, Cravatt BF. Activity-based proteomics of enzyme superfamilies: serine hydrolases as a case study. *J Biol Chem.* 2010; 285(15):11051–11055. DOI: [10.1074/jbc.R109.097600](https://doi.org/10.1074/jbc.R109.097600).
90. Long JZ, Cravatt BF. The metabolic serine hydrolases and their functions in mammalian physiology and disease. *Chem Rev.* 2011; 111(10):6022–6063. PubMed: 21696217. doi: [10.1021/cr200075y](https://doi.org/10.1021/cr200075y).
91. Draganov DI, La Du BN. 2004. Pharmacogenetics of paraoxonases: A brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369:78–88. DOI: [10.1007/s00210-003-0833-1](https://doi.org/10.1007/s00210-003-0833-1).
92. Rodrigo L, Hernandez AF, Lopez-Caballero JJ, Gil F, Pla A. 2001. Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. Implications for its physiological role. *Chem Biol Interact* 137: 123–137. DOI: [10.1016/s0009-2797\(01\)00225-3](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(01)00225-3).
93. Satoh T, Hosokawa M. 1998. The mammalian carboxylesterases: From molecules to functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:257–288. DOI: [10.1146/annurev.pharmtox.38.1.257](https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.257).
94. Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, Shimma N, Umeda I, Ishitsuka H. 1998. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer* 34:1274–1281. DOI: [10.1016/s0959-8049\(98\)00058-6](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(98)00058-6).
95. Yan B, Matoney L, Yang D. 1999. Human carboxylesterases in term placentae: Enzymatic characterization, molecular cloning and evidence for the existence of multiple forms. *Placenta* 20: 599–607. <https://doi.org/10.1053/plac.1999.0407>.
96. Rotundo RL. 2003. Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Neurocytol* 32:743–766. DOI: [10.1023/B:NEUR.0000020621.58197.d4](https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000020621.58197.d4).
97. Berninsone P, Katz E, Napp M, Azcurra J. 1989. Acetylcholinesterase and nonspecific cholinesterase activities in rat liver: Subcellular localization, molecular forms, and some extraction properties. *Biochem Cell Biol* 67:817–822. DOI: [10.1139/o89-121](https://doi.org/10.1139/o89-121).
98. Sanchez-Chavez G, Vidal CJ, Salceda R. 1995. Acetyl- and butyrylcholinesterase activities in the rat retina and retinal pigment epithelium. *J Neurosci Res* 41:655–662. <https://doi.org/10.1002/jnr.490410512>.
99. Hahn T, Desoye G, Lang I, Skofitsch G. 1993. Location and activities of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the rat and human placenta. *Anat Embryol (Berl)* 188:435–440. DOI: [10.1007/BF00190137](https://doi.org/10.1007/BF00190137).
100. Jiří Patočka, Kamil Kuča, Daniel Jun. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *ACTA MEDICA (Hradec Králové)* 2004;47(4):215–228.
101. Ling G, Gu J, Genter MB, Zhuo X, Ding X. 2004. Regulation of cytochrome P450 gene expression in the olfactory mucosa. *Chem Biol Interact* 147: 247–258. DOI: [10.1016/j.cbi.2004.02.003](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.02.003).
102. Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. 2004. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet* 43:487–514. DOI: [10.2165/00003088-200443080-00001](https://doi.org/10.2165/00003088-200443080-00001).
103. Oyama T, Kagawa N, Kunugita N, Kitagawa K, Ogawa M, Yamaguchi T, Suzuki R, Kinaga T, Yashima Y, Ozaki S, Isse T, Kim YD, Kim H, Kawamoto T. 2004. Expression of cytochrome P450 in tumor tissues and its association with cancer development. *Front Biosci* 9:1967–1976. DOI: [10.2741/1378](https://doi.org/10.2741/1378).
104. Tsunehiro Oyama, Hidetaka Uramoto, Norio Kagawa, Takashi Yoshimatsu, Toshihiro Osaki, Ryoichi Nakanishi, Hisao Nagaya 2, Kazuhiro Kaneko, Manabu Muto, Toshihiro Kawamoto, Fumihiro Tanaka, Akinobu Gotoh. Cytochrome P450 in non-small cell lung cancer related to exogenous chemical metabolism. *Frontiers in Bioscience S4*, 1539-1546, June 1, 2012. DOI: [10.2741/s350](https://doi.org/10.2741/s350).

105. Liederer BM, Borchardt RT. 2005. Stability of oxymethyl-modified coumarinic acid cyclic prodrugs of diastereomeric opioid peptides in biological media from various animal species including human. *J Pharm Sci* 94:2198–2206. <https://doi.org/10.1002/jps.20452>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jps.20452>.
106. Ngawhirunpat T, Kawakami N, Hatanaka T, Kawakami J, Adachi I. 2003. Age dependency of esterase activity in rat and human keratinocytes. *Biol Pharm Bull* 26:1311–1314. DOI: 10.1248/bpb.26.1311.
107. Moser VC, Chanda SM, Mortensen SR, Padilla S. 1998. Age- and gender-related differences in sensitivity to chlorpyrifos in the rat reflect developmental profiles of esterase activities. *Toxicol Sci* 46:211–222. <https://doi.org/10.1093/toxsci/46.2.211>.
108. Hamada, Y. (2017). Recent progress in prodrug design strategies based on generally applicable modifications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(8), 1627–1632. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.075>.
109. Yang, Y.-H., Aloysius, H., Inoyama, D., Chen, Y., & Hu, L.-Q. (2011). Enzyme-mediated hydrolytic activation of prodrugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 1(3), 143–159. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2011.08.001>.
110. Zou, L. W., Jin, Q., Wang, D. D., Qian, Q. K., Hao, D. C., Ge, G. B., & Yang, L. (2018). Carboxylesterase inhibitors: An update. *Current Medicinal Chemistry*, 25(14), 1627–1649. DOI: 10.2174/0929867325666171204155558.
111. Bernard Testa and Stefanie D.Kr&mer. The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction Part 3.Reactions of Hydrolysis and Their Enzymes. *Chem Biodivers*. 2007 Sep;4(9):2031-122. DOI: 10.1002/cbdv.200790169.
112. Solomons, T. W. G. & Fryhle, C. B. *Organic Chemistry*. (Wiley, 2011).
113. Yingfei Chen, Daniel S. Black and Peter J. Reilly. Carboxylic ester hydrolases: Classification and database derived from their primary, secondary, and tertiary structures. *Protein Sci*. 2016 Nov; 25(11): 1942–1953. [doi: 10.1002/pro.3016](https://doi.org/10.1002/pro.3016).
114. March Jerry. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanism, and Structure* (2<sup>a</sup> Edição), McGraw-Hill (1977).
115. Hunt, I. Chapter 20: Carboxylic Acid Derivatives. Nucleophilic Acyl Substitution. *Organic Chemistry On-Line Learning Center* (2006). Available at: <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/Carey5th/Ch20/ch20-3-3-1.html>.
116. Gareth, T. *Medicinal Chemistry: an Introduction*. (John Wiley, 2007).
117. Dandan Wanga, Liwei Zoua, Qiang Jina, Jie Houb, Guangbo Gea, Ling Yang. Human carboxylesterases: a comprehensive review. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2018;8(5):699–712. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.05.005>.
118. G. Dodson, A. Wlodawer, J. Catalytic triads and their relativesK, *Trends Biochem. Sci*. 1998, 23, 347–352. DOI: 10.1016/s0968-0004(98)01254-7.
119. Sillitoe I, Lewis TE, Cuff A, Das S, Ashford P, Dawson NL, Furnham N, Laskowski RA, Lee D, Lees JG, Lehtinen S, Studer RA, Thornton J, Orengo CA (2015) CATH: comprehensive structural and functional annotations for genome sequences. *Nucleic Acids Res* 43:D376–D381. [doi: 10.1093/nar/gku947](https://doi.org/10.1093/nar/gku947).
120. Satoh T, Hosokawa M. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chem. Biol. Interact*. 2006;162:195–211. DOI: 10.1016/j.cbi.2006.07.001.
121. Hay Dvir, Israel Silman, Michal Harel, Terrone L. Rosenberry, and Joel L. Sussmana. Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chem Biol Interact*. 2010 Sep 6; 187(1-3): 10–22. [doi: 10.1016/j.cbi.2010.01.042](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042).
122. Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Nachon F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J. Biol. Chem*. 2003;278:41141–7. [doi: 10.1074/jbc.M210241200](https://doi.org/10.1074/jbc.M210241200).
123. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2004;11:412–9.
124. Laizure, S. C., Herring, V., Hu, Z., Witbrodt, K. & Parker, R. B. The Role of Human Carboxylesterases in Drug Metabolism: Have We Overlooked Their Importance? *Pharmacotherapy* 33, 210–222 (2013). DOI: 10.1002/phar.1194.

125. Heikinheimo, P., Goldman, A., Jeffries, C. & Ollis, D. L. Of barn owls and bankers: A lush variety of  $\alpha/\beta$  hydrolases. *Structure* 7, 141–146 (1999). DOI: [10.1016/s0969-2126\(99\)80079-3](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(99)80079-3).
126. Lee, C. W. et al. Crystal Structure and Functional Characterization of an Esterase (Ea EST from *Exiguobacterium antarcticum*. *Plos One* 12, 1–19 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169540>.
127. Fukami, T. & Yokoi, T. The emerging role of human esterases. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 27, 466–477 (2012). DOI: 10.2133/dmpk.dmpk-12-rv-042.
128. Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. N. & Petersen, S. B. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie* 82, 1033–1041 (2000). DOI: [10.1016/s0300-9084\(00\)01188-3](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(00)01188-3).
129. Bornscheuer, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology reviews* 26, 73–81 (2002). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00599.x>.
130. Busto, E., Gotor-Fernandez, V., & Gotor, V. (2010). Hydrolases: Catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis. *Chemical Society Reviews*, 39(11), 4504–4523. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2010/cs/c003811c#!divAbstract>.
131. Jochens, H., Hesseler, M., Stiba, K., Padhi, S. K., Kazlauskas, R. J., & Bornscheuer, U. T. (2011). Protein engineering of alpha/beta-hydrolase fold enzymes. *ChemBioChem*, 12(10), 1508–1517. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000771>.
132. Kourist, R., Jochens, H., Bartsch, S., Kuipers, R., Padhi, S. K., Gall, M., ... Bornscheuer, U. T. (2010). The alpha/beta-hydrolase fold 3DM database (ABHDB) as a tool for protein engineering. *ChemBioChem*, 11(12), 1635–1643. DOI: [10.1002/cbic.201000213](https://doi.org/10.1002/cbic.201000213).
133. Martinez-Martinez, M., Coscolin, C., Santiago, G., Chow, J., Stogios, P. J., Bargiela, R., ... Ferrer, M. (2018). Determinants and prediction of esterase substrate promiscuity patterns. *ACS Chemical Biology*, 13(1), 225–234. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00996>.
134. Filip Kovačić, Joachim Granzin, Susanne Wilhelm, Biserka Kojić-Prodić, Renu Batra-Safferling, Karl-Erich Jaeger. (2013). Structural and functional characterisation of TesA—a novel lysophospholipase A from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 8(7), e69125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069125>.
135. Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Sanders, S. A., Reinking, J., Savchenko, A., Arrowsmith, C. H., ... Yakunin, A. F. (2005). Enzyme genomics: Application of general enzymatic screens to discover new enzymes. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(2), 263–279. DOI: [10.1016/j.femsre.2004.12.006](https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.006).
136. Ivana Lesčić Asler, Zoran Štefanić, Aleksandra Marsavelski, Robert Vianello, and Biserka Kojic-Prodic. (2017). Catalytic dyad in the SGNH hydrolase superfamily: In-depth insight into structural parameters tuning the catalytic process of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *ACS Chemical Biology*, 12(7), 1928–1936. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01140>.
137. Wilhelm, S., Rosenau, F., Kolmar, H., & Jaeger, K. E. (2011). Autotransporters with GDLS passenger domains: Molecular physiology and biotechnological applications. *ChemBiochem*, 12(10), 1476–1485. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100013>.
138. Singh, G., Jadeja, D., & Kaur, J. (2010). Lipid hydrolyzing enzymes in virulence: *Mycobacterium tuberculosis* as a model system. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(3), 259–269. DOI: [10.3109/1040841X.2010.482923](https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.482923).
139. Dedieu, L., Serveau-Avesque, C., Kremer, L., & Canaan, S. (2013). Mycobacterial lipolytic enzymes: A gold mine for tuberculosis research. *Biochimie*, 95(1), 66–73. DOI: [10.1016/j.biochi.2012.07.008](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.07.008).
140. Crellin, P. K., Vivian, J. P., Scoble, J., Chow, F. M., West, N. P., Brammananth, R., ... Beddoe, T. (2010). Tetrahydrolipstatin inhibition, functional analyses, and three-dimensional structure of a lipase essential for mycobacterial viability. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(39), 30050–30060. DOI: [10.1074/jbc.m110.150094](https://doi.org/10.1074/jbc.m110.150094).
141. McKary, M. G., Abendroth, J., Edwards, T. E., & Johnson, R. J. (2016). Structural basis for the strict substrate selectivity of the mycobacterial hydrolase LipW. *Biochemistry*, 55(51), 7099–7111. DOI: [10.1021/acs.biochem.6b01057](https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01057).
142. Zheng, X., Guo, J., Xu, L., Li, H., Zhang, D., Zhang, K., ... Pang, H. (2011). Crystal structure of a novel esterase Rv0045c from *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 6(5), e20506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020506>.

143. Lukowski, J. K., Savas, C. P., Gehring, A. M., McKary, M. G., Adkins, C. T., Lavis, L. D., ... Johnson, R. J. (2014). Distinct substrate selectivity of a metabolic hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 53(47), 7386–7395. <https://doi.org/10.1021/bi501108u>.
144. Sultana, R., Tanneeru, K., Kumar, A. B., & Guruprasad, L. (2016). Prediction of certain well-characterized domains of known functions within the PE and PPE proteins of mycobacteria. *PLoS One*, 11(2), e0146786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146786>.
145. Fishbein, S., van Wyk, N., Warren, R. M., & Sampson, S. L. (2015). Phylogeny to function: PE/PPE protein evolution and impact on *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Molecular Microbiology*, 96(5), 901–916. DOI: 10.1111/mmi.12981.
146. Sultana, R., Tanneeru, K., & Guruprasad, L. (2011). The PE-PPE domain in mycobacterium reveals a serine  $\alpha/\beta$  hydrolase fold and function: An in-silico analysis. *PLoS One*, 6(2), e16745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016745>.
147. Singh, P., Rao, R. N., Reddy, J. R. C., Prasad, R., Kotturu, S. K., Ghosh, S., & Mukhopadhyay, S. (2016). PE11, a PE/PPE family protein of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in cell wall remodeling and virulence. *Scientific Reports*, 6, 21624. DOI: 10.1038/srep21624.
148. Sultana, R., Vemula, M. H., Banerjee, S., & Guruprasad, L. (2013). The PE16 (Rv1430) of *Mycobacterium tuberculosis* is an esterase belonging to serine hydrolase superfamily of proteins. *PLoS One*, 8(2), e55320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055320>.
149. Bala Divya M, Vemula, M., Balakrishnan, K., Banerjee, S., & Guruprasad, L. (2018). *Mycobacterium tuberculosis* PE1 and PE2 proteins carrying conserved  $\alpha/\beta$ -serine hydrolase domain are esterases hydrolyzing short to medium chain p-nitrophenyl esters. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.04.012>.
150. Rastogi, S., Singh, A. K., Pant, G., Mitra, K., Sashidhara, K. V., & Krishnan, M. Y. (2017). Down-regulation of PE11, a cell wall associated esterase, enhances the biofilm growth of *Mycobacterium tuberculosis* and reduces cell wall virulence lipid levels. *Microbiology*, 163(1), 52–61. DOI: 10.1099/mic.0.000417.
151. Deb, C., Daniel, J., Sirakova, T. D., Abomoelak, B., Dubey, V. S., & Kolattukudy, P. E. (2006). A novel lipase belonging to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 3866–3875. DOI: 10.1074/jbc.M505556200.
152. Delorme, V., Diomande, S. V., Dedieu, L., Cavalier, J. F., Carriere, F., Kremer, L., ... Cnaan, S. (2012). MmPPOX inhibits *Mycobacterium tuberculosis* lipolytic enzymes belonging to the hormone-sensitive lipase family and alters mycobacterial growth. *PLoS One*, 7(9), e46493. DOI: 10.1371/journal.pone.0046493.
153. Low, K. L., Rao, P. S., Shui, G., Bendt, A. K., Pethe, K., Dick, T., Wenk, M. R. (2009). Triacylglycerol utilization is required for regrowth of in vitro hypoxic nonreplicating *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Journal of Bacteriology*, 191(16), 5037–5043. DOI: 10.1128/jb.00530-09.
154. Daleke, M. H., Cascioferro, A., de Punder, K., Ummels, R., Abdallah, A. M., van der Wel, N., ... Bitter, W. (2011). Conserved Pro-Glu (PE) and Pro-Pro-Glu (PPE) protein domains target LipY lipases of pathogenic mycobacteria to the cell surface via the ESX-5 pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 19024–19034. DOI: 10.1074/jbc.M110.204966.
155. Garrett, C. K., Broadwell, L. J., Hayne, C. K., & Neher, S. B. (2015). Modulation of the activity of *Mycobacterium tuberculosis* LipY by its PE domain. *PLoS One*, 10(8), e0135447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135447>.
156. Mishra, K. C., De Chastellier, C., Narayana, Y., Bifani, P., Brown, A. K., Besra, G. S., ... Kremer, L. (2008). Functional role of the PE domain and immunogenicity of the *Mycobacterium tuberculosis* triacylglycerol hydrolase LipY. *Infection and Immunity*, 76(1), 127–140. DOI: 10.1128/iai.00410-07.
157. Singh, V. K., Srivastava, V., Singh, V., Rastogi, N., Roy, R., Shaw, A. K., ... Srivastava, B. S. (2011). Overexpression of Rv3097c in *Mycobacterium bovis* BCG abolished the efficacy of BCG vaccine to protect against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Vaccine*, 29(29–30), 4754–4760. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.04.086.
158. Singh, V. K., Srivastava, M., Dasgupta, A., Singh, M. P., Srivastava, R., & Srivastava, B. S. (2014). Increased virulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv overexpressing LipY in a murine model. *Tuberculosis*, 94(3), 252–261. DOI: 10.1016/j.tube.2014.02.001.

159. Satpati, S., Behera, P., & Dixit, A. (2016). Identification of LipY inhibitors as antitubercular agents using stepwise virtual screening. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 6, 400–413.
160. Saxena, A. K., Roy, K. K., Singh, S., Vishnoi, S. P., Kumar, A., Kashyap, V. K., ... Srivastava, B. S. (2013). Identification and characterisation of small-molecule inhibitors of Rv3097c-encoded lipase (LipY) of *Mycobacterium tuberculosis* that selectively inhibit growth of bacilli in hypoxia. *The International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(1), 27–35. DOI: [10.1016/j.ijantimicag.2013.03.007](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.03.007).
161. Singh, V., & Mizrahi, V. (2017). Identification and validation of novel drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Drug Discovery Today*, 22(3), 503–509. DOI: [10.1016/j.drudis.2016.09.010](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.09.010).
162. Stephen Patterson and Susan Wyllie. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. (2014) *Trends in Parasitology* 30 (6), 289-298. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003>.
163. Meanwell, N.A. (2011) Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. *J. Med. Chem.* 54, 2529–2591. <https://doi.org/10.1021/jm1013693>.
164. Whitmore, G.F. and Varghese, A.J. (1986) The biological properties of reduced nitroheterocycles and possible underlying biochemical mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 35, 97–103.
165. Fávero Reisdorfer Paulai; Silvia Helena Pires Serrano; Leoberto Costa Tavares. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Quím. Nova* vol.32 no.4 São Paulo 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400032>.
166. Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Oct;15(4):716-46. DOI: [10.1128/cmr.15.4.716-746.2002](https://doi.org/10.1128/cmr.15.4.716-746.2002).
167. Iuri Marques de Oliveira. Nitrorredutases: um estudo das possíveis funções na resposta ao estresse oxidativo. Tese de doutoramento. Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Porto Alegre. 2013.
168. Jim C. Spain. Biodegradation of Nitroaromatic Compounds. *Ann~Rev. Microbiol.*1995.49:523-55.
169. Ju, K. S.; Parales, R. E. Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010, 74, 250– 72. DOI: [10.1128/MMBR.00006-10](https://doi.org/10.1128/MMBR.00006-10).
170. Noboru, O. *The Nitro Group in Organic Synthesis*; Wiley VCH: Weinheim, Germany, 2001; pp 1–363. Disponível em: <https://studfile.net/preview/409973/page:15/>.
171. Gulley, J. L.; Drake, C. G. Immunotherapy for prostate cancer: recent advances, lessons learned, and areas for further research. *Clin. Cancer Res.* 2011, 17, 3884–3891. (b) Lee, M.; Sharifi, R. Benign prostatic hyperplasia: diagnosis and treatment guideline. *Ann. Pharmacother.* 1997, 31, 481–486. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-10-2656](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2656).
172. DHHS/National Toxicology Program; Eleventh Report on Carcinogens: Metronidazole (443-48-1) (January 2005).
173. FDA Approves Symbiomix Therapeutics' Solosec (secnidazole) Oral Granules for the Treatment of Bacterial Vaginosis in Adult Women, September 18, 2017. Disponível em: <https://www.chemdiv.com/fda-approves-symbiomix-therapeutics-solosec-secnidazole-oral-granules-treatment-bacterial-vaginosis-adult-women/>.
174. Lopez Nigro, M. M.; Carballo, M. A. Genotoxicity and cell death induced by tinidazole (TNZ). *Toxicol. Lett.* 2008, 180, 46–52. DOI: [10.1016/j.toxlet.2008.05.017](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.05.017).
175. Fung, H. B.; Doan, T. L. Tinidazole: a nitroimidazole antiprotozoal agent. *Clin. Ther.* 2005, 27, 1859–1884. DOI: [10.1016/j.clinthera.2005.12.012](https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.12.012).
176. Raether, W.; Hanel, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitol. Res.* 2003, 90 (Suppl. 1), S19–S39. DOI: [10.1007/s00436-002-0754-9](https://doi.org/10.1007/s00436-002-0754-9).
177. Chris Bot, Belinda S. Hall, Noosheen Bashir, Martin C. Taylor, Nuala A. Helsby,3 and Shane R. Wilkinson. Trypanocidal Activity of Aziridinyl Nitrobenzamide Prodrugs. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Oct. 2010, p. 4246–4252. DOI: [10.1128/aac.00800-10](https://doi.org/10.1128/aac.00800-10).
178. Truong, D.D. (2009) Tolcapone: review of its pharmacology and use as adjunctive therapy in patients with Parkinson's disease. *Clin. Interv. Aging* 4, 109–113. doi: [10.2147/cia.s3787](https://doi.org/10.2147/cia.s3787).

179. Sorkin, E.M. et al. (1985) Nifedipine. A review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy, in ischaemic heart disease, hypertension and related cardiovascular disorders. *Drugs* 30, 182–274. DOI: [10.2165/00003495-198530030-00002](https://doi.org/10.2165/00003495-198530030-00002).
180. Mattila, M.A.K. and Larni, H.M. (1980) Flunitrazepam: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs* 20, 353–374. DOI: [10.2165/00003495-198020050-00002](https://doi.org/10.2165/00003495-198020050-00002).
181. Lucienne Tritten, Angelika Silbereisen, Jennifer Keiser. Nitazoxanide: In vitro and in vivo drug effects against *Trichuris muris* and *Ancylostoma ceylanicum*, alone or in combination. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 2 (2012) 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.02.004>.
182. Pal, D. et al. (2009) Giardia, Entamoeba and Trichomonas enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 458–464. DOI: [10.1128/AAC.00909-08](https://doi.org/10.1128/AAC.00909-08).
183. Ruchelman, A. L.; Singh, S. K.; Wu, X.; Ray, A.; Yang, J.-M.; Li, T.-K.; Liu, A.; Liu, L. F.; LaVoie, E. J. Diaza- and triazachrysenes: Potent topoisomerase-targeting agents with exceptional antitumor activity against the human tumor xenograft, MDAMB-435. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12, 3333–3336. DOI: [10.1016/s0960-894x\(02\)00737-0](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(02)00737-0).
184. Ruchelman, A. L.; Singh, S. K.; Ray, A.; Wu, X.; Yang, J.-M.; Li, T.-K.; Liu, A.; Liu, L. F.; LaVoie, E. J. 5H-Dibenzo[c,h][1,6]-naphthyridin-6-ones: Novel topoisomerase I-targeting anticancer agents with potent cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 2061–2073. DOI: [10.1016/s0968-0896\(03\)00051-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(03)00051-8).
185. Singh, S. K.; Ruchelman, A. L.; Li, T. K.; Liu, A.; Liu, L. F.; LaVoie, E. J. Nitro and amino substitution in the D-Ring of 5-(2-dimethylaminoethyl)-2,3-methylenedioxy-5H-dibenzo[c,h][1,6]-naphthyridin-6-ones: Effect on topoisomerase-I targeting activity and cytotoxicity. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 2254–2257. DOI: [10.1021/jm020498a](https://doi.org/10.1021/jm020498a).
186. Morrell, A.; Placzek, M.; Parmley, S.; Antony, S.; Dexheimer, T. S.; Pommier, Y.; Cushman, M. Nitrated indenoisoquinolines as topoisomerase I inhibitors: a systematic study and optimization. *J. Med. Chem.* 2007, 50, 4419–4430. <https://doi.org/10.1021/jm200719v>.
187. Thomas, M.; Clarhaut, J.; Tranoy-Opalinski, I.; Gesson, J. P.; Roche, J.; Papot, S. Synthesis and biological evaluation of glucuronide prodrugs of the histone deacetylase inhibitor CI-994 for application in selective cancer chemotherapy. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 8109–8116. DOI: [10.1016/j.bmc.2008.07.048](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.048).
188. Tan, S.; He, F.; Kong, T.; Wu, J.; Liu, Z. Design, synthesis and tumor cell growth inhibitory activity of 3-nitro-2H-chromene derivatives as histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2017, 25, 4123–4132. DOI: [10.1016/j.bmc.2017.05.062](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.062).
189. Zhu, R.; Liu, M. C.; Luo, M. Z.; Penketh, P. G.; Baumann, R. P.; Shyam, K.; Sartorelli, A. C. 4-Nitrobenzyloxycarbonyl derivatives of O6-benzylguanine as hypoxia-activated prodrug inhibitors of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase (AGT), which produces resistance to agents targeting the O-6 position of DNA guanine. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 7720–7728. DOI: [10.1021/jm201115f](https://doi.org/10.1021/jm201115f).
190. Zheng, Y. B.; Gong, J. H.; Liu, X. J.; Wu, S. Y.; Li, Y.; Xu, X. D.; Shang, B. Y.; Zhou, J. M.; Zhu, Z. L.; Si, S. Y.; Zhen, Y. S. A novel nitrobenzoate microtubule inhibitor that overcomes multidrug resistance exhibits antitumor activity. *Sci. Rep.* 2016, 6, 31472. DOI: [10.1038/srep31472](https://doi.org/10.1038/srep31472).
191. Winn, B. A.; Shi, Z.; Carlson, G. J.; Wang, Y.; Nguyen, B. L.; Kelly, E. M.; Ross, D.; Hamel, E.; Chaplin, D. J.; Trawick, M. L.; Pinney, K. G. Bioreductively activatable prodrug conjugates of phenstatin designed to target tumor hypoxia. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017, 27, 636–641. DOI: [10.1016/j.bmcl.2016.11.093](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.093).
192. Tercel, M.; Atwell, G. J.; Yang, S.; Stevenson, R. J.; Botting, K. J.; Boyd, M.; Smith, E.; Anderson, R. F.; Denny, W. A.; Wilson, W. R.; Pruijn, F. B. Hypoxia-activated prodrugs: substituent effects on the properties of nitro seco-1,2,9,9a-tetrahydrocyclopropa[c]benz[e]-indol-4-one (nitrocbi) prodrugs of DNA minor groove alkylating agents. *J. Med. Chem.* 2009, 52, 7258–7272. DOI: [10.1021/jm901202b](https://doi.org/10.1021/jm901202b).
193. Ikeda, Y.; Hisano, H.; Nishikawa, Y.; Nagasaki, Y. Targeting and treatment of tumor hypoxia by newly designed prodrug possessing high permeability in solid tumors. *Mol. Pharmaceutics* 2016, 13, 2283–2289. DOI: [10.1021/acs.molpharmaceut.6b00011](https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00011).
194. Rami, M.; Dubois, L.; Parvathaneni, N. K.; Alterio, V.; van Kuijk, S. J.; Monti, S. M.; Lambin, P.; De Simone, G.; Supuran, C. T.; Winum, J. Y. Hypoxia-targeting carbonic anhydrase IX Inhibitors by a

new series of nitroimidazole-sulfonamides/sulfamides/sulfamates. *J. Med. Chem.* 2013, 56, 8512–8520. DOI: [10.1021/jm4009532](https://doi.org/10.1021/jm4009532).

195. Zhu, R.; Seow, H. A.; Baumann, R. P.; Ishiguro, K.; Penketh, P. G.; Shyam, K.; Sartorelli, A. C. Design of a hypoxia-activated prodrug inhibitor of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22, 6242–6247. doi: [10.1016/j.bmcl.2012.08.008](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.008).

196. Ginsberg, A. M.; Laurenzi, M. W.; Rouse, D. J.; Whitney, K. D.; Spigelman, M. K. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PA-824 in healthy subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53, 3720–3725. DOI: [10.1128/AAC.00106-09](https://doi.org/10.1128/AAC.00106-09).

197. Manjunatha, U.; Boshoff, H. I.; Barry, C. E. The mechanism of action of PA-824. *Commun. Integr. Biol.* 2009, 2, 215–218. DOI: [10.4161/cib.2.3.7926](https://doi.org/10.4161/cib.2.3.7926).

198. Kim, P.; Zhang, L.; Manjunatha, U. H.; Singh, R.; Patel, S.; Jiricek, J.; Keller, T. H.; Boshoff, H. I.; Barry, C. E.; Dowd, C. S. Structure-activity relationships of antitubercular nitroimidazoles. 1. Structural features associated with aerobic and anaerobic activities of 4- and 5-nitroimidazoles. *J. Med. Chem.* 2009, 52, 1317–1328. DOI: [10.1021/jm801246z](https://doi.org/10.1021/jm801246z).

199. Kim, P.; Kang, S.; Boshoff, H. I.; Jiricek, J.; Collins, M.; Singh, R.; Manjunatha, U. H.; Niyomrattanakit, P.; Zhang, L.; Goodwin, M.; Dick, T.; Keller, T. H.; Dowd, C. S.; Barry, C. E. Structure-activity relationships of antitubercular nitroimidazoles. 2. Determinants of aerobic activity and quantitative structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* 2009, 52, 1329–1344. DOI: [10.1021/jm801374t](https://doi.org/10.1021/jm801374t).

200. Papadopoulou, M. V.; Bloomer, W. D.; Rosenzweig, H. S. The antitubercular activity of various nitro(triazole/imidazole)-based compounds. *Bioorg. Med. Chem.* 2017, 25, 6039–6048. DOI: [10.1016/j.bmc.2017.09.037](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.037).

201. Carter, E. R.; Nabarro, L. E.; Hedley, L.; Chiodini, P. L. Nitroimidazole-refractory giardiasis: a growing problem requiring rational solutions. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018, 24, 37–42. DOI: [10.1016/j.cmi.2017.05.028](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.05.028).

202. Davies, C.; Dey, N.; Negrette, O. S.; Parada, L. A.; Basombrio, M. A.; Garg, N. J. Hepatotoxicity in mice of a novel anti-parasite drug candidate hydroxymethyl nitro furazone: a comparison with Benznidazole. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 2014, 8, e3231. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003231>.

203. Metrinidazole: An Overview. <https://www.uptodate.com/contents/metronidazole-an-overview/> (accessed Sep 2020).

204. Papadopoulou, M. V.; Bloomer, W. D.; Rosenzweig, H. S.; Wilkinson, S. R.; Kaiser, M. Novel nitro(triazole/imidazole)-based heteroarylamides/sulfonamides as potential antitrypanosomal agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 87, 79–88. DOI: [10.1021/jm300508n](https://doi.org/10.1021/jm300508n).

205. Papadopoulou, M. V.; Bloomer, W. D.; Rosenzweig, H. S.; Kaiser, M.; Chatelain, E.; Ioset, J. R. Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazolebased piperazines and 2-amino-1, 3-benzothiazoles as antichagasic agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2013, 21, 6600–6607. doi: [10.1016/j.bmc.2013.08.022](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.08.022).

206. Papadopoulou, M. V.; Bloomer, W. D.; Rosenzweig, H. S.; O'Shea, I. P.; Wilkinson, S. R.; Kaiser, M.; Chatelain, E.; Ioset, J. R. Discovery of potent nitrotriazole-based antitrypanosomal agents: In vitro and in vivo evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 6467–6476. DOI: [10.1016/j.bmc.2015.08.014](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.08.014).

207. Thompson, Andrew M; O'Connor, Patrick D; Blaser, Adrian; Yardley, Vanessa; Maes, Louis; Gupta, Suman; Launay, Delphine; Martin, Denis; Franzblau, Scott G; Wan, Baojie; +3 more... (2016) Repositioning Antitubercular 6-Nitro-2,3-dihydroimidazo[2,1-b][1,3]oxazoles for Neglected Tropical Diseases: Structure-Activity Studies on a Preclinical Candidate for Visceral Leishmaniasis. *Journal of medicinal chemistry*, 59 (6). pp. 2530-2550. ISSN 0022-2623 DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01699>.

208. Thompson, A. M.; O'Connor, P. D.; Marshall, A. J.; Yardley, A.; Maes, O.; Gupta, U.; Launay, D.; Braillard, S.; Chatelain, E.; Franzblau, S. G.; Wan, B.; Wang, Y.; Ma, Z.; Cooper, C. B.; Denny, W. A. 7-Substituted 2-nitro-5,6-dihydroimidazo[2,1-b][1,3]oxazines: Novel antitubercular agents lead to a new preclinical candidate for visceral leishmaniasis. *J. Med. Chem.* 2017, 60, 4212–4233. DOI: [10.1021/acs.jmedchem.7b00034](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00034).

209. Vandana Purohit and Ashis K. Basu. Mutagenicity of Nitroaromatic Compounds. *Chem. Res. Toxicol.* 2000, 13, 8, 673–692. <https://doi.org/10.1021/tx000002x>.

210. Toshinari Maeda, Ryosuke Nakamura, Kiwao Kadokami, Hiroaki I. Ogawa. Relationship between mutagenicity and reactivity or biodegradability for nitroaromatic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 26, No. 2, pp. 237–241, 2007. <https://doi.org/10.1897/06-019R1.1>.

211. Mitsuharu Masuda, Howard F. Mower, Brigitte Pignatelli, Irena Celan, Marlin D. Friesen, Hoyoku Nishino, and Hiroshi Ohshima. Formation of N-Nitrosamines and N-Nitramines by the Reaction of Secondary Amines with Peroxynitrite and Other Reactive Nitrogen Species: Comparison with Nitrotyrosine Formation. *Chem. Res. Toxicol.* 2000, 13, 301-308. <https://doi.org/10.1021/tx990120o>.
212. Macherey, A. C.; Dansette, P. M. *Biotransformations Leading to Toxic Metabolites: Chemical Aspect. The Practice of Medicinal Chemistry*; Academic Press: New York, 2015; pp 675–696, DOI: 10.1016/B978-0-12-417205-0.00025-0.
213. Streeter, A.J. and Hoener, B-A. (1988) Evidence for the involvement of a nitrenium ion in the covalent binding of nitrofurazone to DNA. *Pharm. Res.* 5, 434–436. DOI: 10.1023/a:1015988401601.
214. Viodé, C.; Bettache, N.; Cenas, N.; Krauth-Siegel, R. L.; Chauvière, G.; Bakalara, N.; Périé, J.; *Enzymatic Reduction Studies of Nitroheterocycles Biochem. Pharmac.* 1998, 57, 549. DOI: [10.1016/s0006-2952\(98\)00324-4](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00324-4).
215. Tocher, J. H.; *Reductive Activation of Nitroheterocyclic Compounds. Gen. Pharmac.* 1997, 28, 485. DOI: 10.1016/s0306-3623(96)00283-2.
216. Maya, J. D.; Cassels, B. K.; Iturriaga-Vásquez, P.; Ferreira, J.; Faúndez, M.; Galanti, N.; Ferreira, A.; Morello, A., Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp. Biochem. Phys. Part A* 2007, 146, 601. DOI: [10.1016/j.cbpa.2006.03.004](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.004).
217. Park SW, Hwang EH, Park H, Kim JA, Heo J, Lee KH, et al. Growth of mycobacteria on carbon monoxide and methanol. *Journal of Bacteriology.* 2003 Jan;185(1):142-7. DOI: [10.1128/jb.185.1.142-147.2003](https://doi.org/10.1128/jb.185.1.142-147.2003).
218. John M. Grange, Malcolm D. Yates and Isabel N. de Kantor. *Guidelines for speciation within the Mycobacterium tuberculosis complex: World Health Organization*; 1996.
219. Samuel Chackalamannil, David Rotella, Simon Ward. *Comprehensive Medicinal Chemistry III.* 2017 Elsevier Ltd. ISBN 978-0-12-803200-8.
220. Roldán, M. D.; Pérez-Reinaldo, E.; Castillo, F.; Moreno-Vivián, C.; Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32, 474. DOI: [10.1111/j.1574-6976.2008.00107.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00107.x).
221. Hanaki, E.; Hayashi, M.; Matsumoto, M. Delamanid is not metabolized by salmonella or human nitroreductases: a possible mechanism for the lack of mutagenicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2017, 84, 1–8. DOI: [10.1016/j.yrtph.2016.12.002](https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.12.002).
222. Stover, C. K.; Warren, P.; VanDevanter, D. R.; Sherman, D. R.; Arain, T. M.; Langhorne, M. H.; Anderson, S. W.; Towell, J. A.; Yuan, Y.; McMurray, D. N.; Kreiswirth, B. N.; Barry, C. E.; Baker, W. R. A small molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature* 2000, 405, 962–966. DOI: [10.1038/35016103](https://doi.org/10.1038/35016103).
223. Landge, S.; Ramachandran, V.; Kumar, A.; Neres, J.; Murugan, K.; Sadler, C.; Fellows, M. D.; Humnabadkar, V.; Vachaspati, P.; Raichurkar, A.; Sharma, S.; Ravishankar, S.; Guptha, S.; Sambandamurthy, V. K.; Balganes, T. S.; Ugarkar, B. G.; Balasubramanian, V.; Bandodkar, B. S.; Panda, M. Nitroarenes as antitubercular agents: stereoelectronic modulation to mitigate mutagenicity. *ChemMedChem* 2016, 11, 331–33. DOI: [10.1002/cmdc.201500462](https://doi.org/10.1002/cmdc.201500462).
224. Shamovsky, I.; Ripa, L.; Börjesson, L.; Mee, C.; Norden, B.; Hansen, P.; Hasselgren, C.; O'Donovan, M.; Sjö, P. Explanation for main features of structure-genotoxicity relationships of aromatic amines by theoretical studies of their activation pathways in CYP1A2. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 16168–16185. DOI: [10.1021/ja206427u](https://doi.org/10.1021/ja206427u).
225. Shamovsky, I.; Ripa, L.; Blomberg, N.; Eriksson, L. A.; Hansen, P.; Mee, C.; Tyrchan, C.; O'Donovan, M.; Sjö, P. Theoretical studies of chemical reactivity of metabolically activated forms of aromatic amines toward DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 2012, 25 (10), 2236–2252. DOI: [10.1021/tx300313b](https://doi.org/10.1021/tx300313b).
226. Ripa, L.; Mee, C.; Sjö, P.; Shamovsky, I. Theoretical studies of the mechanism of N-hydroxylation of primary aromatic amines by cytochrome P450 1A2: radicaloid or anionic? *Chem. Res. Toxicol.* 2014, 27 (2), 265–278. DOI: [10.1021/tx400376u](https://doi.org/10.1021/tx400376u).
227. Benigni, R. Structure-activity relationship studies of chemical mutagens and carcinogens: mechanistic investigations and prediction approaches. *Chem. Rev.* 2005, 105, 1767–1800. <https://doi.org/10.1021/cr030049y>.

228. Seger, S. T.; Rydberg, P.; Olsen, L. Mechanism of the Nhydroxylation of primary and secondary amines by cytochrome P450. *Chem. Res. Toxicol.* 2015, 28, 597–603. DOI: [10.1021/tx500371a](https://doi.org/10.1021/tx500371a).
229. Boechat, N.; Carvalho, A. S.; Salomao, K.; Castro, S. L.; Araujo-Lima, C. F.; Mello, F. V.; Felzenszwalb, I.; Aiub, C. A.; Conde, T. R.; Zamith, H. P.; Skupin, R.; Haufe, G. Studies of genotoxicity and mutagenicity of nitroimidazoles: demystifying this critical relationship with the nitro group. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2015, 110 (4), 492–499. DOI: [10.1590/0074-02760140248](https://doi.org/10.1590/0074-02760140248).
230. Willem J. H. van Berkel. *Flavoenzymes, Chemistry*. 2008 by John Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/9780470048672.web168. Adaptado de Tadhg P. Begley. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* (Online Edition 2008).
231. Toshiro Kobori, Woo CheolLee, Takako Akagi, Hiroshi Sasaki, Shuhei Zenno, Kaoru Saigo and Masaru Tanokura. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of major nitroreductase from *Escherichia coli*. *Acta Cryst.* (1999). D55, 1901–1902. DOI: [10.1107/s0907444999008422](https://doi.org/10.1107/s0907444999008422).
232. Paul R. Race, Andrew L. Lovering, Richard M. Green, Abdelmijid Oссор, Scott A. White, Peter F. Searle, Christopher J. Wrighton and Eva I. Hyde. Structural and Mechanistic Studies of *Escherichia coli* Nitroreductase with the Antibiotic Nitrofurazone Reversed Binding Orientations In Different Redox States Of The Enzyme. *J Biol Chem* . 2005 Apr 8;280(14):13256-64. DOI: [10.1074/jbc.M409652200](https://doi.org/10.1074/jbc.M409652200).
233. Shuhei Zenno, Hideaki Koike, Ajit N. Kumar, Ramamirth Jayaraman, Masaru Tanokura, And Kaoru SAIGO. Biochemical Characterization of NfsA, the *Escherichia coli* Major Nitroreductase Exhibiting a High Amino Acid Sequence Homology to Frp, a *Vibrio harveyi* Flavin Oxidoreductase. *Journal Of Bacteriology*, Aug. 1996, p. 4508–4514. doi: 10.1128/jb.178.15.4508-4514.1996.
234. Shuhei Zenno, Toshiro Kobori, Masaru Tanokura & Kaoru Saigo. Purification and Characterization of NfrA1, a *Bacillus subtilis* Nitro/flavin Reductase Capable of Interacting with the Bacterial Luciferase. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998 Oct;62(10):1978-87. DOI: [10.1271/bbb.62.1978](https://doi.org/10.1271/bbb.62.1978).
235. Shino Homma-Takeda, Yusuke Hiraku, Yasuhiro Ohkuma, Shinji Oikawa, Mariko Murata, Kazuhiko Ogawa, Taeko Iwamuro, Song Li, Gui Fan Sun, Yoshito Kumagai, Nobuhiro Shimojo & Shosuke Kawanishi. 2,4,6-Trinitrotoluene-induced Reproductive Toxicity via Oxidative DNA Damage by its Metabolite. *Free Radical Research*, 2002 Vol. 36 (5), pp. 555–566. DOI: [10.1080/10715760290025933](https://doi.org/10.1080/10715760290025933).
236. Sarlauskas J, Nemeikaite-Ceniene A, Anusevicius Z, Miseviciene L, Julvez MM, Medina M, Gomez-Moreno C, Narimantas Cenas Search articles by 'Narimantas Cenas' Cenas N. Flavoenzyme-catalyzed redox cycling of hydroxylamino- and amino metabolites of 2,4,6-trinitrotoluene: implications for their cytotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 01 May 2004, 425(2):184-192. DOI: [10.1016/j.abb.2004.02.043](https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.02.043).
237. Antonio Caballero, Juan J Lázaro, Juan L Ramos, Abraham Esteve-Núñez. PnrA, a new nitroreductase-family enzyme in the TNT-degrading strain *Pseudomonas putida* JLR11. *Environ Microbiol* . 2005 Aug;7(8):1211-9. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2005.00801.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00801.x).
238. Zora Djurić, E.Kim Fifer, Paul C. Howard, Frederick A. Beland. Oxidative microsomal metabolism of 1-nitropyrene and DNA-binding of oxidized metabolites following nitroreduction. *Carcinogenesis*, Volume 7, Issue 7, July 1986, Pages 1073–1079. <https://doi.org/10.1093/carcin/7.7.1073>.
239. Seth R. Thomas, Patrick M. McTamney, Jennifer M. Adler, Nicole LaRonde-LeBlanc, and Steven E. Rokita. Crystal Structure of Iodotyrosine Deiodinase, a Novel Flavoprotein Responsible for Iodide Salvage in Thyroid Glands. *J Biol Chem.* 2009 Jul 17; 284(29): 19659–19667. doi: [10.1074/jbc.M109.013458](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.013458).
240. Hae-Won Chung, Shiao-Chun Tu. Structure-function relationship of *Vibrio harveyi* NADPH-flavin oxidoreductase FRP: essential residues Lys167 and Arg15 for NADPH binding. *Biochemistry.* 2012 Jun 19;51(24):4880-7. DOI: [10.1021/bi3002314](https://doi.org/10.1021/bi3002314).
241. Giulia Manina, Marco Bellinzoni, and el Biological and structural characterization of the *Mycobacterium smegmatis* nitroreductase NfnB, and its role in benzothiazinone resistance. *Molecular Microbiology* (2010) 77(5), 1172–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07277.x>.
242. T Kobori, H Sasaki, W C Lee, S Zenno, K Saigo, M E Murphy, M Tanokura. Structure and site-directed mutagenesis of a flavoprotein from *Escherichia coli* that reduces nitrocompounds: alteration of pyridine nucleotide binding by a single amino acid substitution. *J Biol Chem* . 2001 Jan 26;276(4):2816-23. DOI: [10.1074/jbc.M002617200](https://doi.org/10.1074/jbc.M002617200).

243. Chad A Haynes, Ronald L Koder, Anne-Frances Miller, David W Rodgers. Structures of nitroreductase in three states: effects of inhibitor binding and reduction. *J Biol Chem.* 2002 Mar 29;277(13):11513-20. DOI: [10.1074/jbc.M111334200](https://doi.org/10.1074/jbc.M111334200).
244. G N Parkinson, J V Skelly, S Neidle. Crystal structure of FMN-dependent nitroreductase from *Escherichia coli* B: a prodrug-activating enzyme. *J Med Chem.* 2000 Oct 5;43(20):3624-31. DOI: [10.1021/jm000159m](https://doi.org/10.1021/jm000159m).
245. A L Lovering, E I Hyde, P F Searle, S A White. The structure of *Escherichia coli* nitroreductase complexed with nicotinic acid: three crystal forms at 1.7 Å, 1.8 Å and 2.4 Å resolution. *J Mol Biol.* 2001 May 25;309(1):203-13. DOI: [10.1006/jmbi.2001.4653](https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4653).
246. Michiko E. Taga, Nicholas A. Larsen, Annaleise R. Howard-Jones, Christopher T. Walsh & Graham C. Walker. BluB cannibalizes flavin to form the lower ligand of vitamin B12. *Nature* volume 446, pages449–453(2007). doi: [10.1038/nature05611](https://doi.org/10.1038/nature05611).
247. Singh, R. et al. (2008) PA-824 kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by intracellular NO release. *Science* 322, 1392–1395. DOI: [10.1126/science.1164571](https://doi.org/10.1126/science.1164571).
248. Matsumoto, M. et al. (2006) OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Med.* 3, e466. DOI: [10.1371/journal.pmed.0030466](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030466).
249. Otsuka and Mylan Announce License Agreement to Commercialize Delamanid (Deltyba) for Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB) in High-Burden Countries, August 24, 2017. <https://www.venclerx.com/> (accessed Dec 27, 2017).
250. Stover, C. K.; Warren, P.; VanDevanter, D. R.; Sherman, D. R.; Arain, T. M.; Langhorne, M. H.; Anderson, S. W.; Towell, J. A.; Yuan, Y.; McMurray, D. N.; Kreiswirth, B. N.; Barry, C. E.; Baker, W. R. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature* 2000, 405, 962–966. DOI: [10.1038/35016103](https://doi.org/10.1038/35016103).
251. Gurumurthy, M. et al. (2012) Substrate specificity of the deazaflavin-dependent nitroreductase from *Mycobacterium tuberculosis* responsible for the bioreductive activation of bicyclic nitroimidazoles. *FEBS J.* 279, 113–125. DOI: [10.1111/j.1742-4658.2011.08404.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08404.x).
252. Xavier, A.S. and Lakshmanan, M. (2014) Delamanid: a new armor in combating drug-resistant tuberculosis. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 5, 222–224. DOI: [10.4103/0976-500X.136121](https://doi.org/10.4103/0976-500X.136121).
253. Papadopoulou, M. V.; Bloomer, W. D.; Rosenzweig, H. S.; Arena, A.; Arrieta, F.; Rebolledo, J. C. J.; Smith, D. K. Nitrotriazole and imidazole-based amides and sulfonamides as antitubercular agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014, 58, 6828–6836. doi: [10.1128/AAC.03644-14](https://doi.org/10.1128/AAC.03644-14).
254. Rane, R. A.; Bangalore, P.; Borhade, S. D.; Khandare, P. K. Synthesis and evaluation of novel 4-nitropyrrole-based 1,3,4-oxadiazole derivatives as antimicrobial and anti-tubercular agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 70, 49–58. DOI: [10.1016/j.ejmech.2013.09.039](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.039).
255. Rane, R. A.; Naphade, S. S.; Bangalore, P. K.; Palkar, M. B.; Shaikh, M. S.; Karpoornath, R. Synthesis of novel 4-nitropyrrole-based semicarbazide and thiosemicarbazide hybrids with antimicrobial and anti-tubercular. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, 24, 3079–3083. DOI: [10.1016/j.bmcl.2014.05.018](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.018).
256. Kamal, A.; Hussaini, S. M. A.; Faazil, S.; Poornachandra, Y.; Reddy, G. N.; Kumar, C. G.; Rajput, V. S.; Rani, C.; Sharma, R.; Khan, I. A.; Babu, N. J. Anti-tubercular agents. Part 8: Synthesis, antibacterial and antitubercular activity of 5-nitrofuran based 1,2,3-triazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013, 23, 6842–6846. DOI: [10.1016/j.bmcl.2013.10.010](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.10.010).
257. Tangallapally, R. P.; Yendapally, R.; Lee, R. E.; Hevener, K.; Jones, V. C.; Lenaerts, A. J. M.; McNeil, M. R.; Wang, Y.; Franzblau, S.; Lee, R. E. Synthesis and evaluation of nitrofuranyl amides as novel antituberculosis agents. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 5276–5283. <https://doi.org/10.1021/jm049972y>.
258. Galina Karabanovich, Júlia Zemanová, Tomáš Smutný, Rita Székely, Michal Šarkan, Ivana Centárová, Anthony Vocat, Ivona Pávková, Patrik Čonka, Jan Němeček, Jiřina Stolaříková, Marcela Vejšová, Kateřina Vávrová, Věra Klimešová, Alexandr Hrabálek, Petr Pávek, Stewart T. Cole, Katarína Mikušová and Jaroslav Roh. Development of 3,5-dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazoles and thiadiazoles as selective antitubercular agents active against replicating and nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* 2016, 59, 2362–2380. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00608>.
259. V. Makarov, et al. Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis *Science*, 324 (2009), pp. 801-804. DOI: [10.1126/science.1171583](https://doi.org/10.1126/science.1171583).

260. J. Neres, et al. Structural basis for benzothiazinone-mediated killing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci. Transl. Med.*, 4 (2012), p. 150ra121. [doi: 10.1126/scitranslmed.3004395](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004395).
261. Trefzer, C.; Rengifo-Gonzalez, M.; Hinner, M. J.; Schneider, P.; Makarov, V.; Cole, S. T.; Johnsson, K. Benzothiazinones: prodrugs that covalently modify the decaprenylphosphoryl- $\beta$ -D-ribose 2'-epimerase DprE1 of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 13663–13665. [DOI: 10.1021/ja106357w](https://doi.org/10.1021/ja106357w).
262. Karoli, T.; Becker, B.; Zuegg, J.; Möllmann, U.; Ramu, S.; Huang, J. X.; Cooper, M. A. Identification of antitubercular benzothiazinone compounds by ligand-based design. *J. Med. Chem.* 2012, 55, 7940–7944. <https://doi.org/10.1021/jm3008882>.
263. Tiwari, R.; Möllmann, U.; Cho, S.; Franzblau, S. G.; Miller, P. A.; Miller, M. J. Design and syntheses of anti-tuberculosis agents inspired by BTZ043 using a scaffold simplification strategy. *ACS Med. Chem. Lett.* 2014, 5, 587–591. <https://doi.org/10.1021/ml500039g>.
264. Tiwari, R.; Moraski, G. C.; Krchňak, V.; Miller, P. A.; Colon-Martinez, M.; Herrero, E.; Oliver, A. G.; Miller, M. J. Thiolates chemically induce redox activation of BTZ043 and related potent nitroaromatic anti-tuberculosis agents. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 3539–3549. [doi: 10.1021/ja311058q](https://doi.org/10.1021/ja311058q).
265. Albesa-Jove', D. et al. (2014) Rv2466c mediates the activation of TP053 to kill replicating and non-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem. Biol.* 9, 1567–1575. <https://doi.org/10.1021/cb500149m>.
266. Albesa-Jove', D. et al. (2015) The redox state regulates the conformation of Rv2466c to activate the antitubercular prodrug TP053. *J. Biol. Chem.* 290, 31077–31089. [doi: 10.1074/jbc.M115.677039](https://doi.org/10.1074/jbc.M115.677039).
267. Rafik Karaman. Prodrugs Design Based on Inter- and Intramolecular Chemical Processes. *Chem Biol Drug Des* 2013; 82: 643–668. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12224>.
268. Monica Sharma, Nitya Nand Sharma & Tek Chand Bhalla. Amidases: versatile enzymes in nature. *Rev Environ Sci Biotechnol* (2009) 8:343–366. [DOI 10.1007/s11157-009-9175-x](https://doi.org/10.1007/s11157-009-9175-x).
269. Brandon W. Weber, Serah W. Kimani, Arvind Varsani, Donald A. Cowan, Roger Hunter, Gerhard A. Venter, James C. Gumbart and B. Trevor Sewell. The Mechanism of the Amidases. *J Biol Chem.* 2013 Oct 4; 288(40): 28514–28523. [doi: 10.1074/jbc.M113.503284](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.503284).
270. D. Fourmand, A. Arnaud. Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity. *J Appl Microbiol.* 2001 Sep;91(3):381-93. [DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01378.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01378.x).
271. Chebrou H, Bigey F, Arnaud A, Galzy P (1996) Study of the amidase signature group. *Biochim Biophys Acta* 1298:285–293. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(96\)00145-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(96)00145-8).
272. Helen C Pace & Charles Brenner. The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biology* 2001, 2(1):reviews0001.1–0001.9. Disponivel em: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2001-2-1-reviews0001>.
273. S. I. Pertsovich, D. T. Guranda, D. A. Podchernyaev, A. S. Yanenko & V. K. Svedas. Aliphatic Amidase from *Rhodococcus rhodochrous* M8 Is Related to the Nitrilase/Cyanide Hydratase Family. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 70, No. 11, 2005, pp. 12801287. DOI: 10.1007/s10541-005-0260-7.
274. Valina AL, Mazumder-Shivakumar D, Bruice TC. Probing the Ser-Ser-Lys catalytic triad mechanism of peptide amidase: computational studies of the ground state, transition state, and intermediate. *Biochemistry* 43, 15657-72, (2004). <https://doi.org/10.1021/bi049025r>.
275. Piotrowski M, Schönfelder S, Weiler EW (2001) The *Arabidopsis thaliana* isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode beta-cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. *J Biol Chem* 276:2616–2621. [DOI: 10.1074/jbc.M007890200](https://doi.org/10.1074/jbc.M007890200).
276. Banerjee A, Sharma R, Banerjee UC (2002) The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:33–44. DOI: 10.1007/s00253-002-1062-0.
277. Kobayashi M, Fujiwara Y, Goda M, Komeda H, Shimizu S (1997) Identification of active sites in amidase: evolutionary relationship between amide-bond and peptide bond-cleaving enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11986–11991. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.22.11986>.
278. Kalgutkar A.S., Marnett A.B., Crews B.C., Remmel R.P., Marnett L.J. (2000) Ester and amide derivatives of the nonsteroidal antiinflammatory drug, indomethacin, as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Med Chem*;43:2860–2870. [DOI: 10.1021/jm000004e](https://doi.org/10.1021/jm000004e).
279. Н. П. Мешкова, А. Я. Николаев. Большой советской энциклопедия. Disponivel em: <https://rus-bse.slovaronline.com/2748->

[%D0%90%D0%BC%D0%B8%D0%B4%D0%B8%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B5.](#)

280. A A Stortchevoi. Misacylation of tRNA in prokaryotes: a re-evaluation. *Cell Mol Life Sc* . 2006 Apr;63(7-8):820-31. doi: 10.1007/s00018-005-5171-7.

281. António Eduardo Carrasco Serrano. Plasma humano: componentes e derivados conservação e utilização terapêutica em ambiente hospitalar. Para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Instituto Superior De Ciências Da Saúde Egas Moniz. março de 2016.

282. M M Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

283. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent" ( ). *Journal of Biological Chemistry*. 193 (1): 265–75. doi:10.1016/S0021-9258(19)52451-6.

284. BCG vaccines. — In: [BCG vaccines: WHO position paper – February 2018](#) : [aHFL] : // Weekly epidemiological record. — Geneva : World Health Organization, 2018. — № 8 (23 February). — C. 83.

285. Côtes, K. et al. Lipolytic enzymes in Mycobacterium tuberculosis. *Applied Microbiology and Biotechnology* volume 78, pages 741–749 (2008). Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-008-1397-2>.

286. Zhang, M. et al. Measuring cytotoxicity: A new perspective on LC50. *Anticancer Research* 27, 35–38 (2007).

287. Rupesh V Chikhale, Mahesh A Barmade, Prashant R Murumkar, Mange Ram Yadav. Overview of the Development of DprE1 Inhibitors for Combating the Menace of Tuberculosis. *J Med Chem*. 2018 Oct 11;61(19):8563-8593. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00281. Epub 2018 Jun 12. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00281.

288. Caroline Shi-Yan Foo, Benoit Lechartier, Gaëlle S. Kolly, Stefanie Boy-Röttger, João Neres, Jan Rybniker, Andréanne Lupien, a Claudia Sala, a Jérémie Piton, a and Stewart T. Colecorresponding author. Characterization of DprE1-Mediated Benzothiazinone Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Nov; 60(11): 6451–6459. doi: 10.1128/AAC.01523-16.

289. Giulia Manina, Marco Bellinzoni, Maria Rosalia Pasca, João Neres, Anna Milano, Ana Luisa De Jesus Lopes Ribeiro, Silvia Buroni, Henrieta Skovierová, Petronela Dianišková. *Biological and structural characterization of the Mycobacterium smegmatis nitroreductase NfnB, and its role in benzothiazinone resistance*. *Mol Microbiol* . 2010 Sep;77(5):1172-85. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07277.x. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07277.x

290. IUPAC, *Compêndio de Terminologia Química, 2ª ed. ("Gold Book")*. Compilado por A. D. McNaught e A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Versão online: "inductive effect" (2006–) criado por M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; atualizações compiladas por A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8.

291. Santos, P. P. *Química Orgânica - Volume 2 (First Edition)* (IST Press, 2013).

292. "[Leaving group](#)" (PDF). *Gold Book: leaving group*. IUPAC. 2009. doi:10.1351/goldbook.L03493. ISBN 978-0-9678550-9-7.

293. Silverman, R. B. & Holladay, M. W. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action (Third Edition)*, (Academic Press 2015).

294. WHALEN, K.; FINKEL, R.; PANAVELIL, T. A. *Farmacologia ilustrada*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

295. Mary C Hunt, Stefan E H Alexson. The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism. *Prog Lipid Res* . 2002 Mar;41(2):99-130. doi: 10.1016/s0163-7827(01)00017-0.

296. Yamada, J. Long-chain acyl-CoA hydrolase in the brain. *Amino Acids* 28, 273–278 (2005). <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0181-1> .

297. P.B. Wedegaertner, P.T. Wilson, H.R. Bourne. Lipid modifications of trimeric G proteins. *J Biol Chem*. 1995 Jan 13;270(2):503-6. doi: 10.1074/jbc.270.2.503.

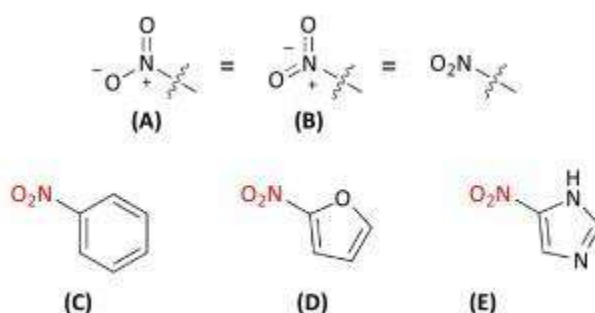
298. J B McCabe , L G Berthiaume. Functional roles for fatty acylated amino-terminal domains in subcellular localization. *Mol Biol Cell*. 1999 Nov;10(11):3771-86. doi: 10.1091/mbc.10.11.3771.

299. R Hertz , J Magenheim, I Berman, J Bar-Tana. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature*. 1998 Apr 2;392(6675):512-6. doi: 10.1038/33185.
300. Q Li 1, N Yamamoto, S Morisawa, A Inoue. Fatty acyl-CoA binding activity of the nuclear thyroid hormone receptor. *J Cell Biochem*. 1993 Apr;51(4):458-64. doi: 10.1002/jcb.2400510411.
301. Mary C Hunt 1, Junji Yamada, Lois J Maltais, Mathew W Wright, Ernesto J Podesta, Stefan E H Alexson. A revised nomenclature for mammalian acyl-CoA thioesterases/hydrolases. *J Lipid Res*. 2005 Sep;46(9):2029-32. doi: 10.1194/jlr.E500003-JLR200. Epub 2005 Jul 1.
302. Li, Bina; Sedlacek, Meghana; Manoharan, Indumathib; Boopathy, Rathnamb; Duysen, Ellen G; Masson, Patrickc. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochemical Pharmacology* Volume 70, Issue 11, 25 November 2005, Pages 1673-1684.
303. Fernandes, J. P. dos S., Pavan, F. R., Leite, C. Q. F. & Felli, V. M. A. Synthesis and evaluation of a pyrazinoic acid prodrug in *Mycobacterium tuberculosis*. *Saudi Pharmaceutical Journal* 22, 376–380 (2014)
304. Stanley T.H.; Ashburn M.A. *Anesthesiology and Pain Management*. Edizione: Softcover reprint of the original 1st ed. 1994. DOI: 10.1007/978-94-011-0816-4\_3
305. Mecit Orhan Uludag. Burcu Çalışkan. Duygu Aslı Alkan. Stable ester and amide conjugates of some NSAIDs as analgesic and antiinflammatory compounds with improved biological activity. January 2011 *Turkish Journal of Chemistry* 35(3):427-439. DOI:10.3906/kim-1010-732
306. D. A. Hartman. Determination of the stability of drugs in plasma. *Curr Protoc Pharmacol*. 2003 Feb;Chapter 7:Unit 7.6. doi: 10.1002/0471141755.ph0706s19.

## Anexos

### A1. O que é um composto nitroaromático?

Um grupo nitro é um grupo químico funcional que contém um átomo de nitrogénio ligado a dois átomos de oxigénio e um átomo de carbono que conecta o grupo ao resto da molécula. O átomo de nitrogénio num grupo nitro é carregado positivamente e os dois átomos de oxigénio compartilham uma carga negativa. Um grupo nitro pode ser desenhado de várias maneiras; comumente todo o grupo é abreviado como NO<sub>2</sub>. Alternativamente, o grupo nitro pode ser representado pelas estruturas (A) ou (B) na Figura 75.<sup>162</sup>



**Figura 75 Representações alternativas de grupos nitro e exemplos de nitroaromáticos.**<sup>162</sup>

Um composto nitroaromático é uma molécula em que um ou mais grupos nitro estão diretamente ligados a um sistema de anel aromático. Por exemplo, nitrobenzeno (C), 2-nitrofurano (D) e 5-nitroimidazol (E) na Figura 75.

Quimicamente, o grupo nitro possui uma combinação única de propriedades; é fortemente aceitador de elétrons, pequeno, polar e pode formar ligações de hidrogénio.<sup>163</sup> Além disso, o grupo nitro pode ser bioativado por redução enzimática para dar espécies reativas (Figura 75). Em muitos casos, essas espécies reativas são responsáveis pelos efeitos biológicos dos fármacos nitro,<sup>164</sup> caso em que o composto nitroaromático atua como pró-fármaco.<sup>162</sup>

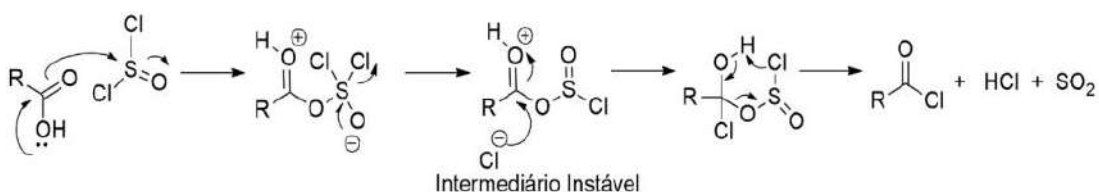
### A2. Mecanismos de síntese

#### a. Mecanismo da formação de um cloreto de ácido utilizando o reagente cloreto de tionilo.<sup>112</sup>

Neste método, o primeiro passo é fulcral e passa pela síntese do cloreto de ácido utilizando cloreto de tionilo (SOCl<sub>2</sub>) através de reações de adição-eliminação.

No átomo de enxofre de cloreto de tionilo ocorre a adição do ácido carboxílico e consequente eliminação do ião cloreto (Cl<sup>-</sup>), o que origina um clorossulfito de ácido

(intermediário instável). Por sua vez, o ião cloreto (nucleófilo) ataca o átomo de carbono do grupo carbonilo do clorossulfito de ácido e formam-se os produtos cloreto de ácido, dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) e ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ).



**Figura 76 Mecanismo da formação do cloreto de ácido.**<sup>112</sup>

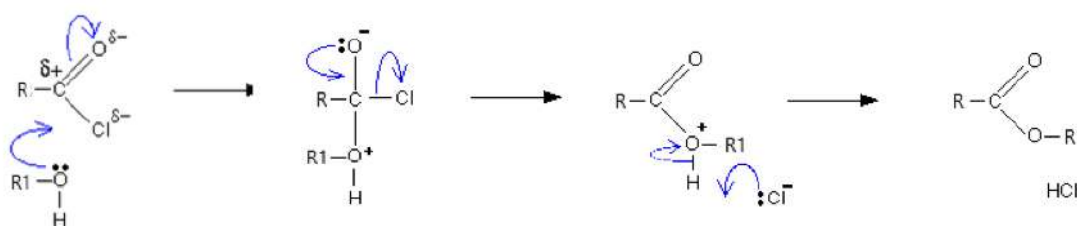
**b. Mecanismo da formação dum éster utilizando os reagentes cloreto de ácido e álcool.**<sup>112</sup>

O cloreto de acilo reage com o álcool. Há uma reação muito exotérmica onde um gás ácido e vaporoso é liberado (cloreto de hidrogénio). É formado um éster.

A primeira fase (a fase de adição da reação) envolve um ataque nucleofílico ao átomo de carbono razoavelmente positivo por um dos pares solitários no oxigénio de uma molécula de álcool.<sup>8</sup>

A segunda fase (a fase de eliminação) ocorre em duas etapas. No primeiro, a ligação dupla carbono-oxigénio se reforma e um ião cloreto é expulso.

Isso é seguido pela remoção de um ião hidrogénio pelo ião cloreto para um éster e cloreto de hidrogénio.



**Figura 77 Mecanismo da formação do éster pela reação cloreto de ácido com o álcool.**<sup>112</sup>

<sup>8</sup> Nota: Apenas um dos dois pares solitários no oxigénio do álcool é mostrado. Isso evita entupir um diagrama já complicado com coisas que não são relevantes.

**c. Mecanismo da formação duma amida utilizando os reagentes cloreto de ácido e amina.**

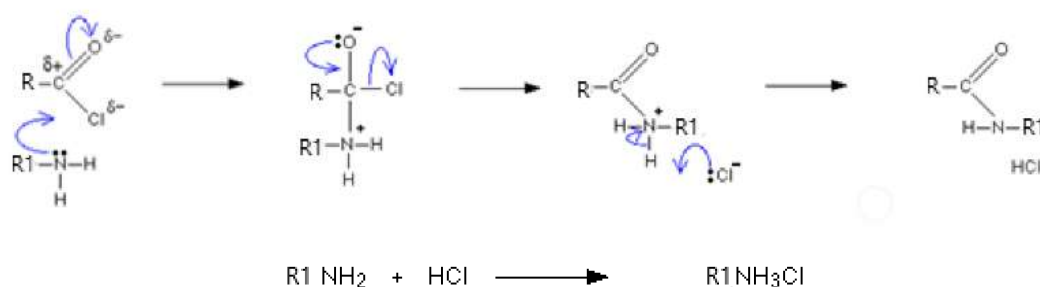
Essas reações seguem um padrão semelhante ao que vimos acima. A amina é usada em excesso para a desprotonação de intermediários carregados positivamente:

Observe que, ao contrário das reações entre o cloreto de ácido e o álcool, o cloreto de hidrogénio não é produzido - pelo menos, não em qualquer quantidade. Qualquer cloreto de hidrogénio formado reagiria imediatamente com o excesso de amina para dar cloreto de amónio.

A primeira fase (a fase de adição da reação) envolve um ataque nucleofílico ao átomo de carbono razoavelmente positivo pelo par solitário no átomo de nitrogénio da amina.

A segunda fase (a fase de eliminação) ocorre em duas etapas. No primeiro, a ligação dupla carbono-oxigénio se reforma e um ião cloreto é expulso.

Isso é seguido pela remoção do ião hidrogénio do nitrogénio. Ele é removido com ião cloreto para formar HCl (que irá reagir imediatamente com o excesso de amina para formar cloreto de amónio, conforme indicado abaixo).



**Figura 78 Mecanismo da formação duma amida utilizando os reagentes cloreto de ácido e amina.<sup>112</sup>**

**d. Mecanismo da formação dum éster utilizando ácido sulfúrico como catalisador (esterificação de Fisher).<sup>112</sup>**

Esta página examina em detalhes o mecanismo de formação de ésteres de ácidos carboxílicos e álcoois na presença de ácido sulfúrico concentrado atuando como catalisador.

Na primeira etapa, o ácido obtém um protão (um ião hidrogénio) do ácido sulfúrico concentrado. O protão se liga a um dos pares solitários do oxigénio, que está duplamente ligado ao carbono.

A transferência do protão para o oxigénio dá-lhe uma carga positiva.

A carga positiva é deslocalizada em toda a extremidade direita do ião, com uma boa quantidade de positividade no átomo de carbono.

Haverá algum grau de carga positiva em ambos os átomos de oxigénio e também no átomo de carbono. Cada uma das ligações entre o carbono e os dois oxigénios será a mesma - em algum lugar entre uma ligação simples e uma ligação dupla.

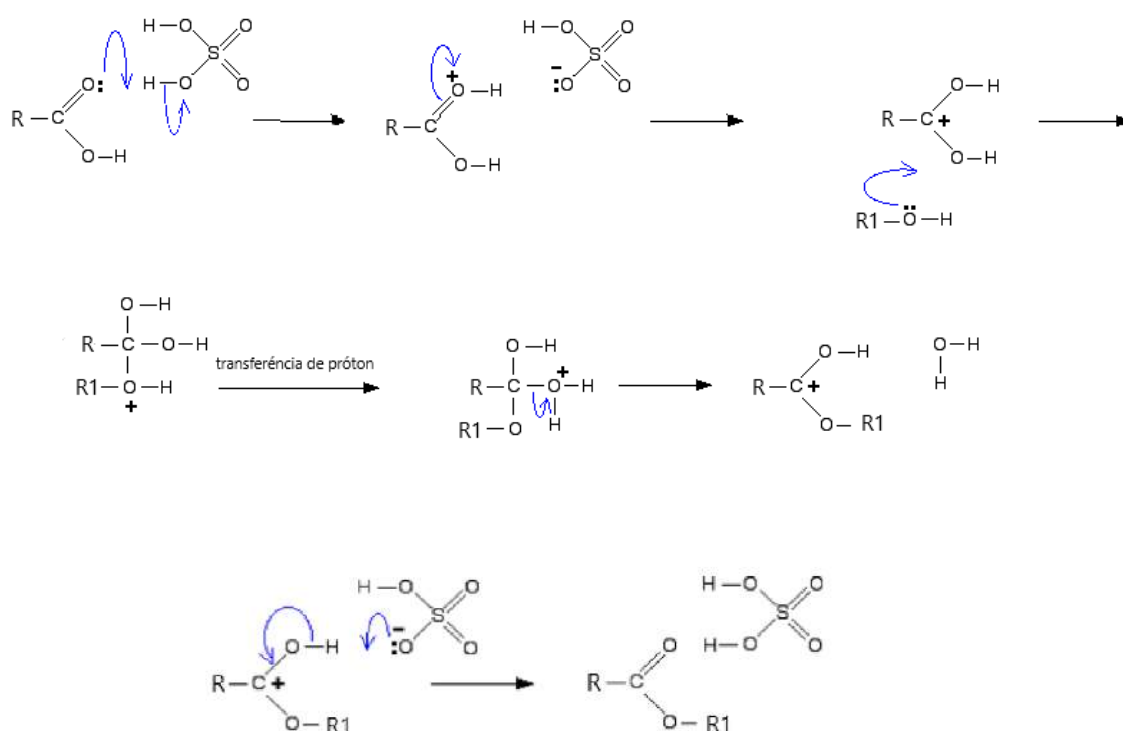
Para o propósito do resto desta discussão, vamos usar a estrutura em que a carga positiva está no átomo de carbono.

A carga positiva do átomo de carbono é atacada por um dos pares solitários do oxigénio da molécula do álcool.

O que acontece a seguir é que um protão (um ião de hidrogénio) é transferido do átomo de oxigénio inferior para um dos outros. Ele é capturado por uma das outras substâncias na mistura (por exemplo, ao ligar a um único par numa molécula de álcool que não reagiu) e, em seguida, transferido de volta em um dos oxigénios mais ou menos ao acaso.

Agora, uma molécula de água é perdida do ião.

O hidrogénio é removido do oxigénio pela reação com o ião hidrogenossulfato, que se formou na primeira etapa.



**Figura 79 Mecanismo da formação dum éster utilizando ácido sulfúrico como catalisador (esterificação de Fisher).<sup>112</sup>**

### A3. Espectros de RMN obtidos para os vários compostos sintetizados

#### 1. Benzoato de butilo (1a)

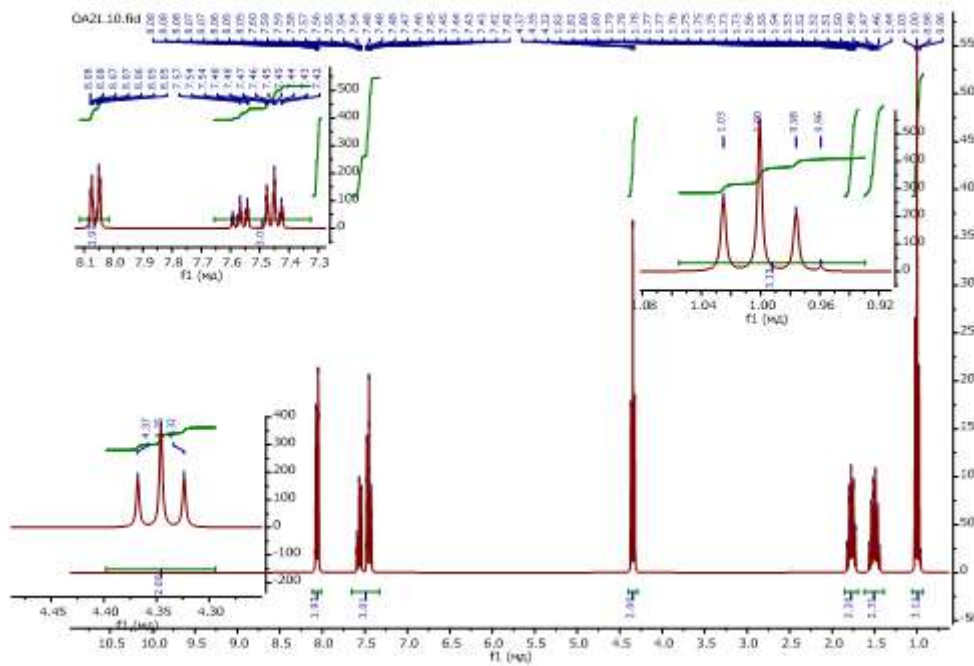
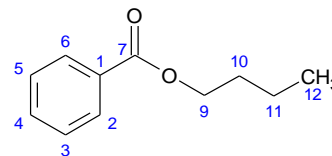


Figura 80 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 1a

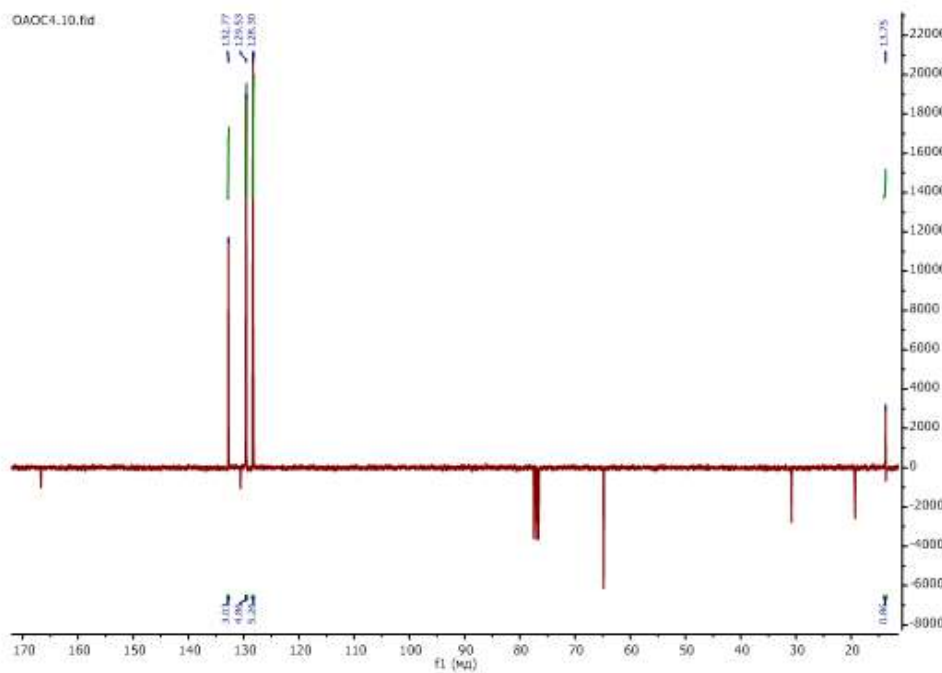


Figura 81 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 1a

## 2. Benzoato de hexilo (1b)

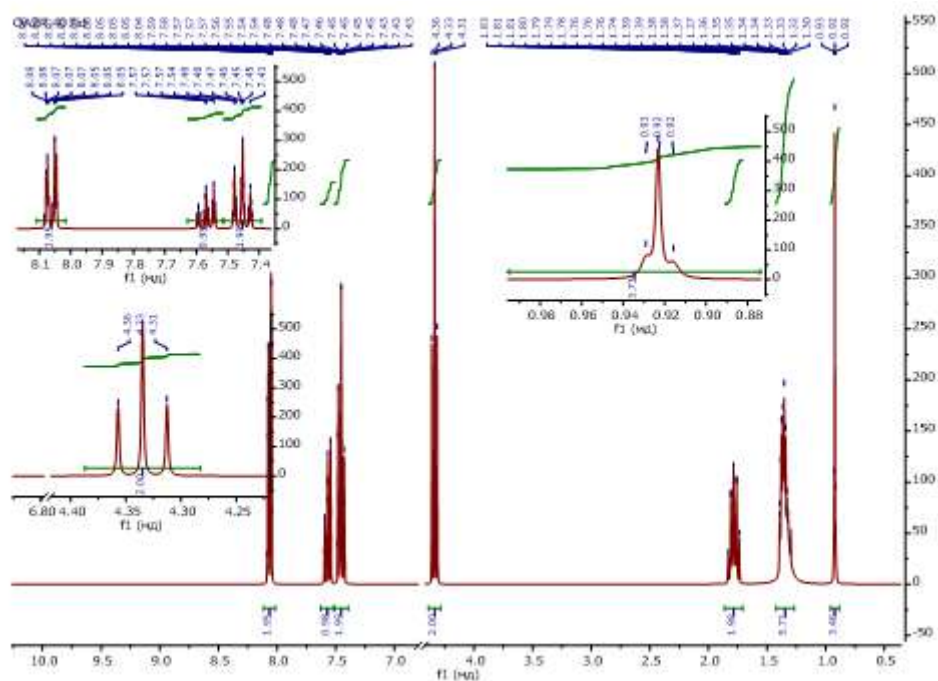
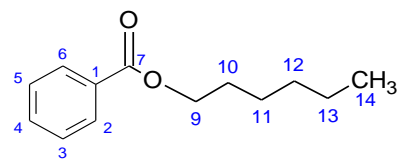


Figura 82 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 1b

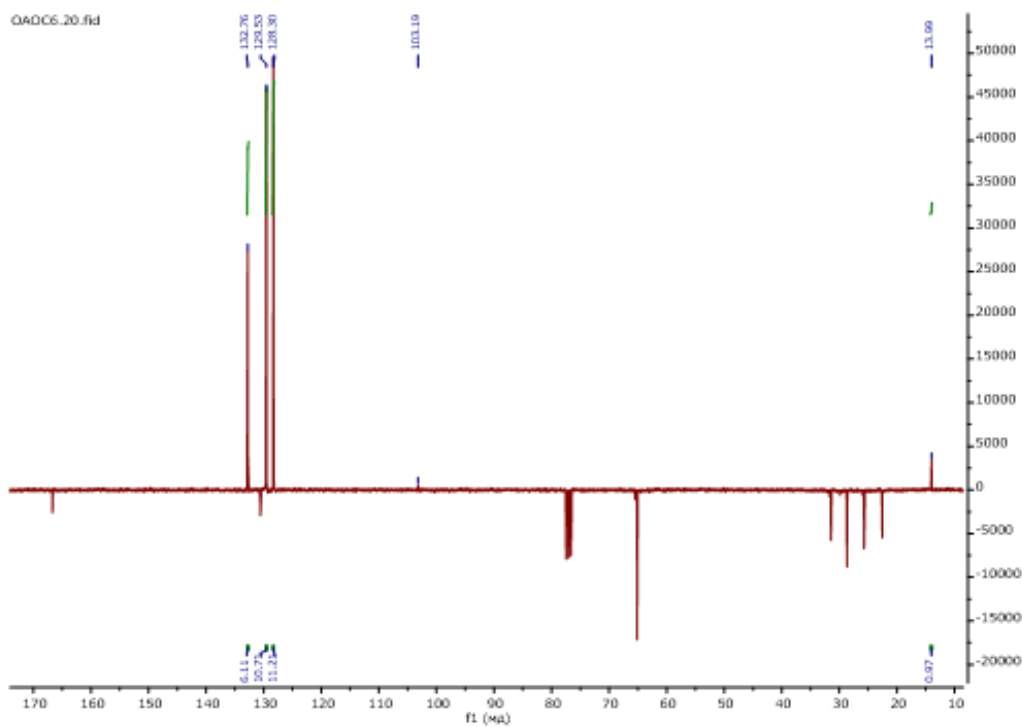


Figura 83 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 1b

### 3. Benzoato de octilo (1c)

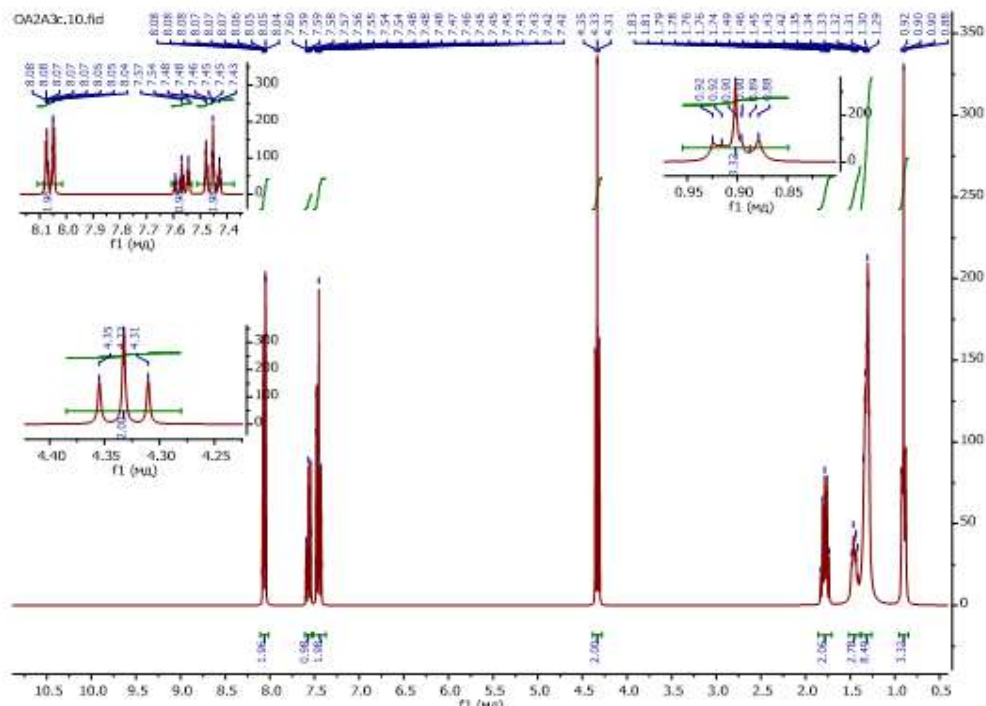
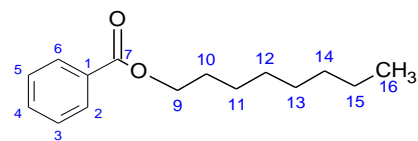


Figura 84 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 1c

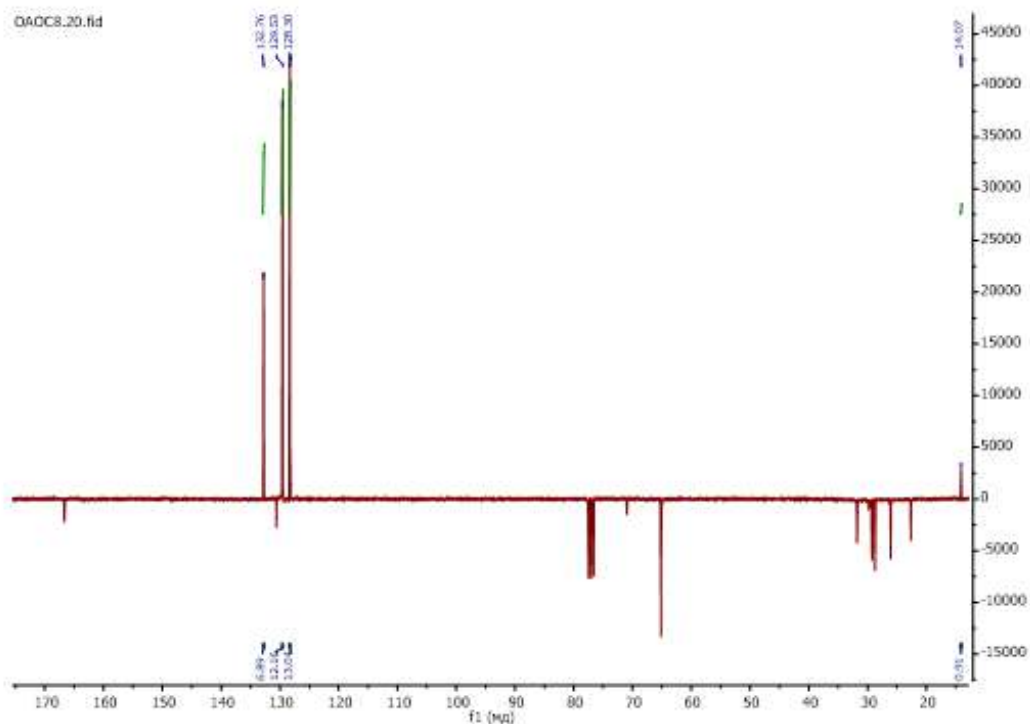


Figura 85 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 1c

4. Benzoato de dodecilo (1e)

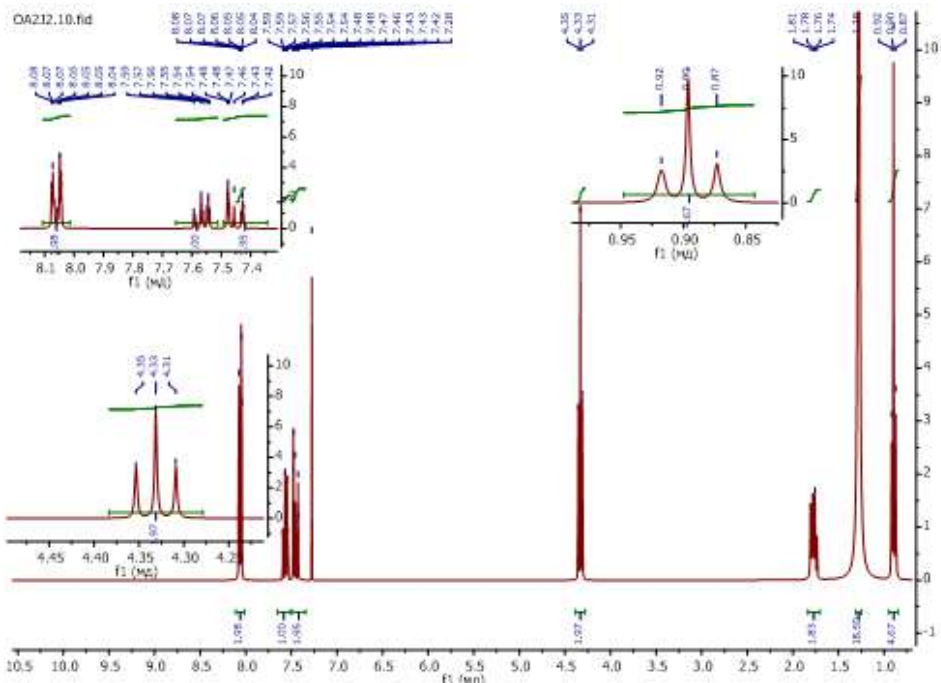
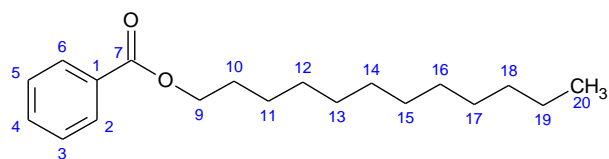


Figura 86 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 1e

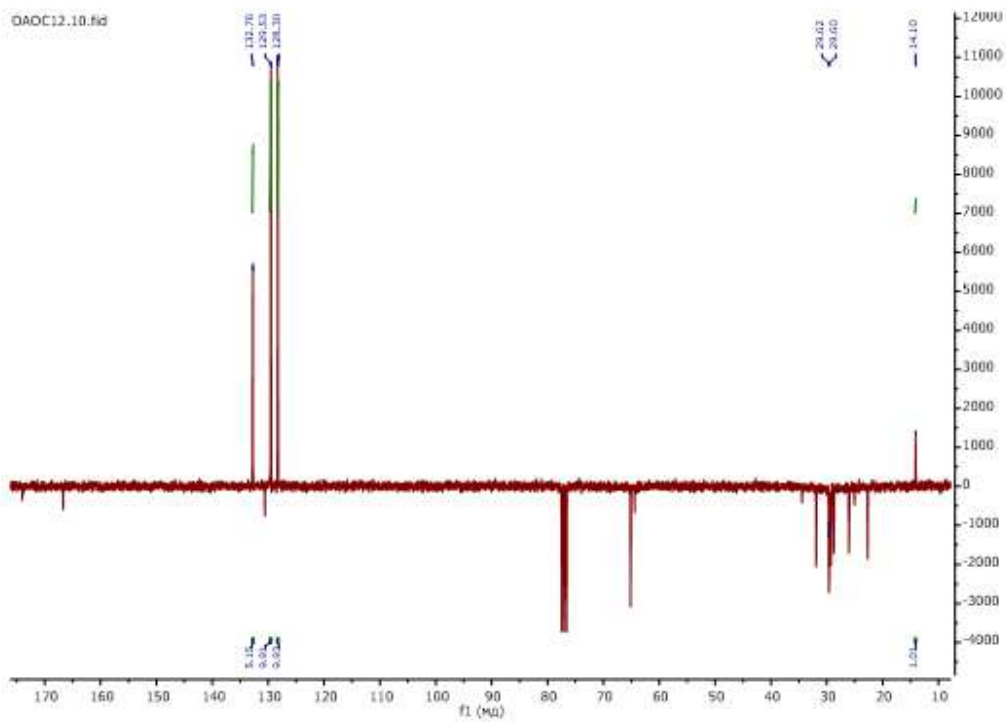


Figura 87 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 1e

5. 4-nitrobenzoato de octilo (2c)

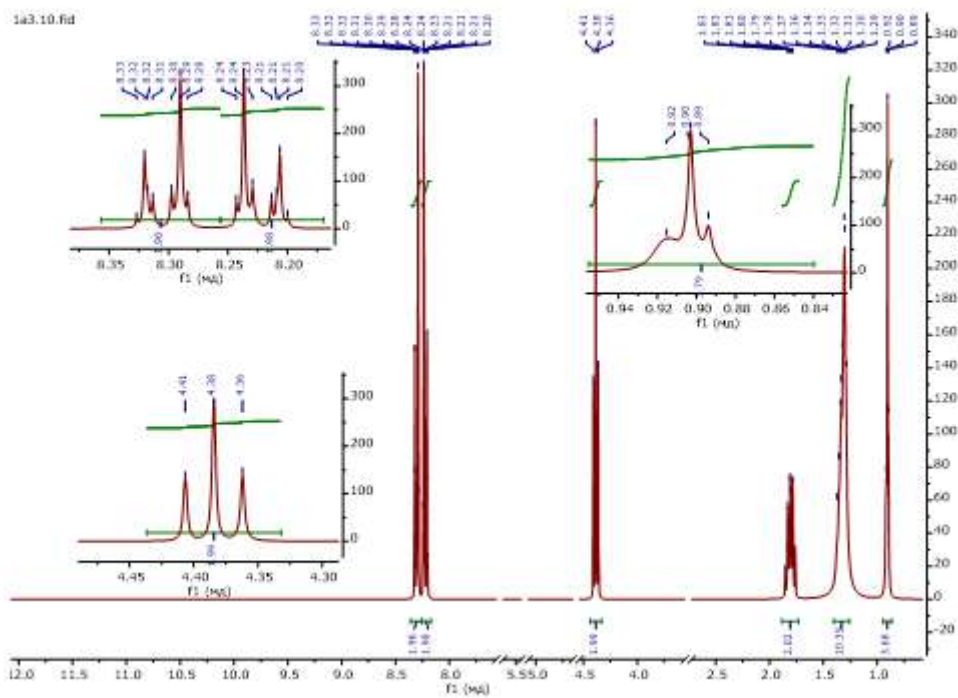
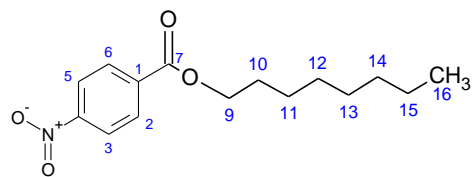


Figura 88 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 2c

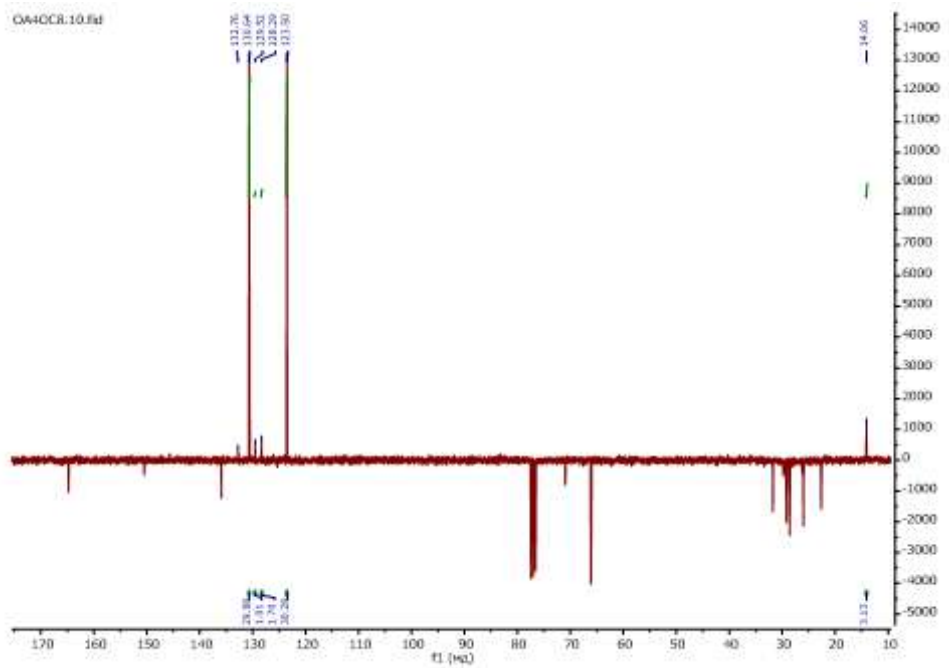


Figura 89 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 2c

6. 3,5-dinitrobenzoato de decilo (3d)

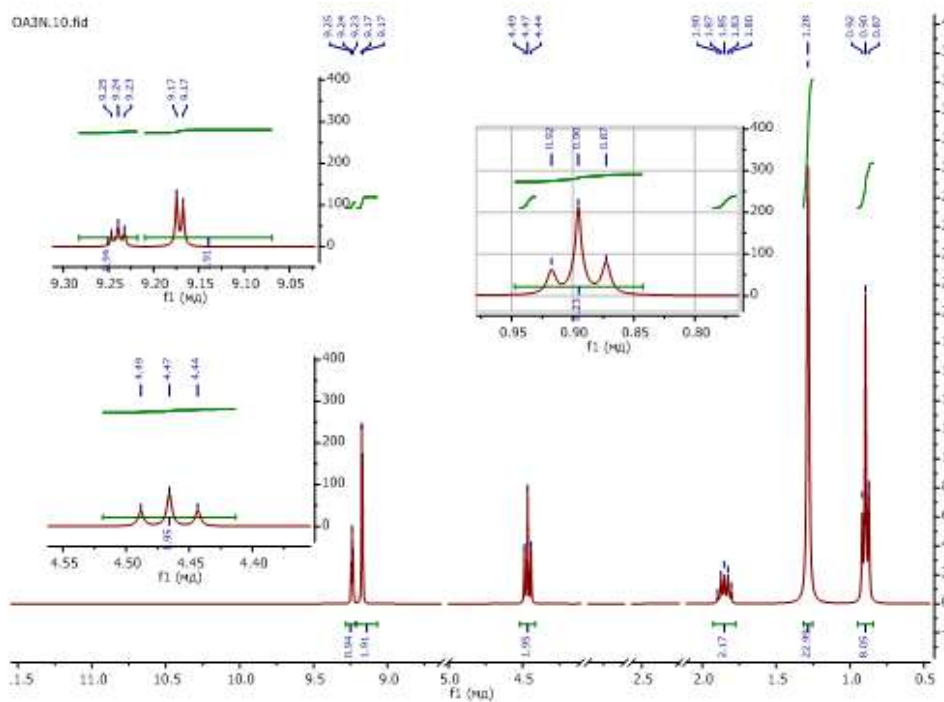
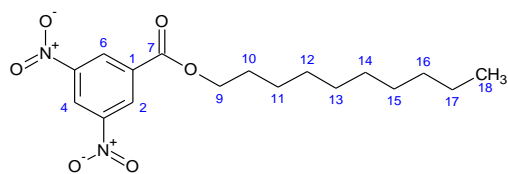


Figura 90 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 3d

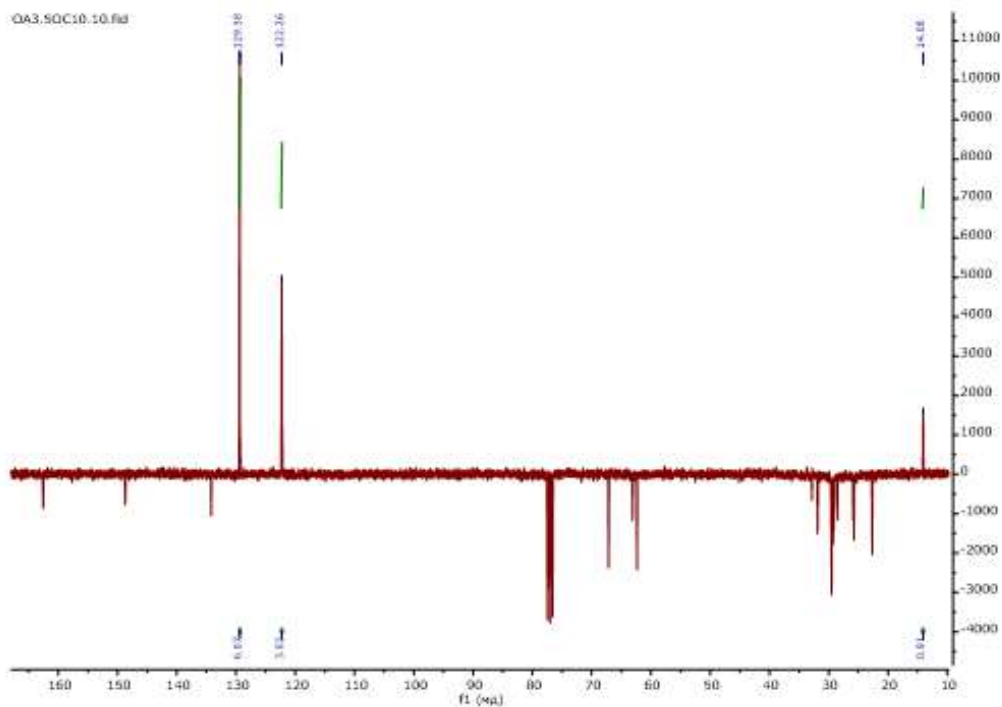


Figura 91 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 3d

7. 3,5-dinitrobenzoato de hexadecacilo (3g)

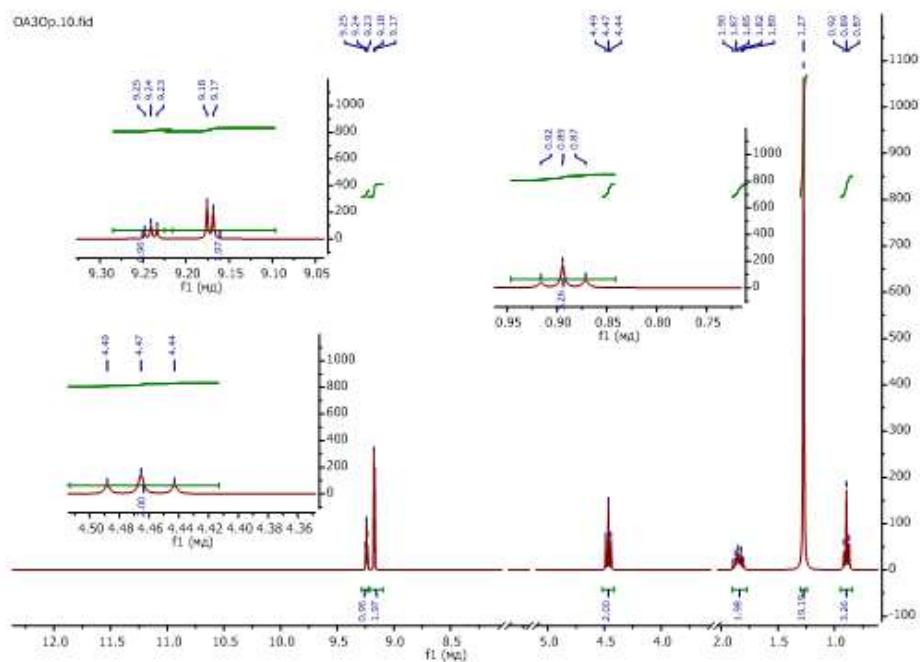
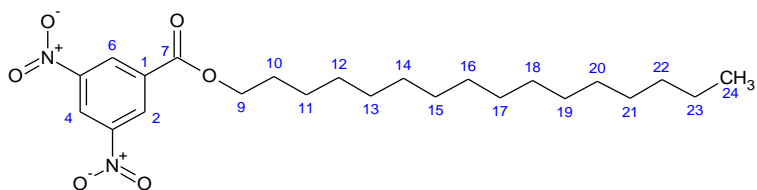


Figura 92 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 3g

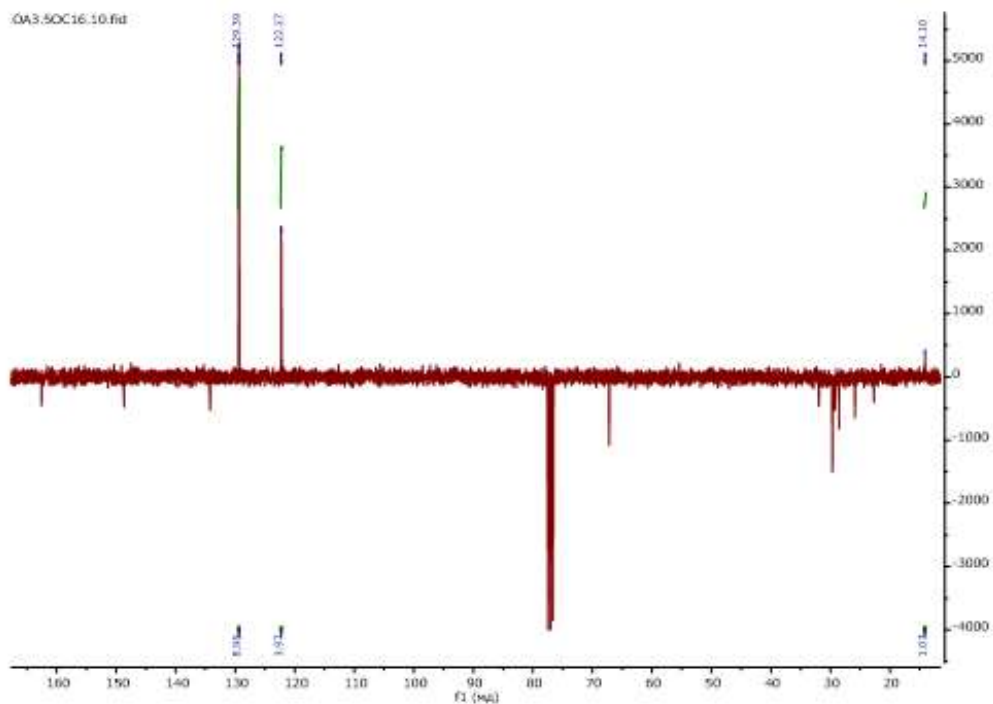


Figura 93 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 3g

8. 3-nitro-5-(trifluorometil)-benzoato de butilo (4a)

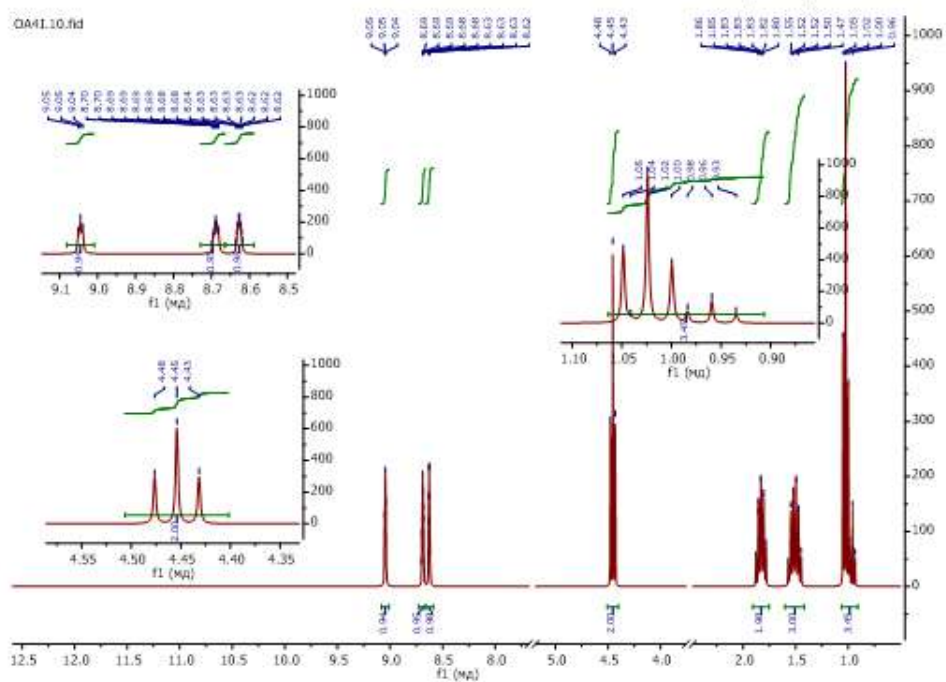
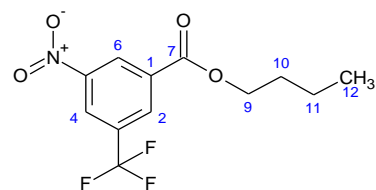


Figura 94 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 4<sup>a</sup>

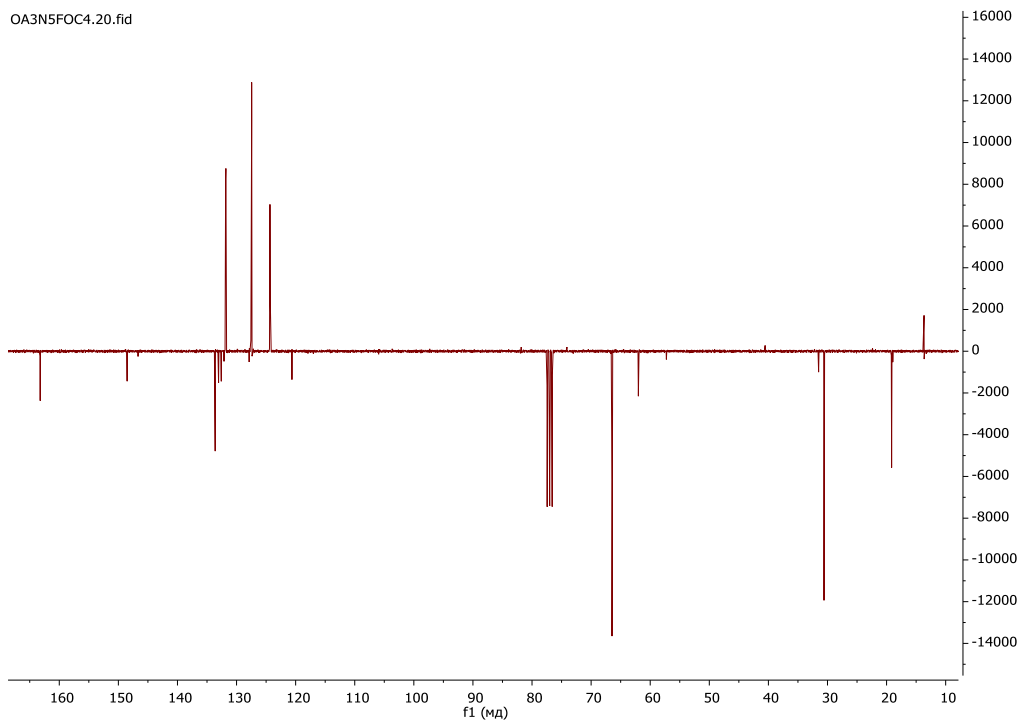


Figura 95 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 4a

9. 3-nitro-5-(trifluorometil)-benzoato de hexilo (4b)

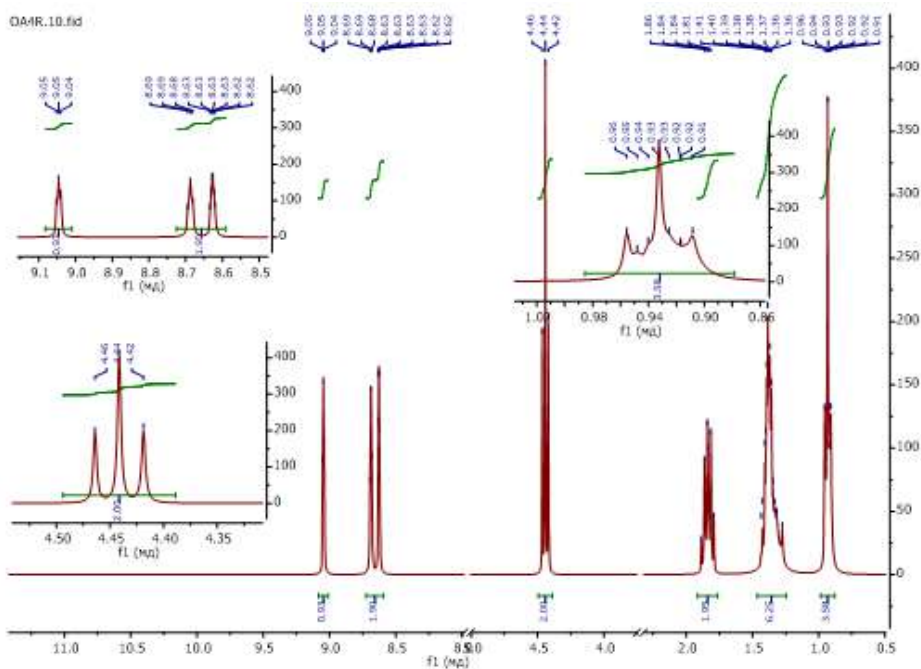
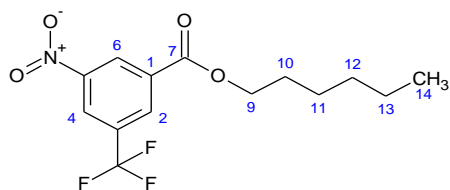


Figura 96 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 4b

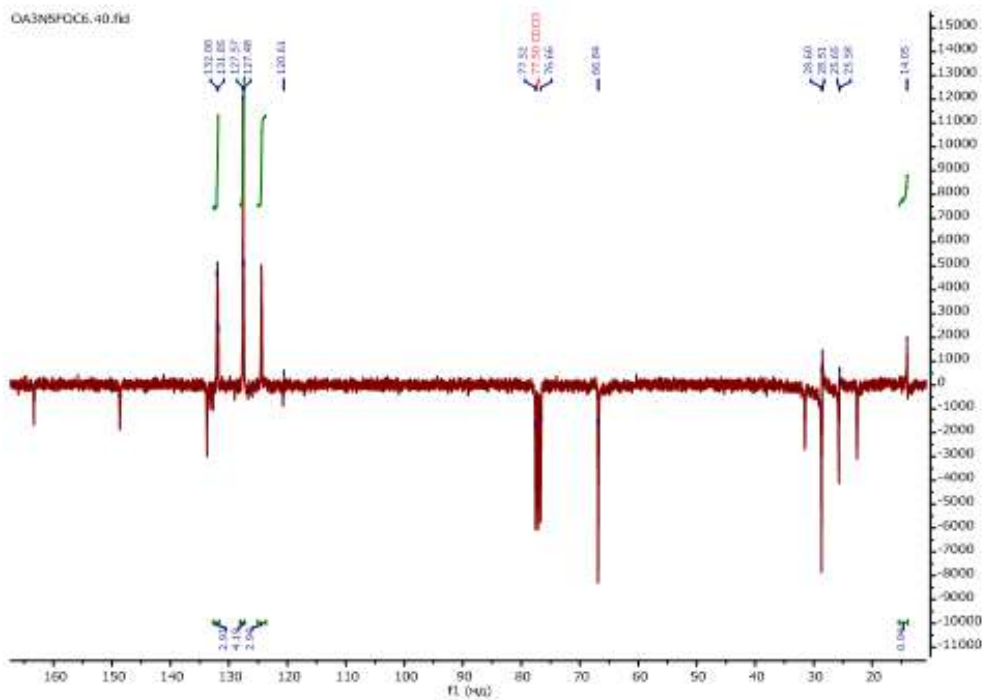


Figura 97 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 4b

10. 3-nitro-5-(trifluorometil)-benzoato de octilo (4c)

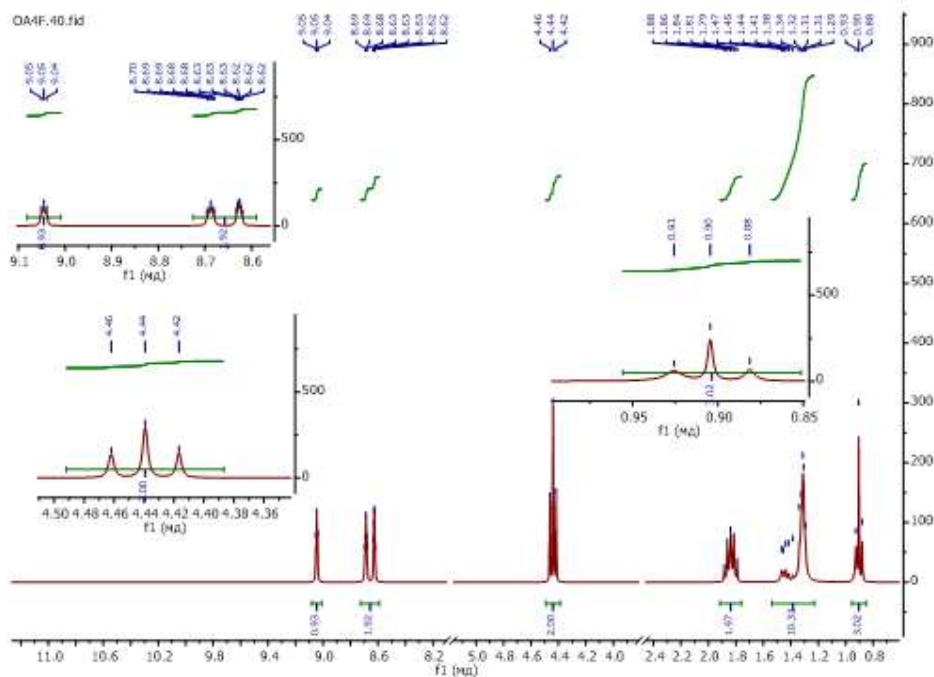
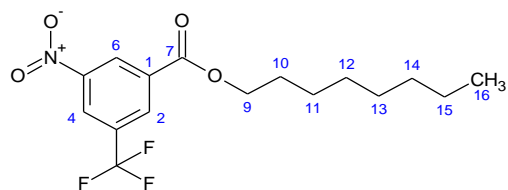


Figura 98 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 4c

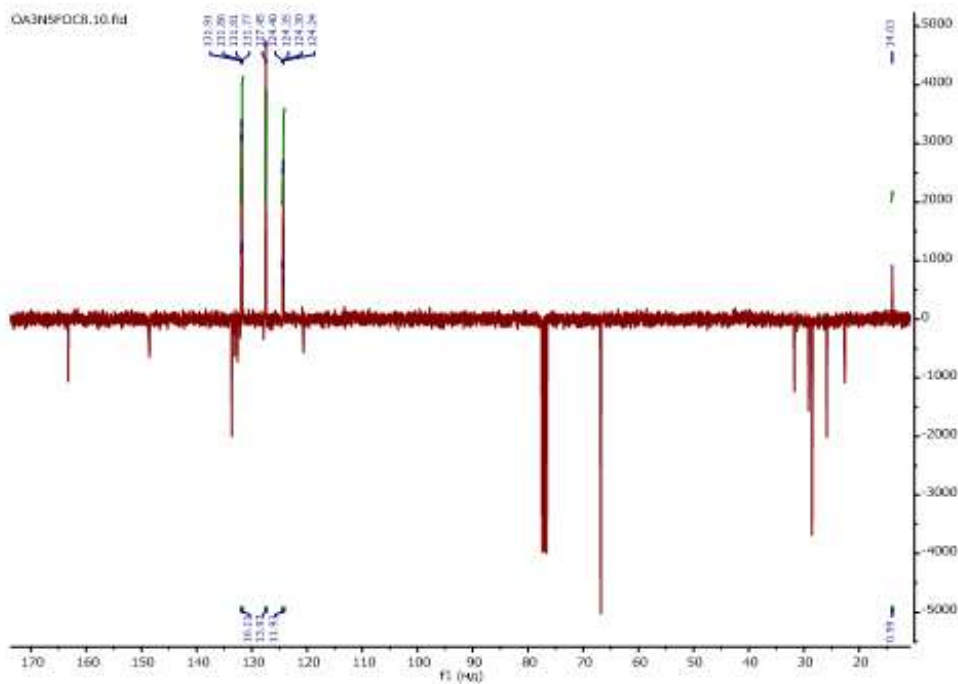


Figura 99 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 4c

11. 3-nitro-5-(trifluorometil)-benzoato de decacilo (4d)

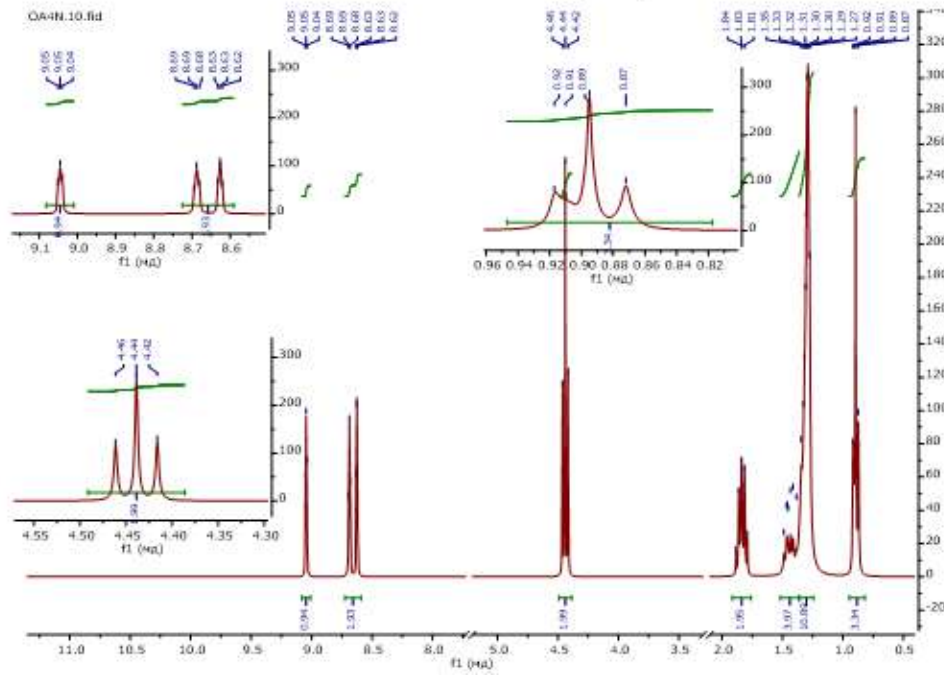
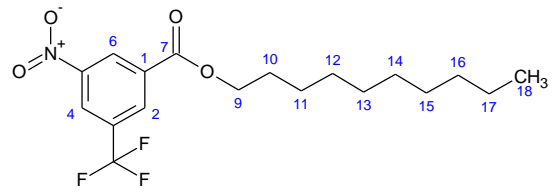


Figura 100 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 4d

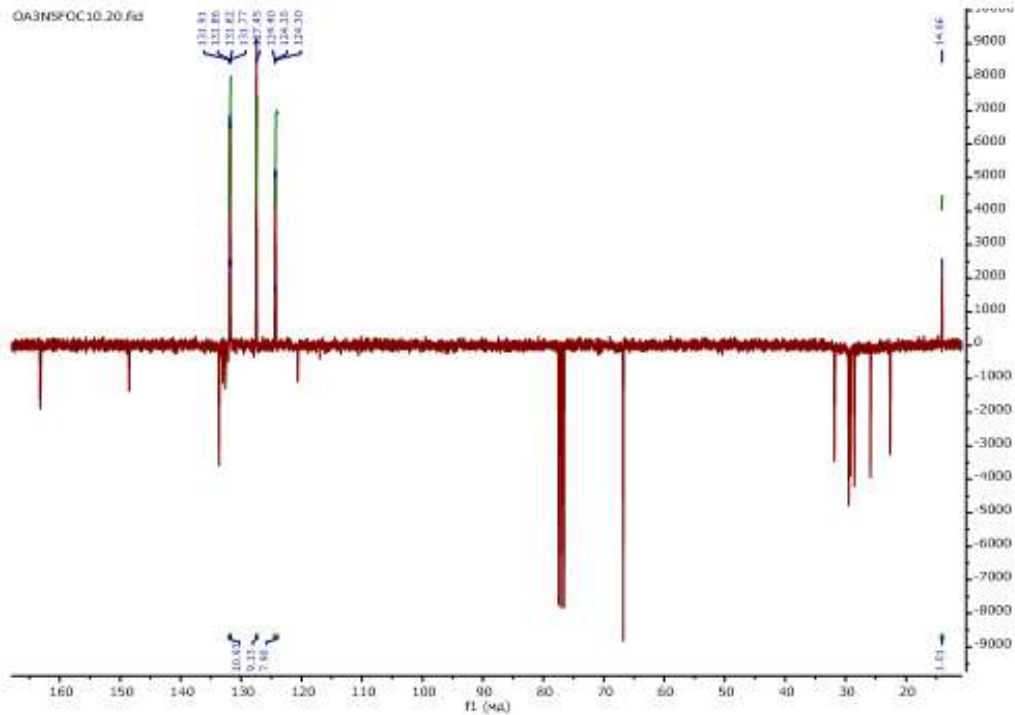


Figura 101 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 4d

12. 3-nitro-5-(trifluorometil)-benzoato de dodecilo (4e)

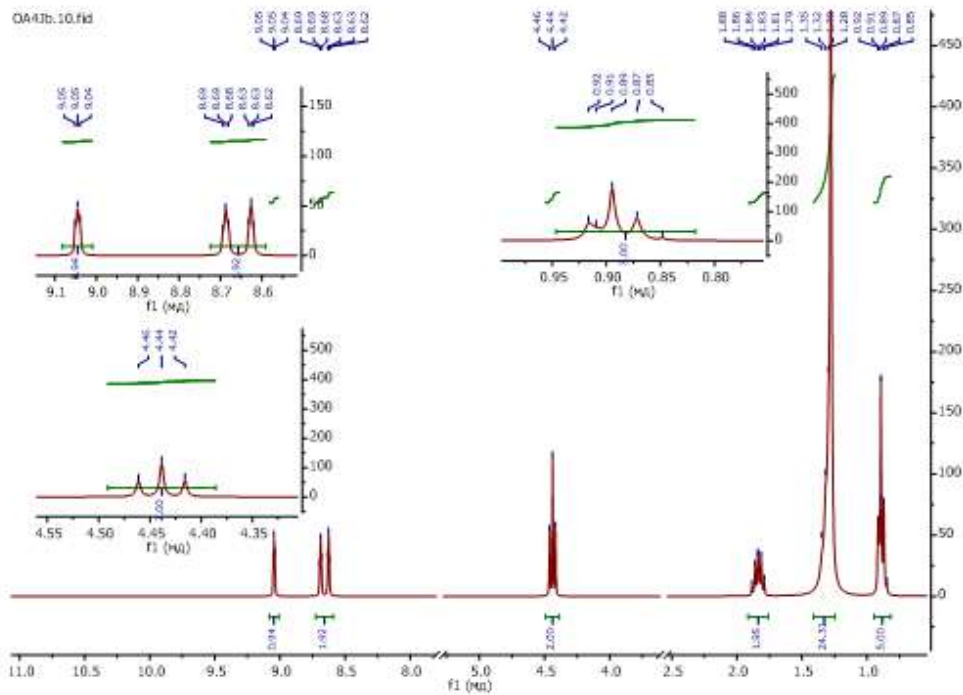
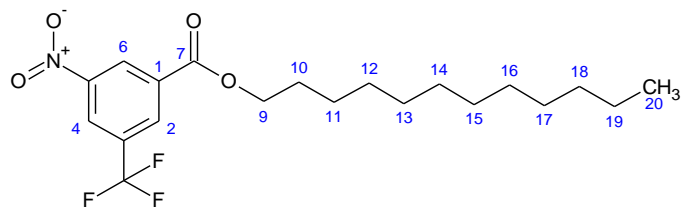


Figura 102 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 4e

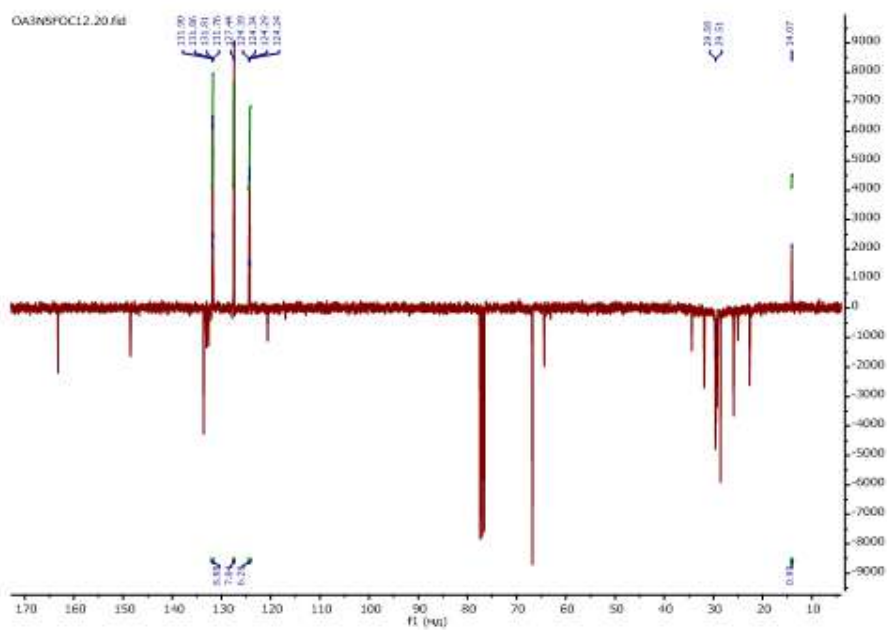


Figura 103 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 4e

### 13. N-butil-benzamida (5a)

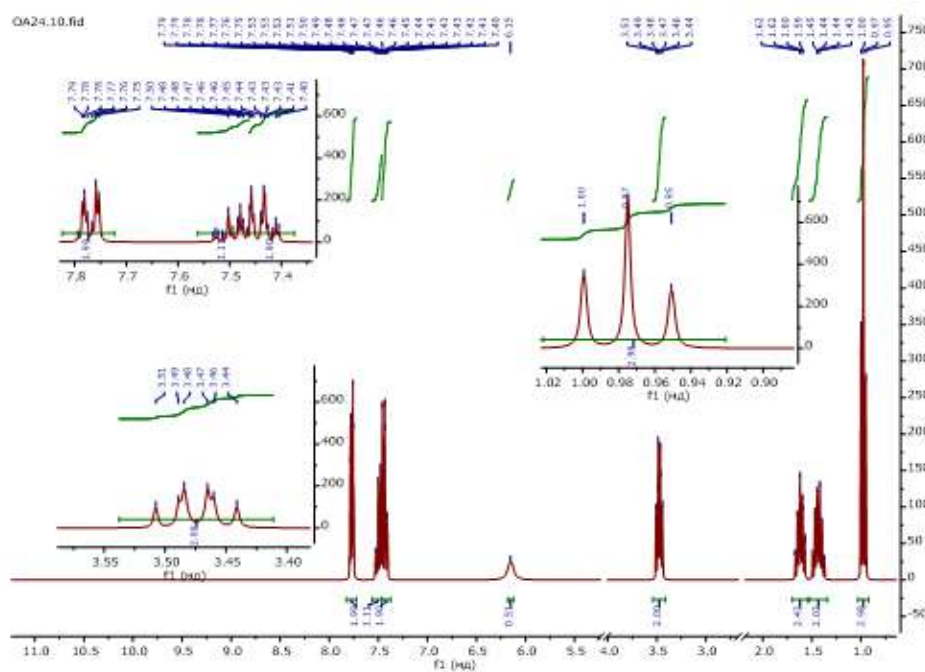
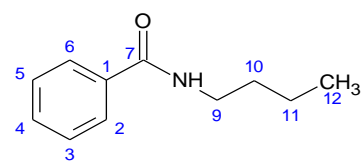


Figura 104 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 5a

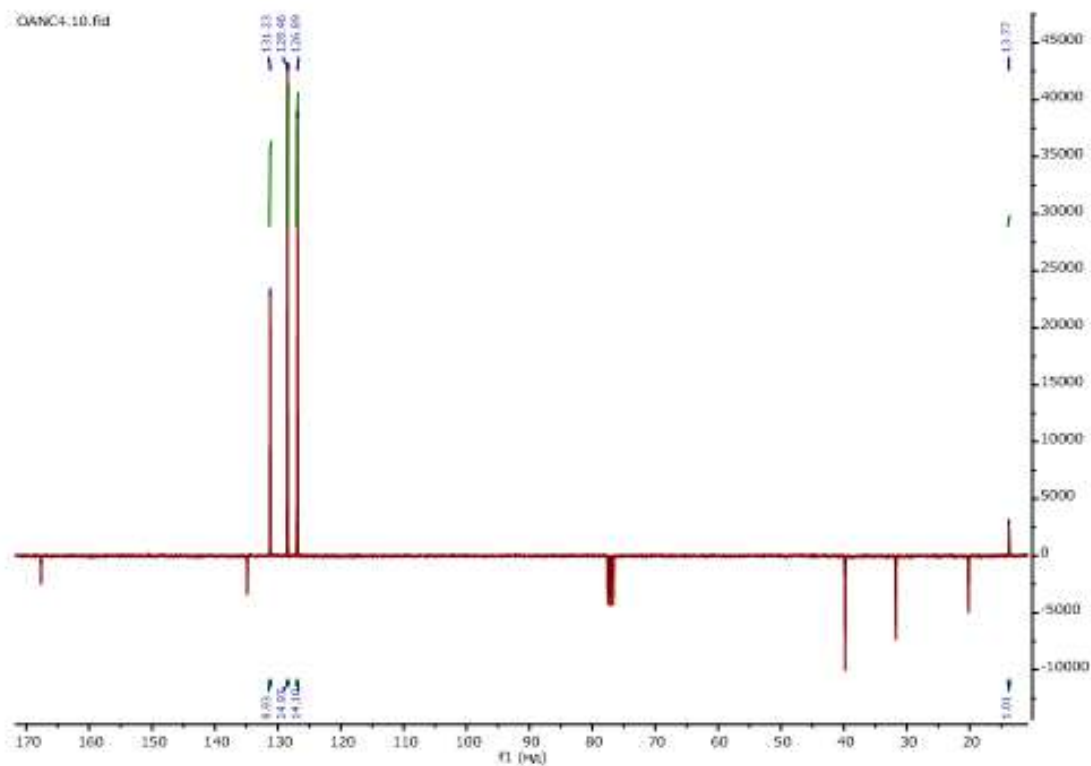


Figura 105 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 5a

14. N-hexil-benzamida (5b)

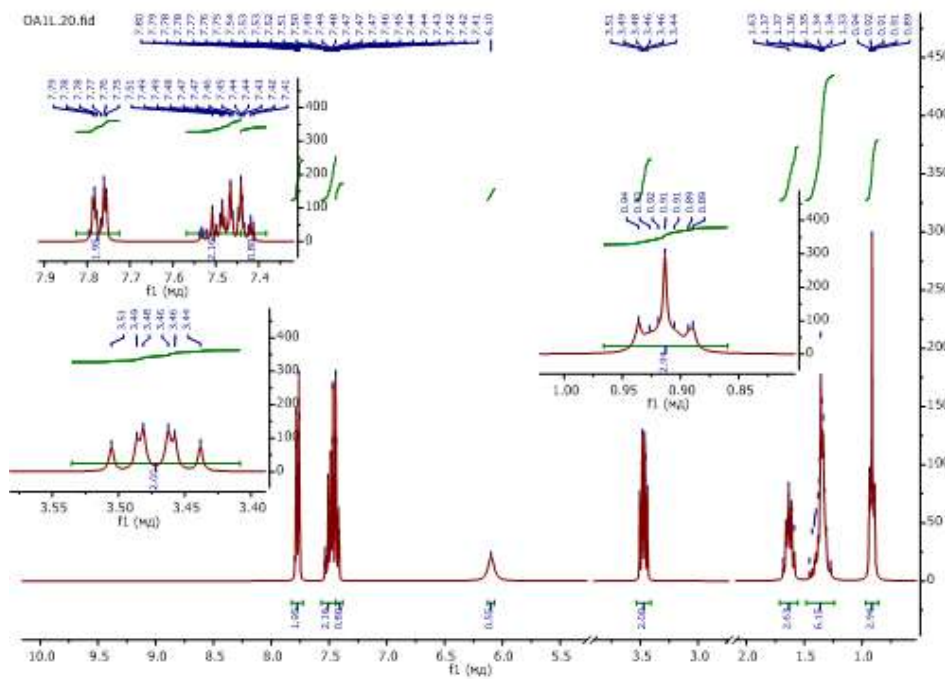
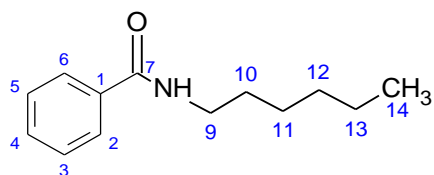


Figura 106 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 5b

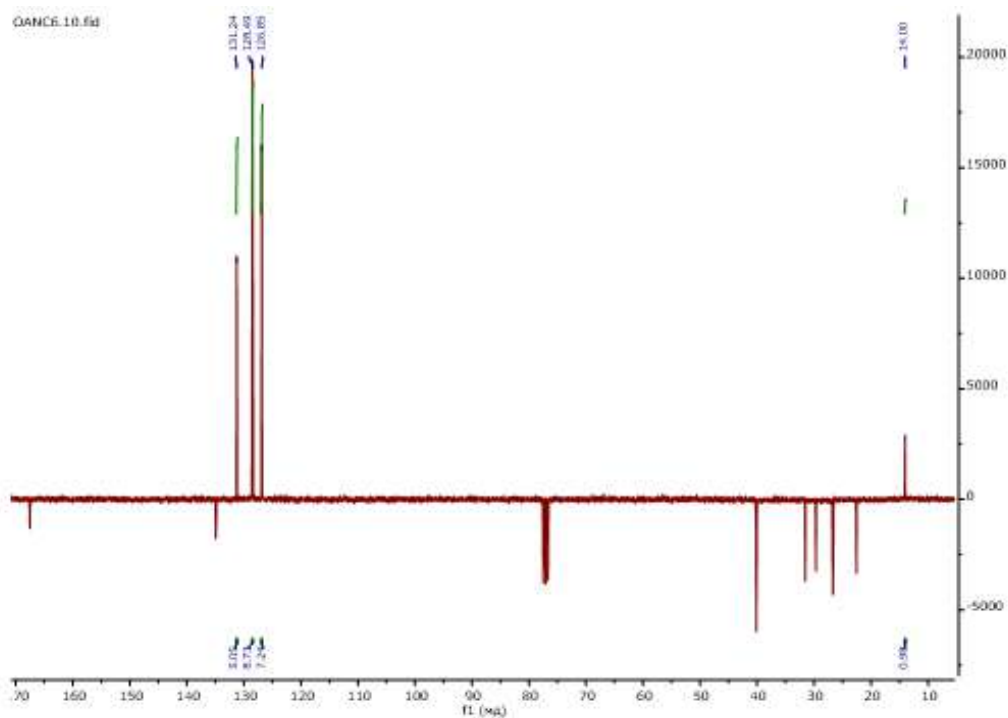


Figura 107 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 5b

15. N-octil-benzamida (5c)

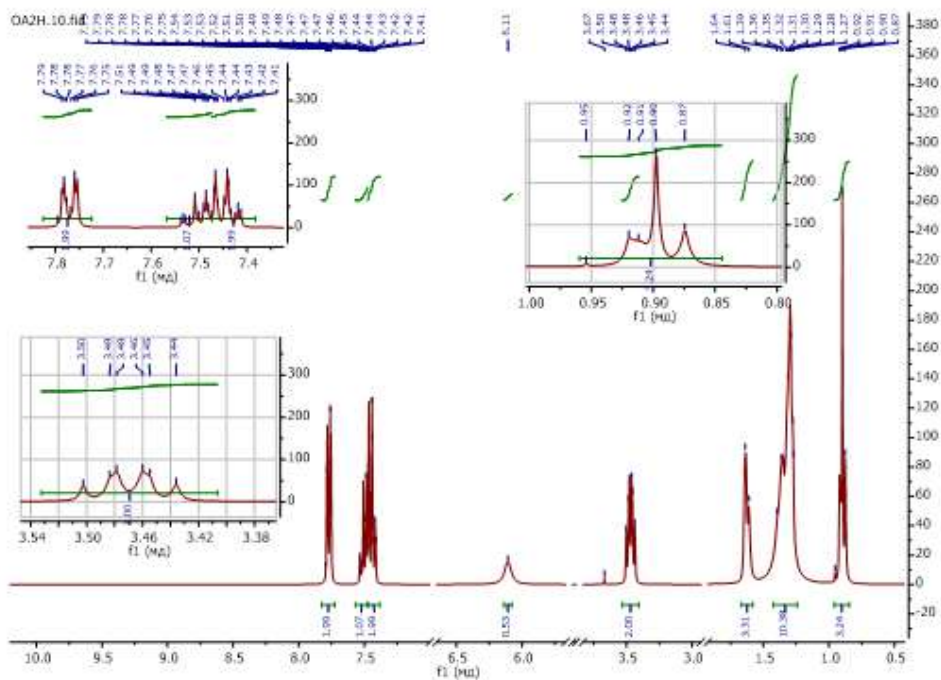
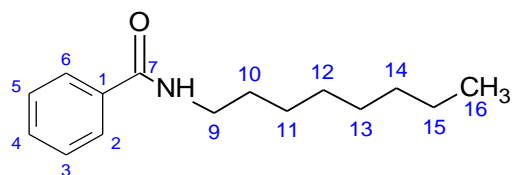


Figura 108 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 5c

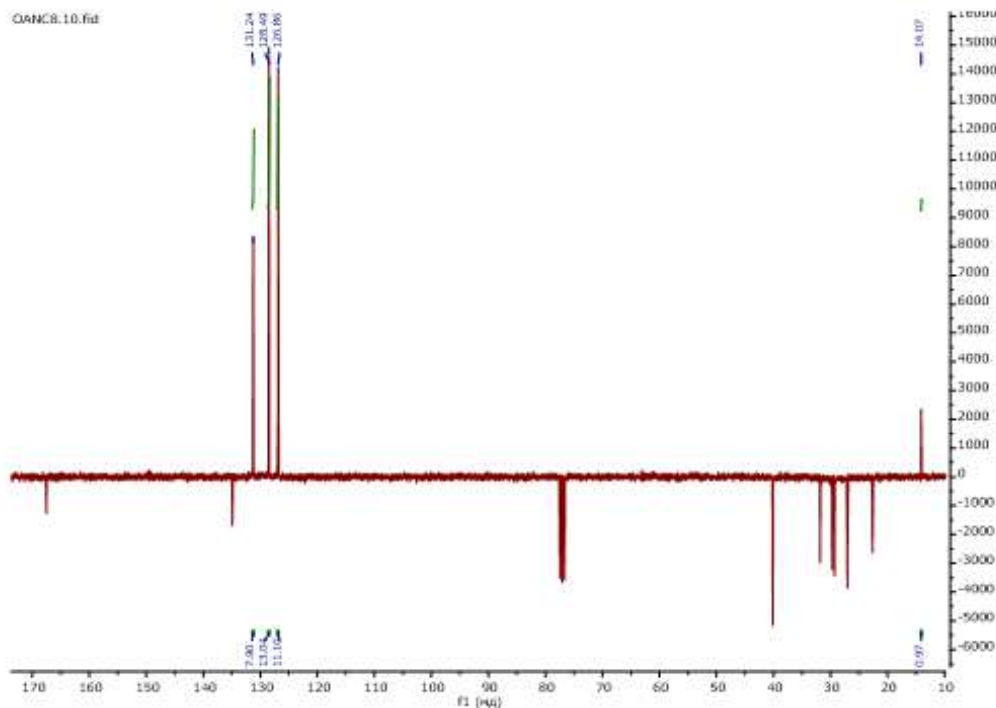


Figura 109 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 5c

16. N-dodecil-benzamida (5e)

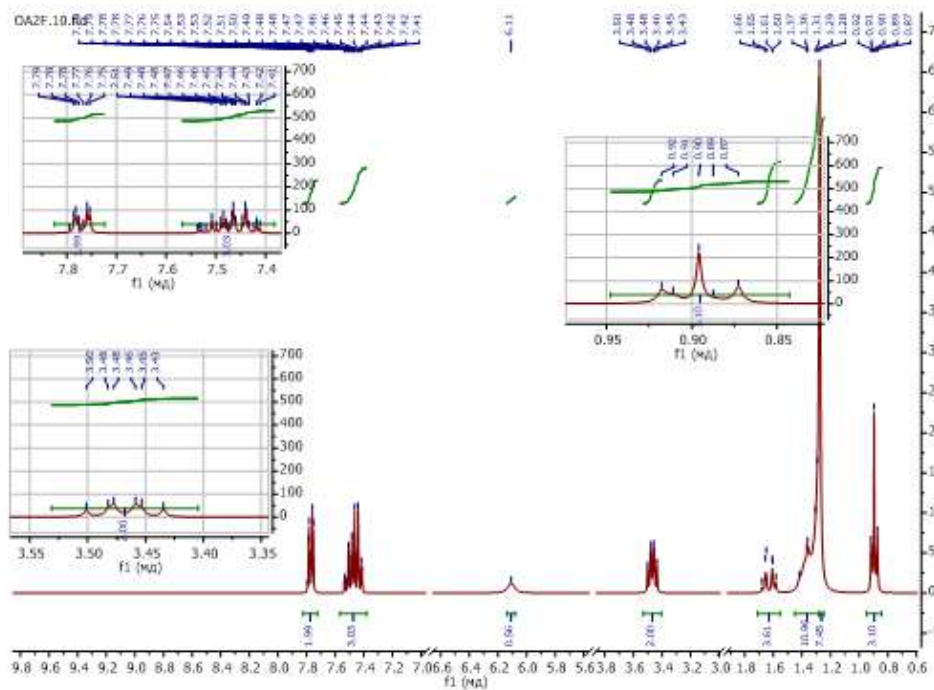
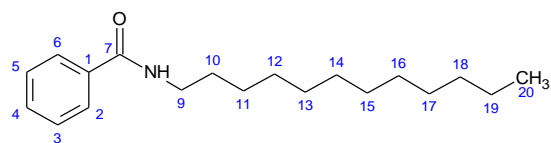


Figura 110 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 5e

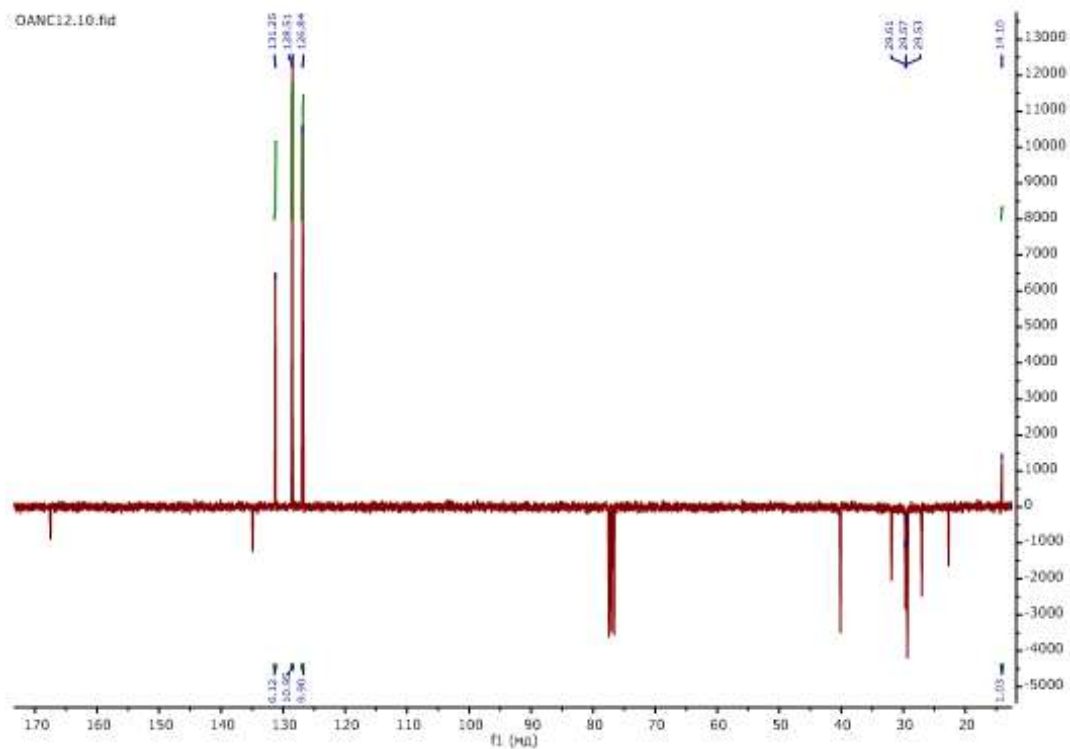


Figura 111 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 5e



18. N-hexil-4-nitrobenzamida (6b)

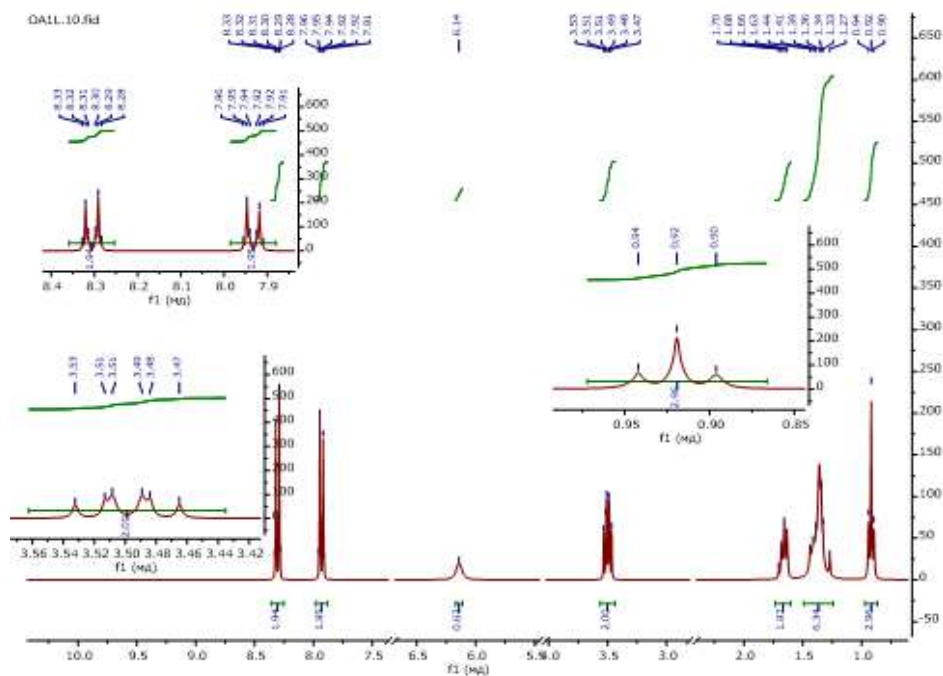
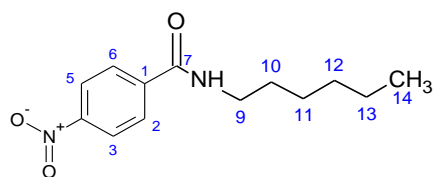


Figura 114 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 6b

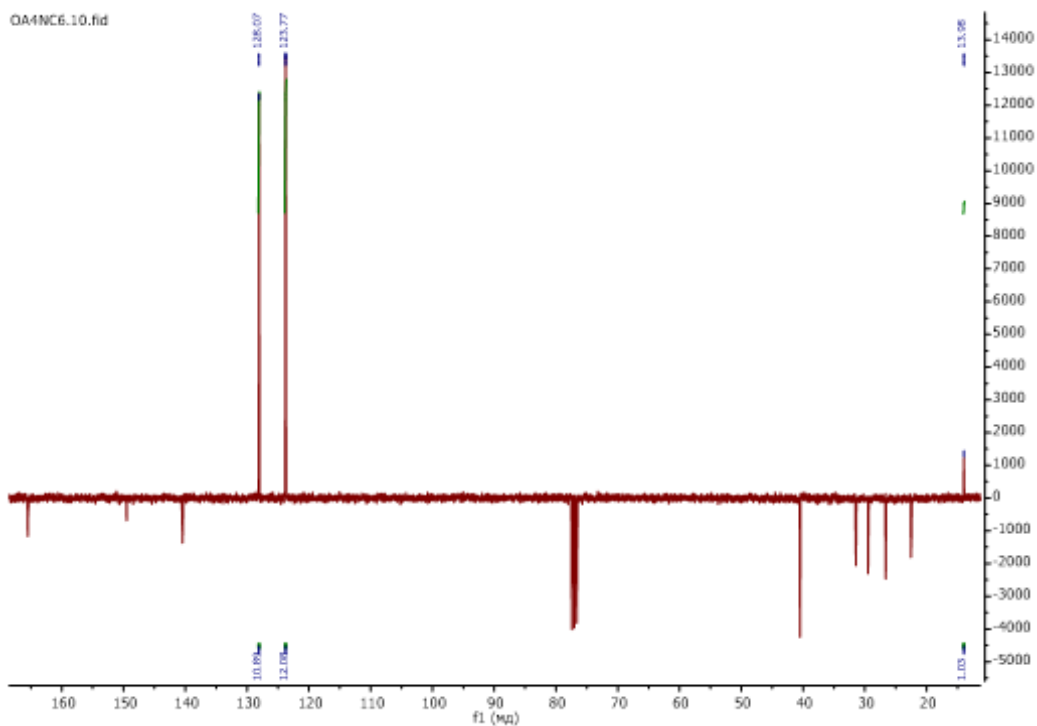


Figura 115 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 6b

19. N-octil-4-nitrobenzamida (6c)

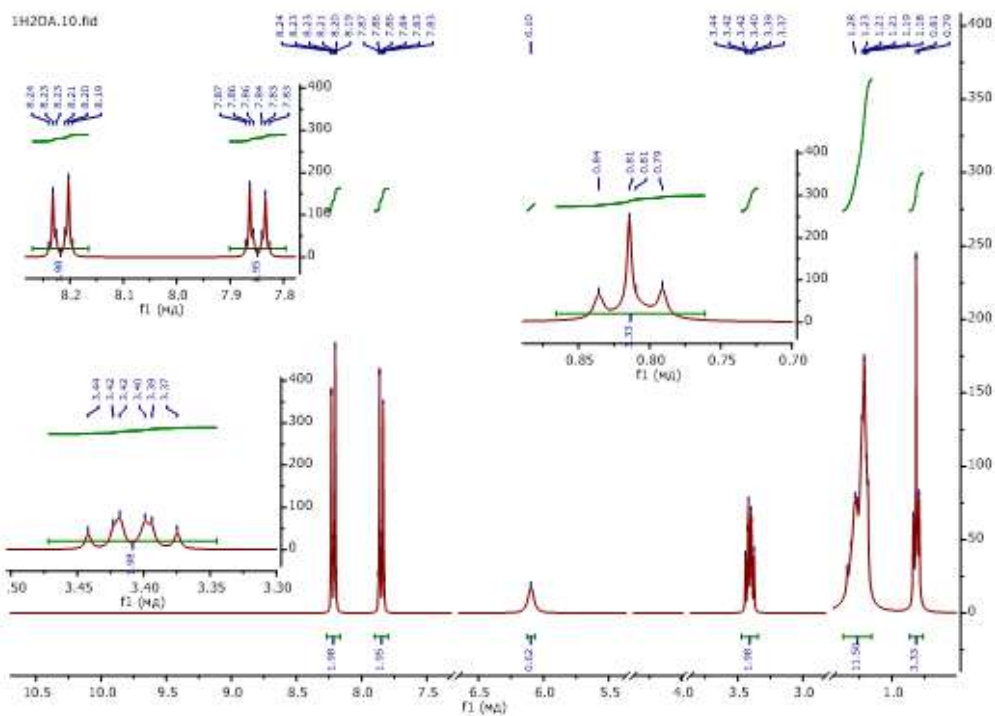
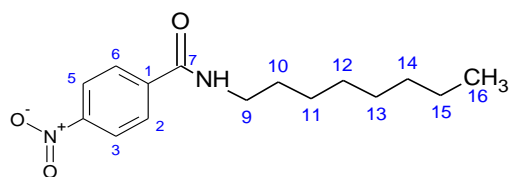


Figura 116 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 6c

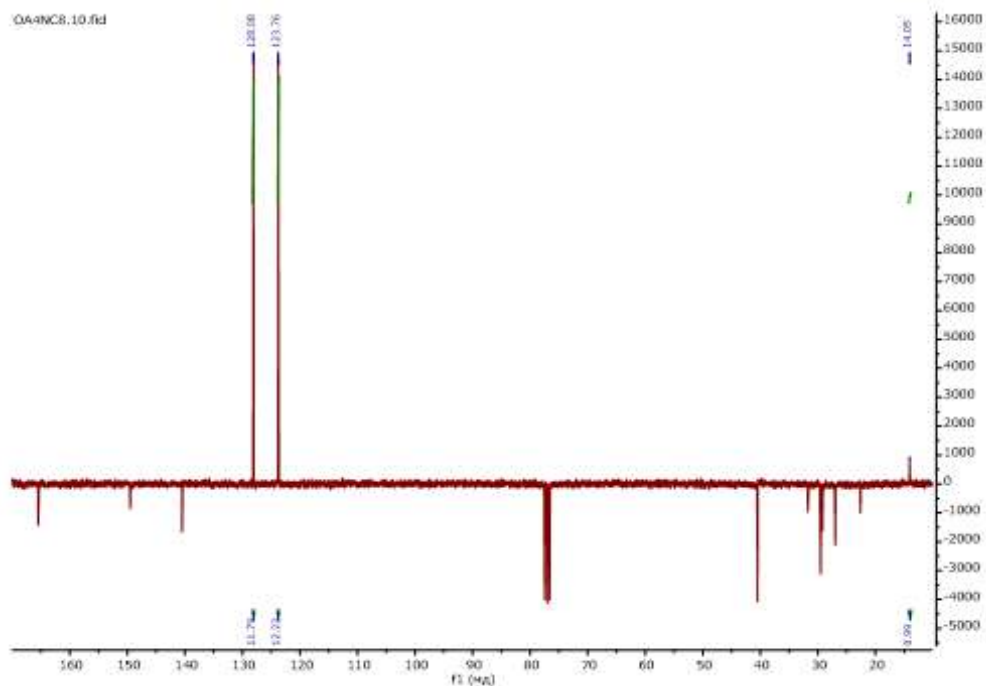


Figura 117 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 6c

20. N-dodecil-4-nitrobenzamida (6e)

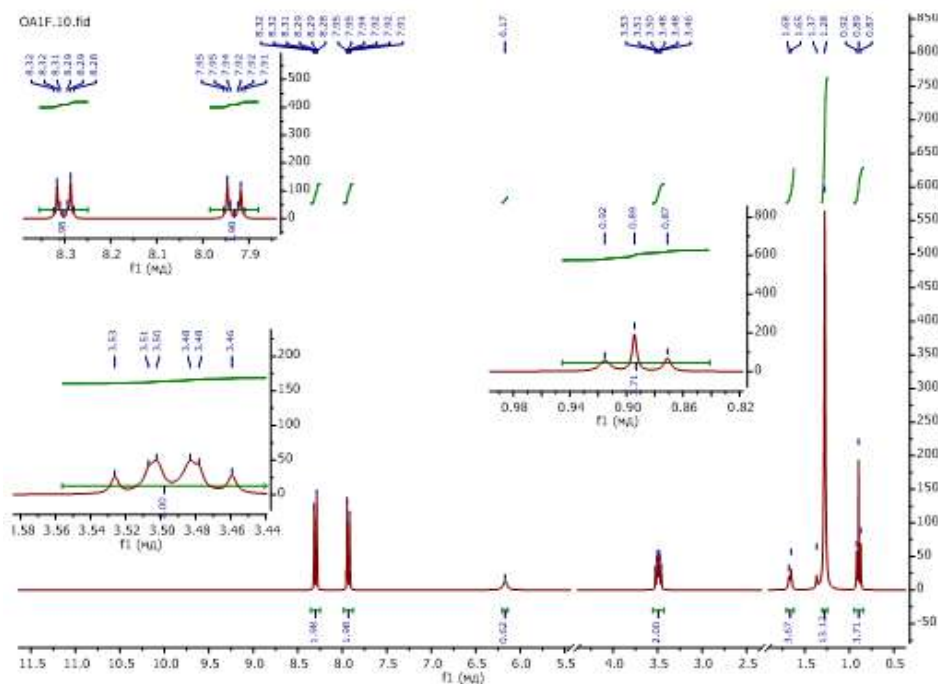
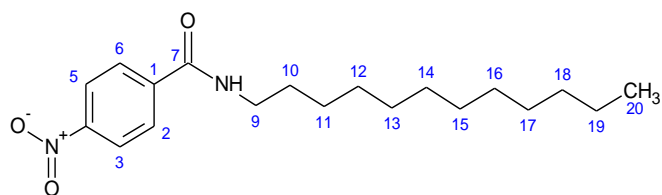


Figura 118 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 6e

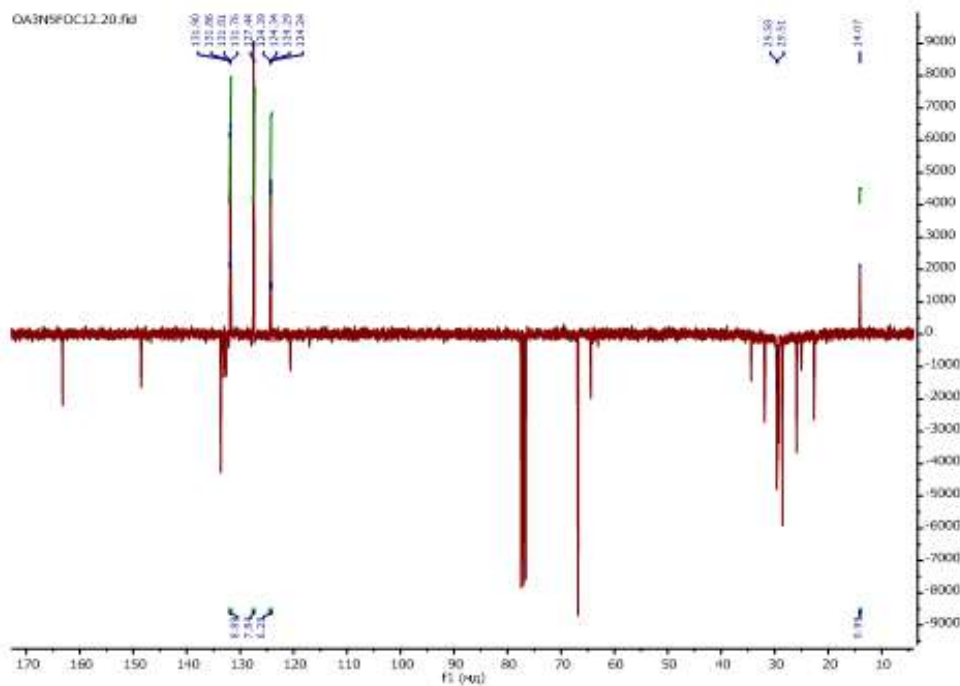


Figura 119 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 6e

21. N-butil-3,5-dinitrobenzamida (7a)

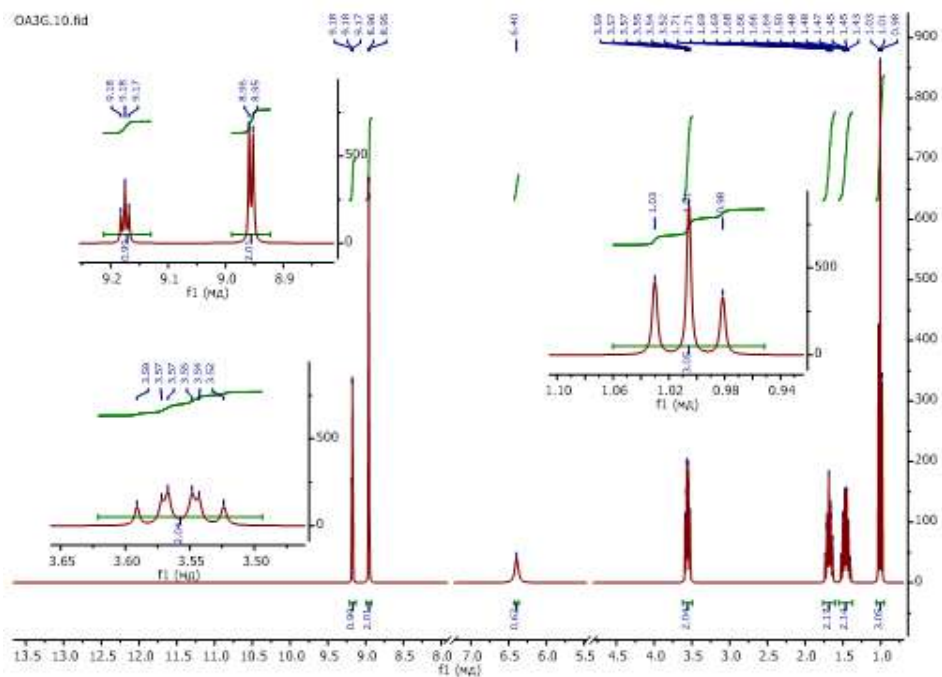
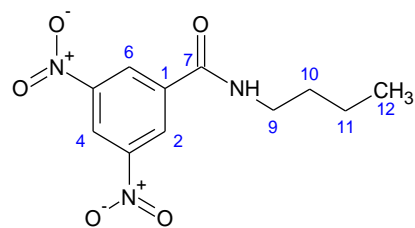


Figura 120 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 7a

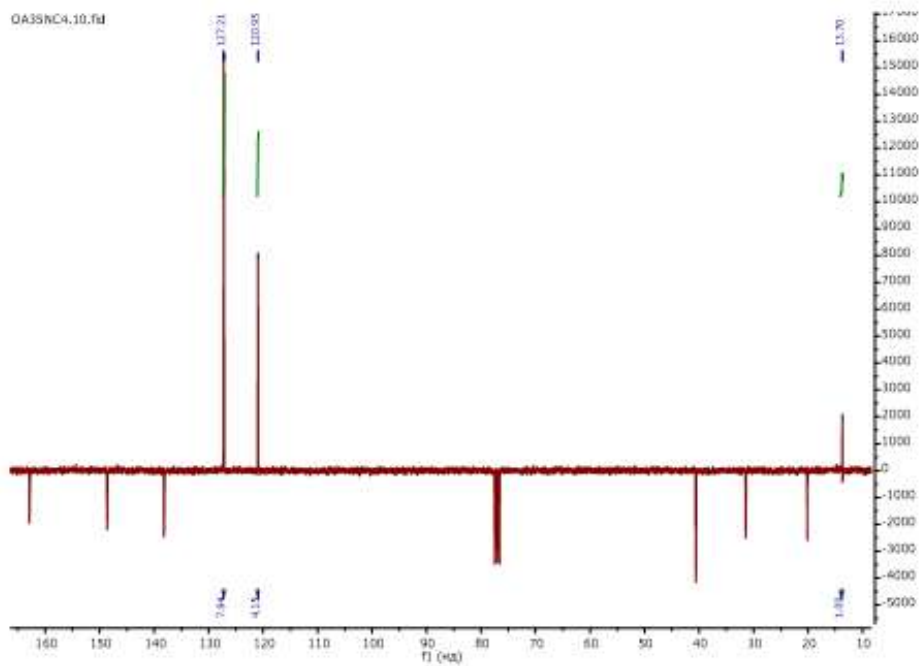


Figura 121 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 7a

22. N-hexil-3,5-dinitrobenzamida (7b)

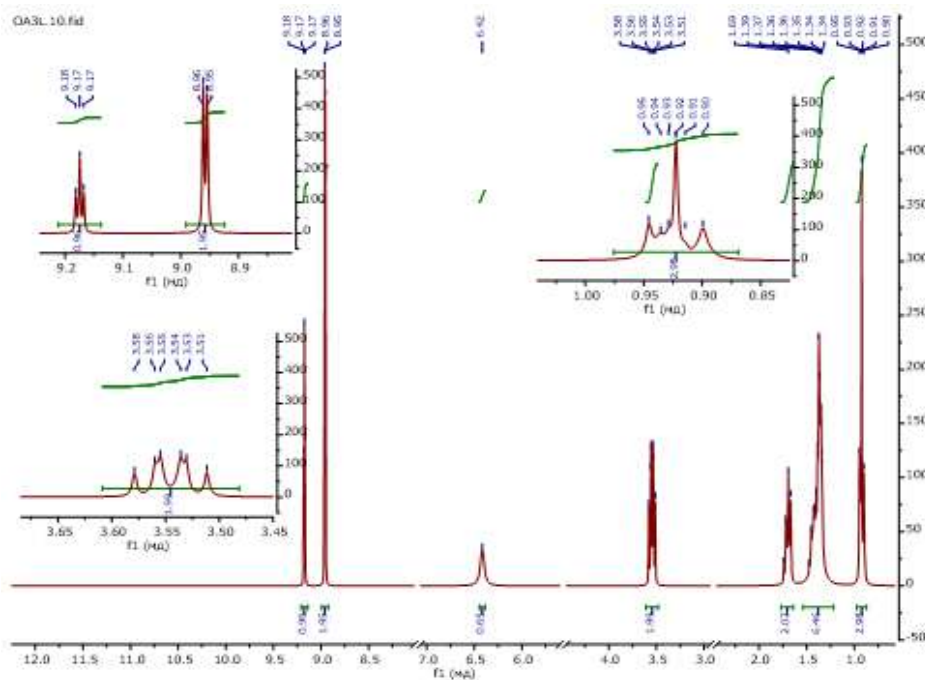
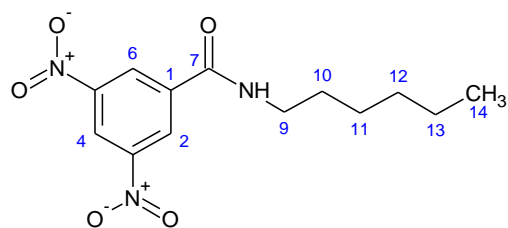


Figura 122 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 7b

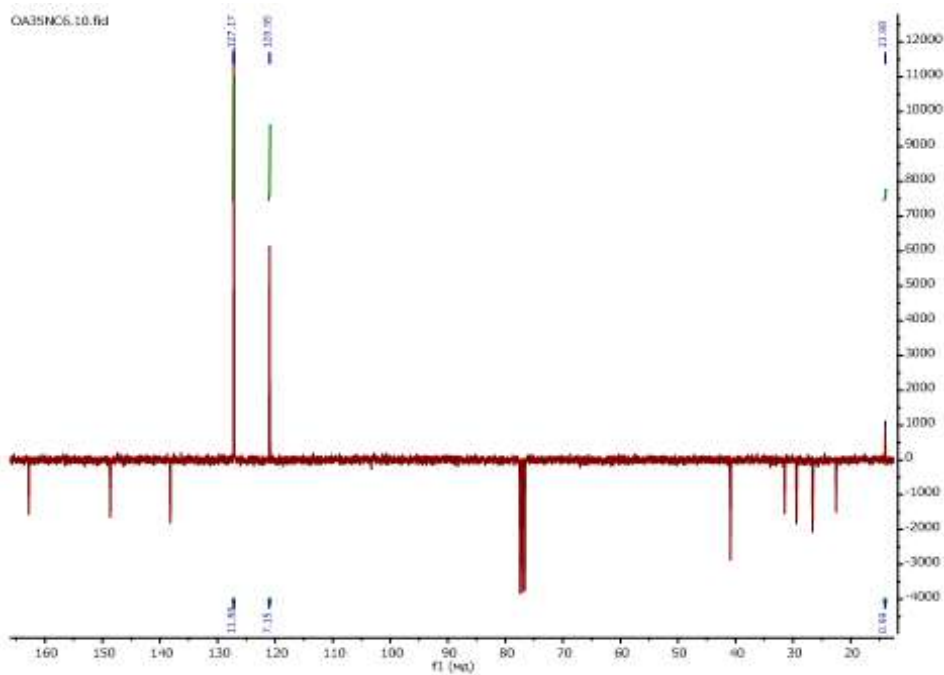


Figura 123 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 7b

23. N-octil-3,5-dinitrobenzamida (7c)

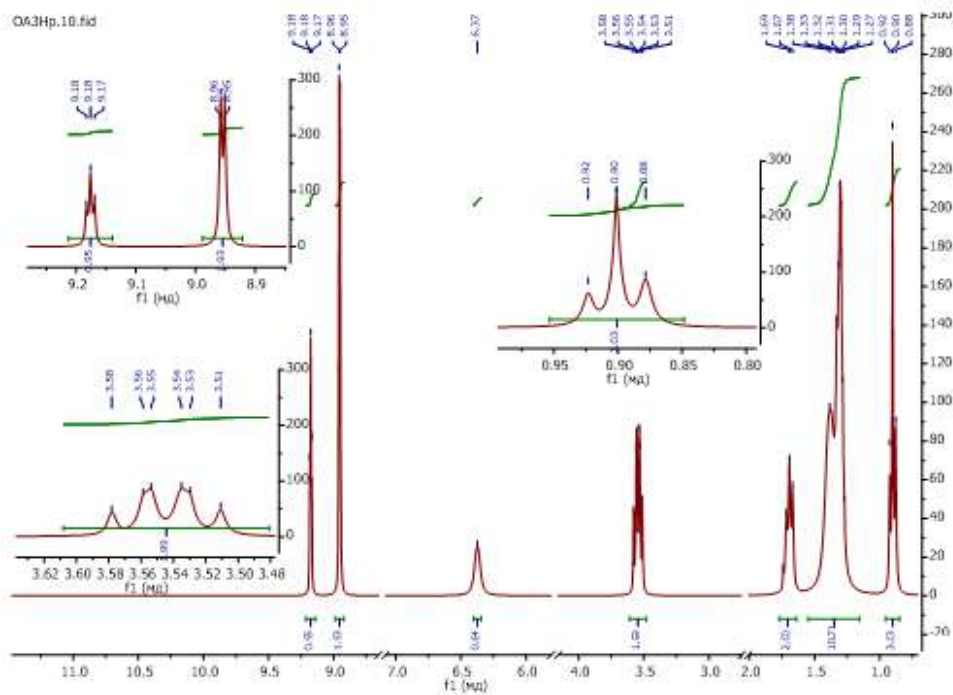
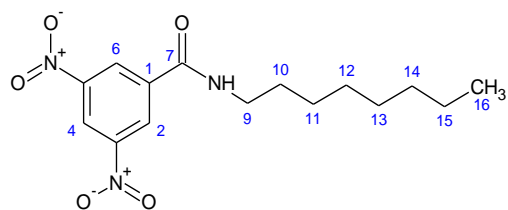


Figura 124 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 7c

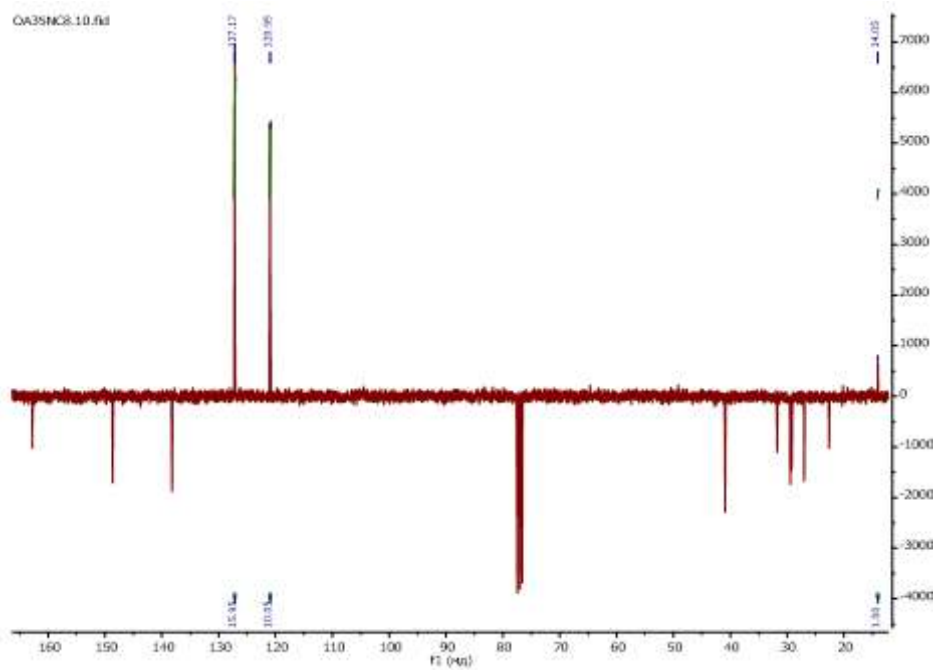


Figura 125 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 7c

24. N-decilo-3,5-dinitrobenzamida (7d)

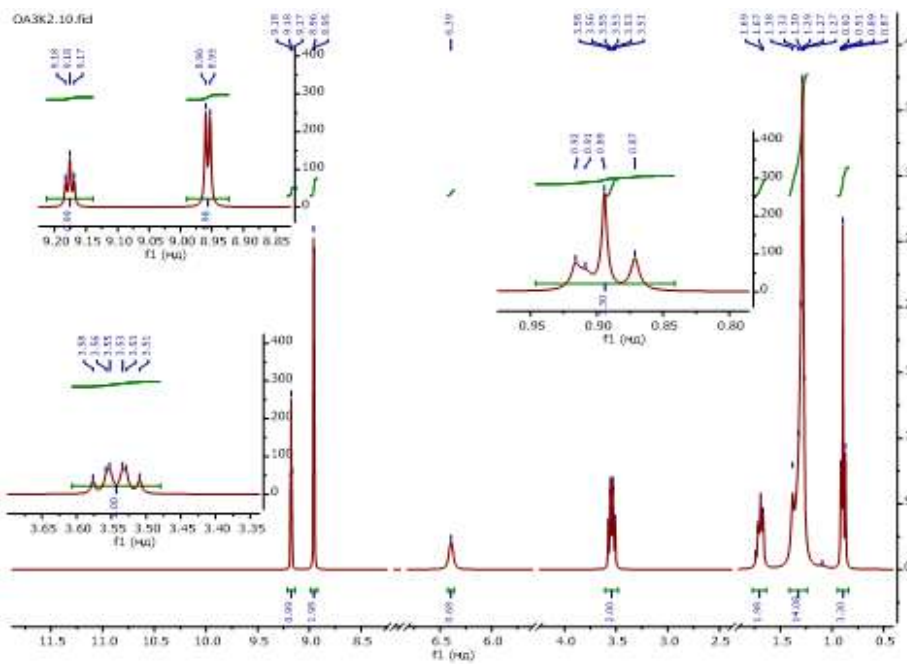
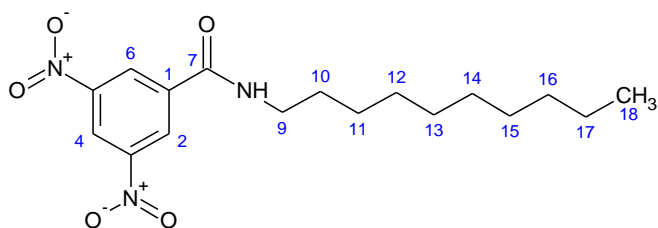


Figura 126 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 7d

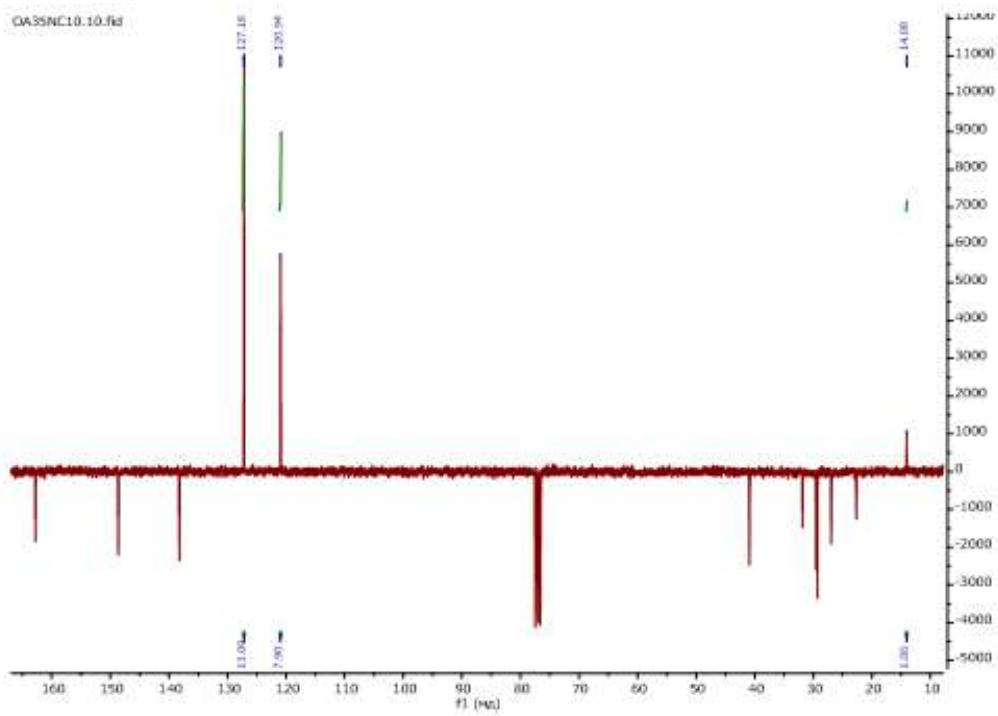


Figura 127 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 7d

25. N-dodecacilo-3,5-dinitrobenzamida (7e)

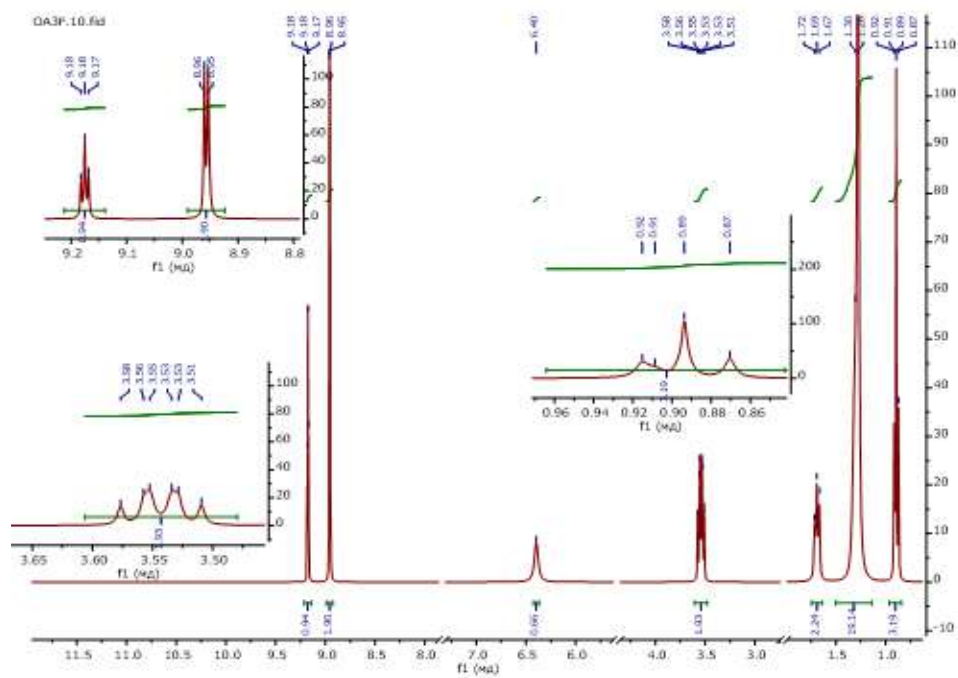
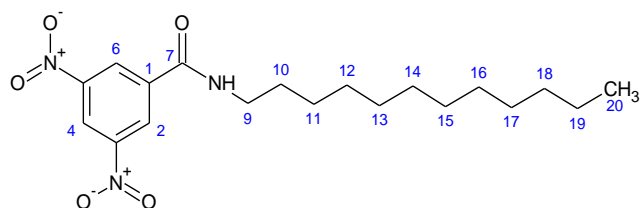


Figura 128 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 7e

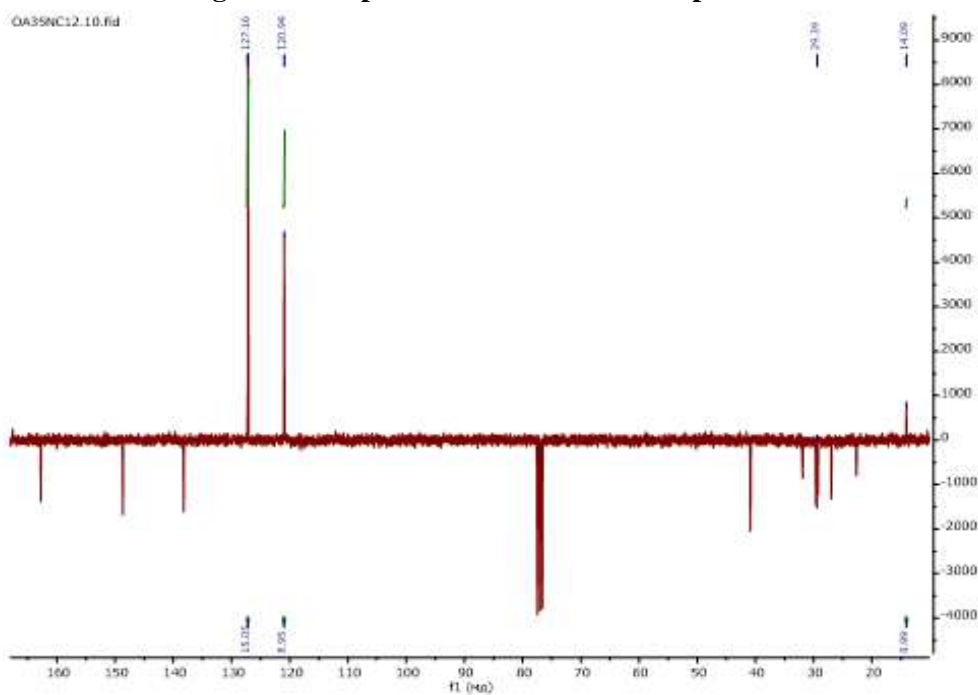


Figura 129 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 7e

26. N-tetradecil-3,5-dinitrobenzamida (7f)

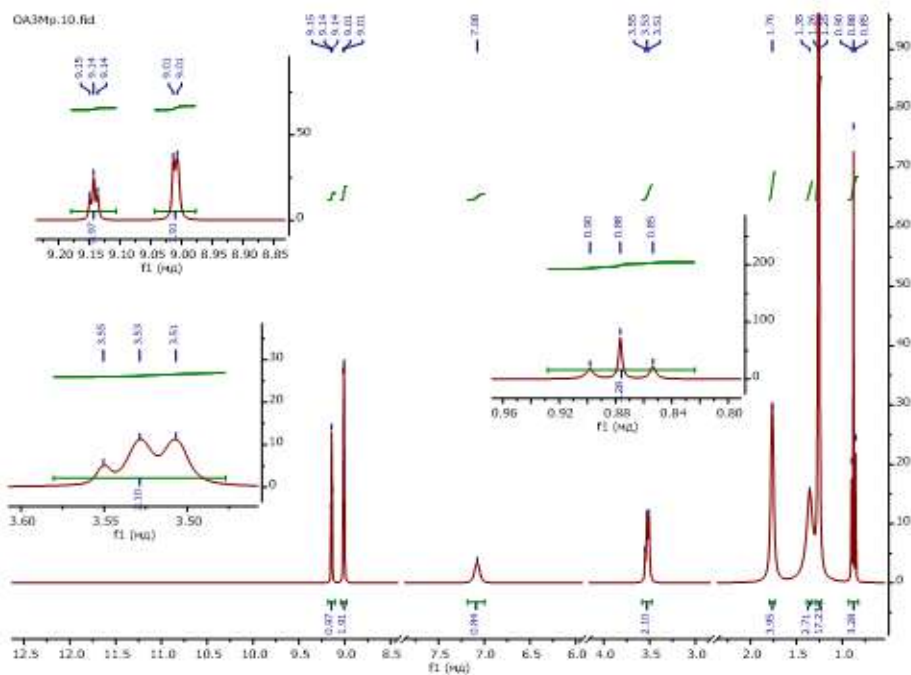
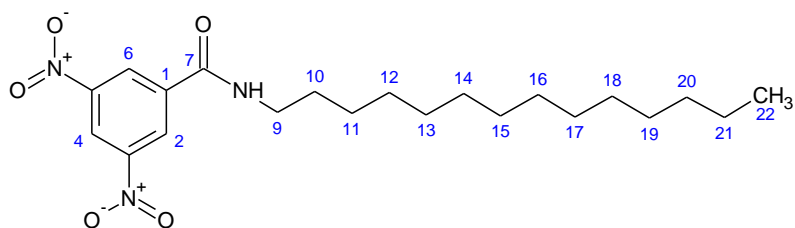


Figura 130 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 7f

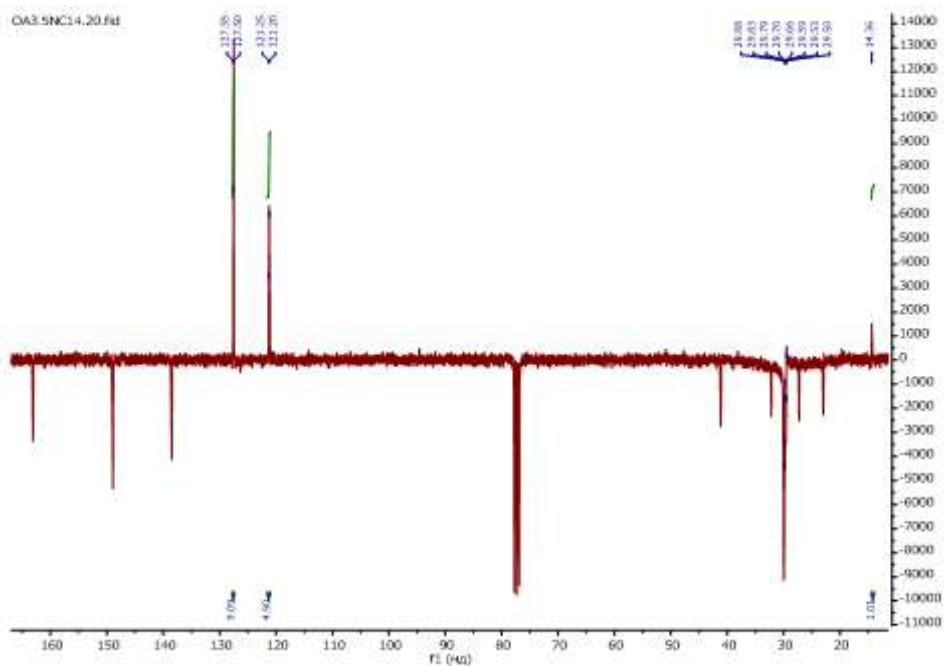


Figura 131 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 7f

27. N-hexadecil-3,5-dinitrobenzamida (7g)

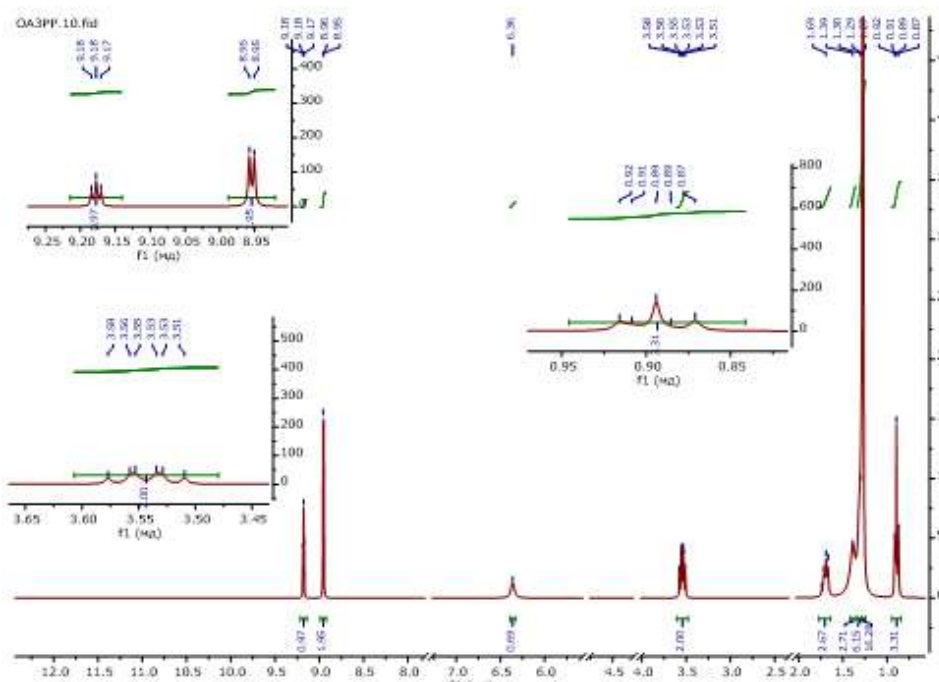
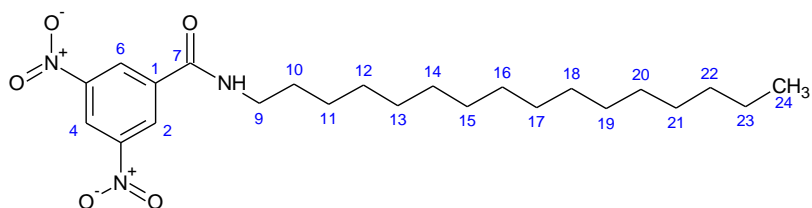


Figura 132 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 7g

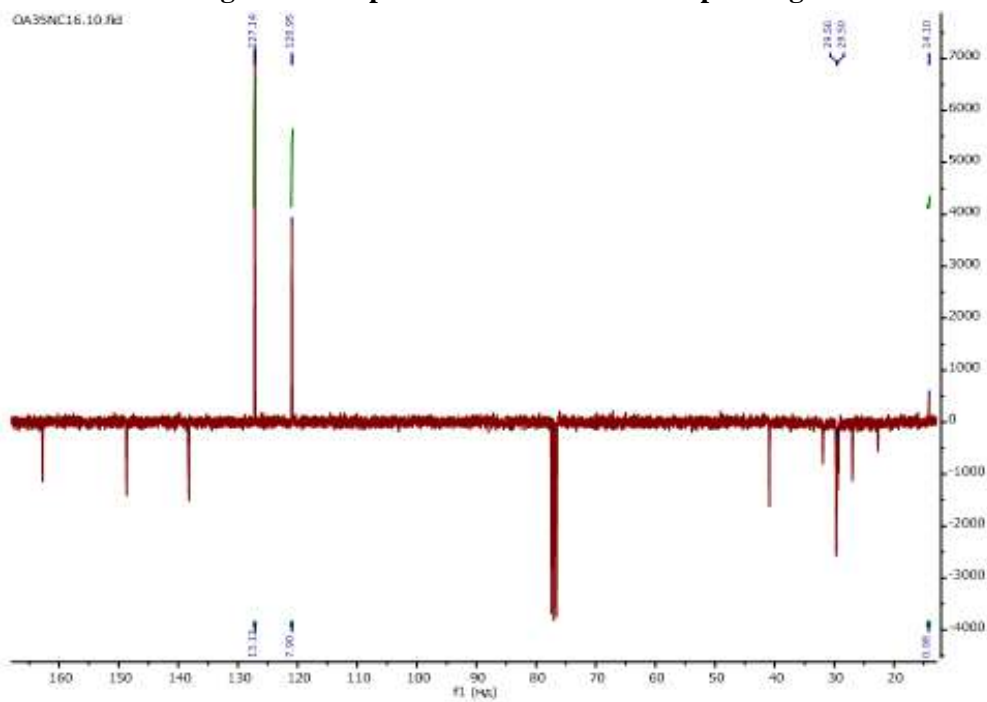


Figura 133 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 7g



29. N-hexil-3-nitro-5-(trifluorometil)-benzamida (8b)

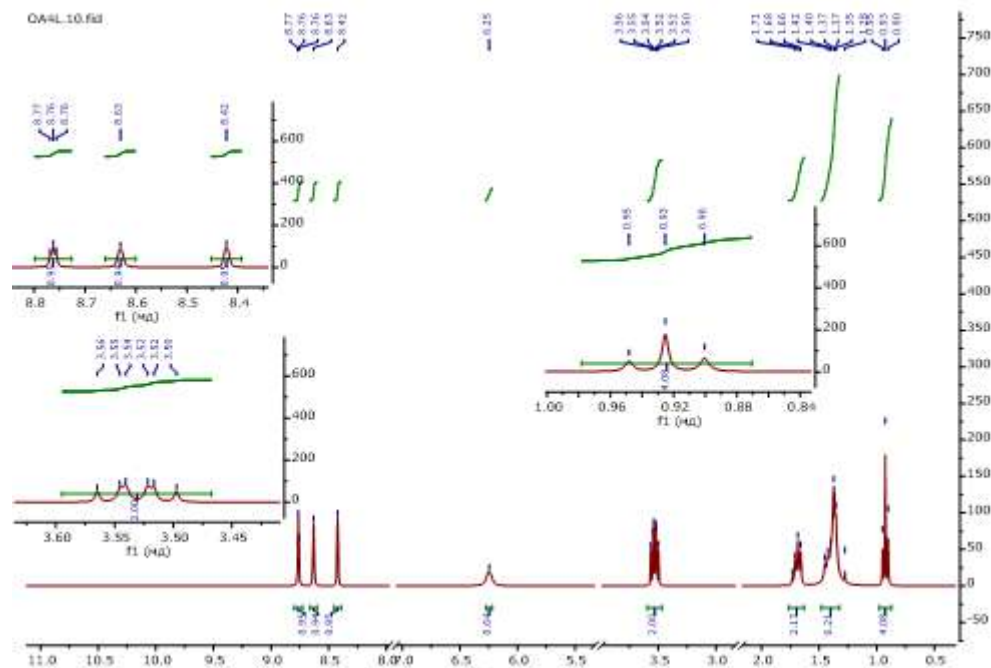
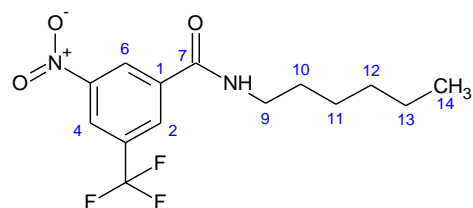


Figura 136 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 8b

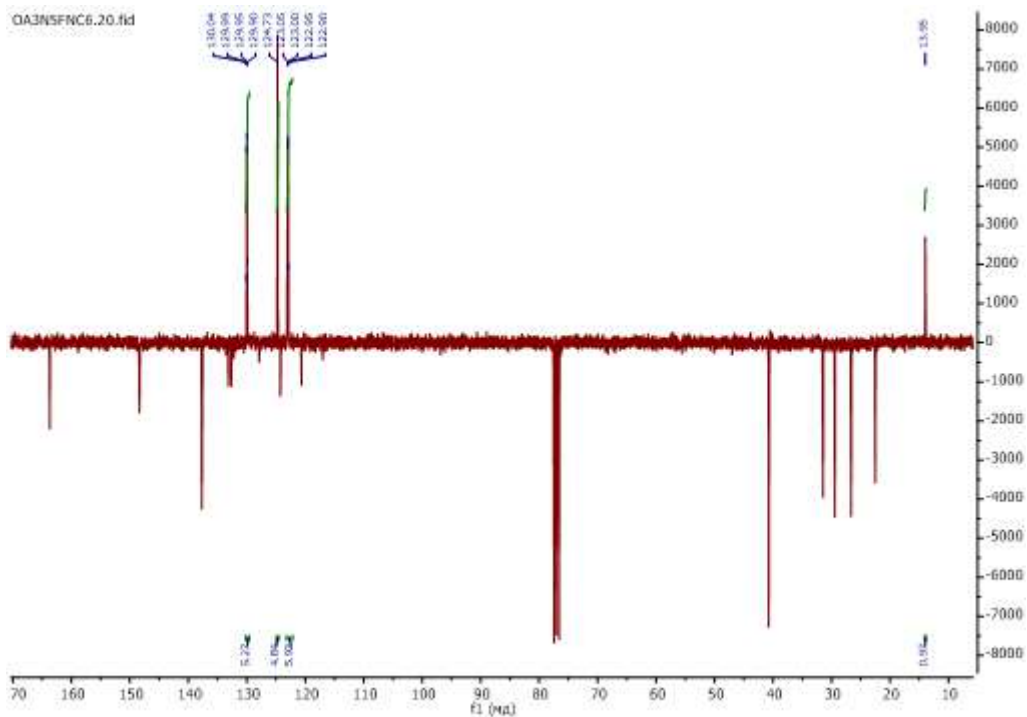


Figura 137 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 8b



31. N-decyl-3-nitro-5-(trifluorometil)-benzamida (8d)

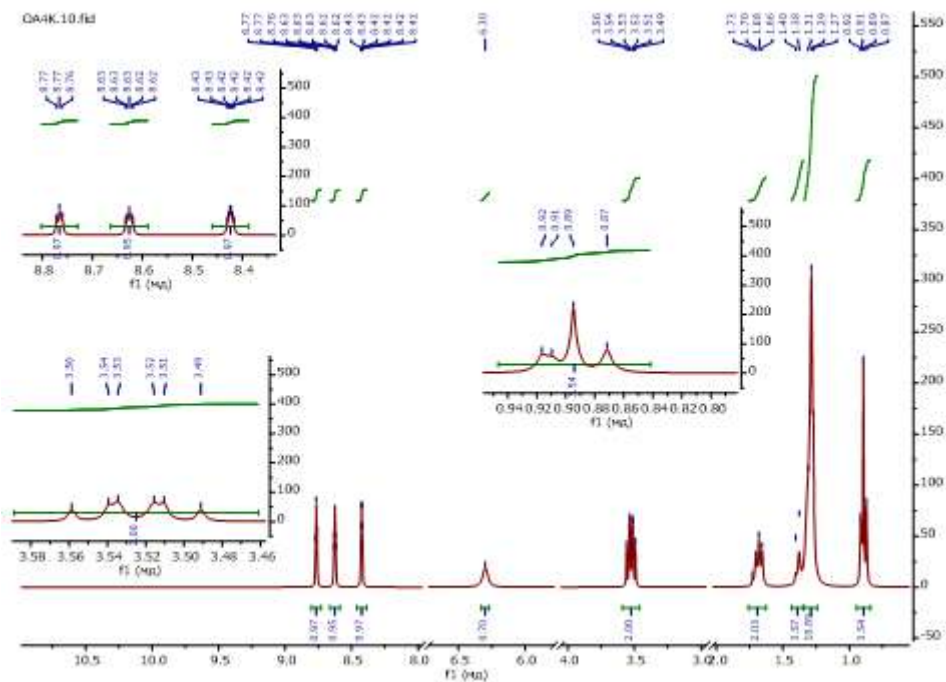
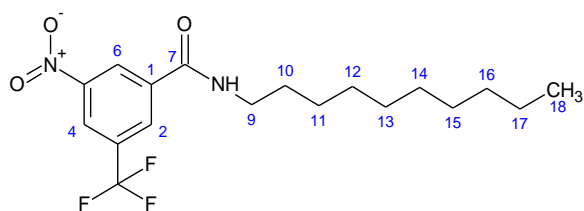


Figura 140 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 8d

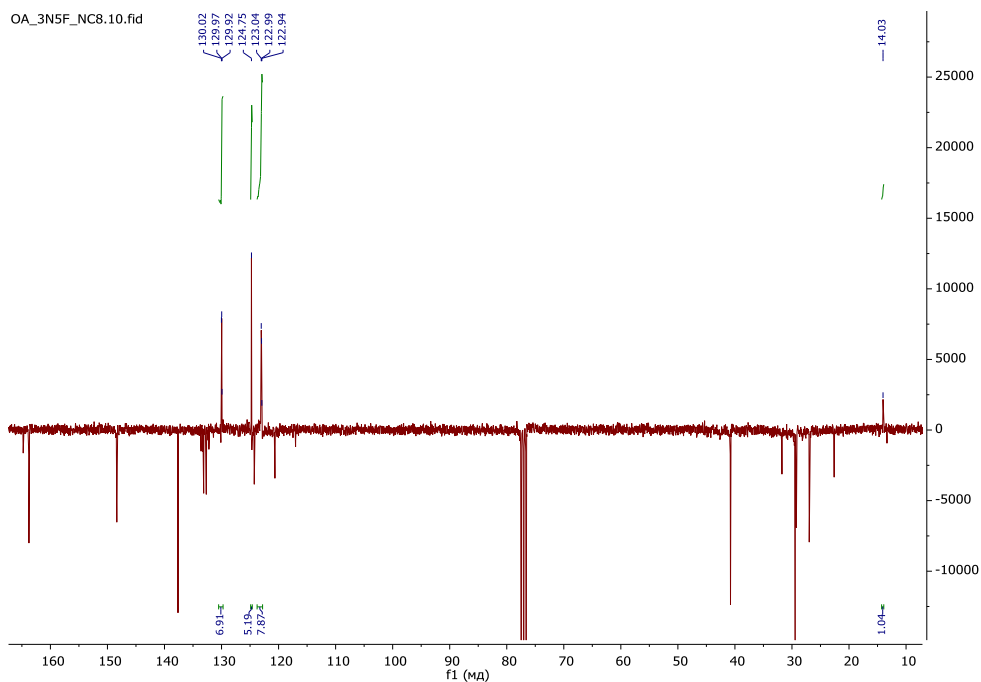


Figura 141 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 8d

32. N-dodecyl-3-nitro-5-(trifluorometil)-benzamida (8e)

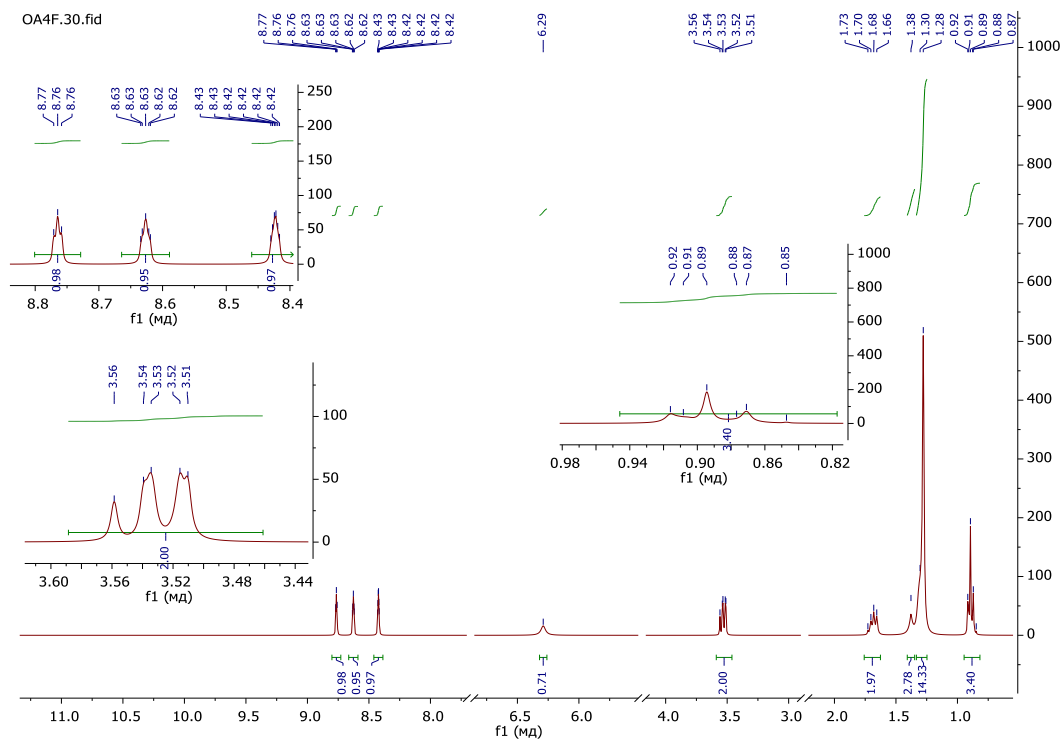
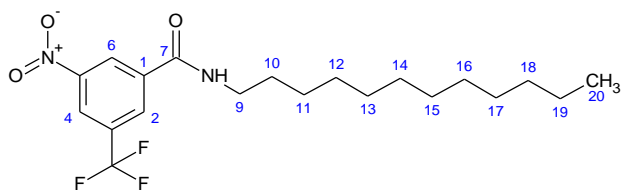


Figura 142 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 8e

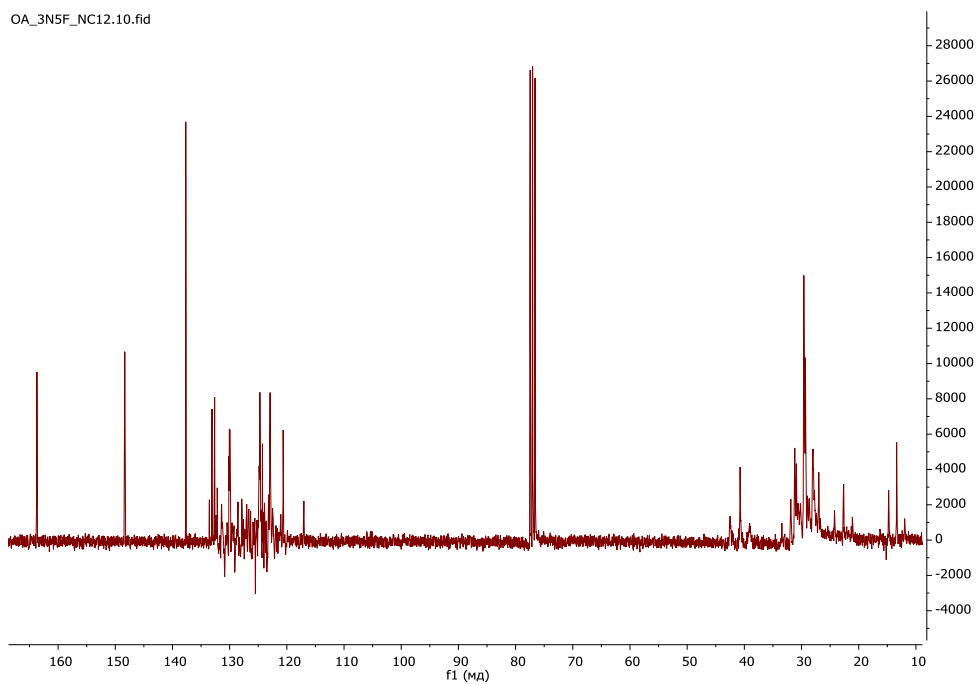


Figura 143 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 8e

### 33. Tiobenzoato de butilo (9a)

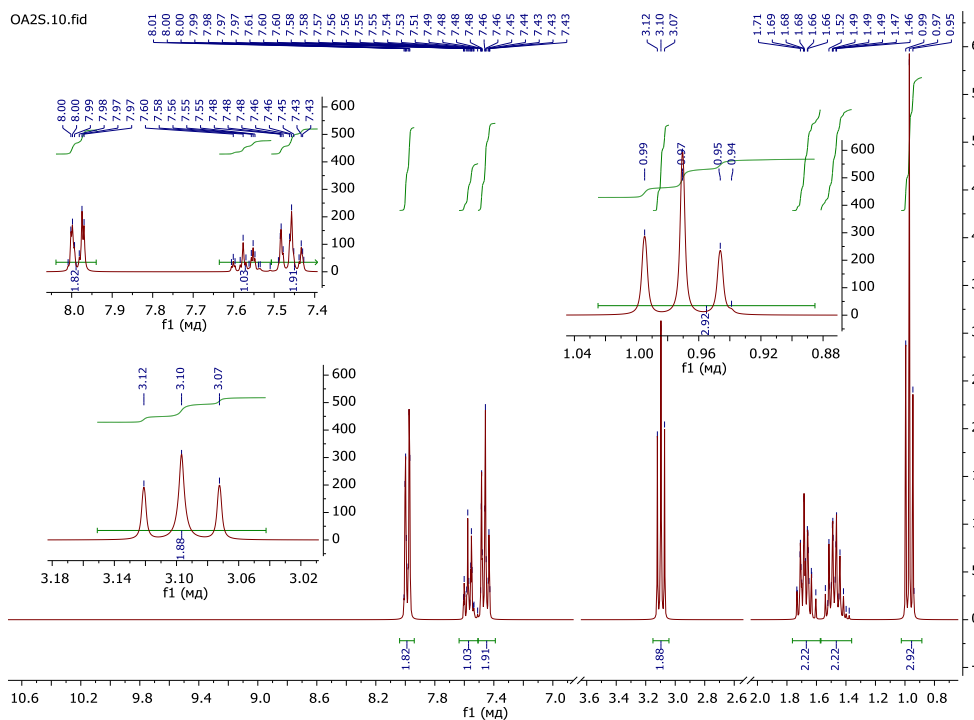
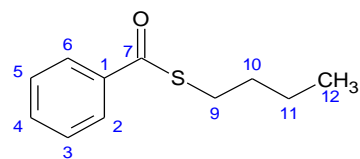


Figura 144 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 9a

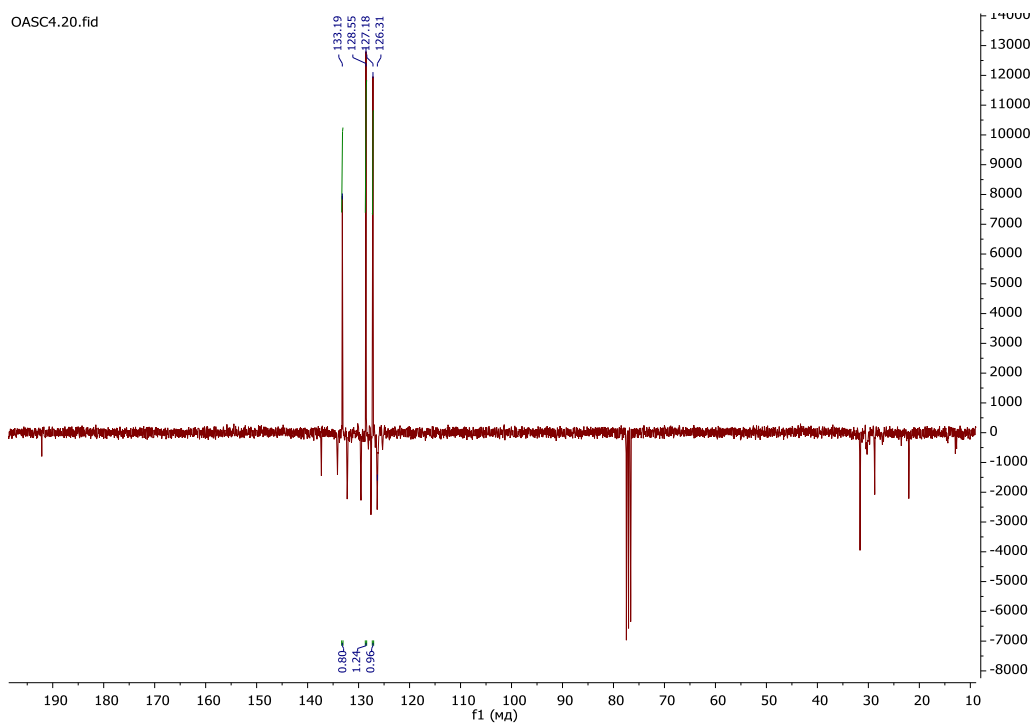


Figura 145 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 9a

34. 4-nitro-tiobenzoato de butilo (10a)

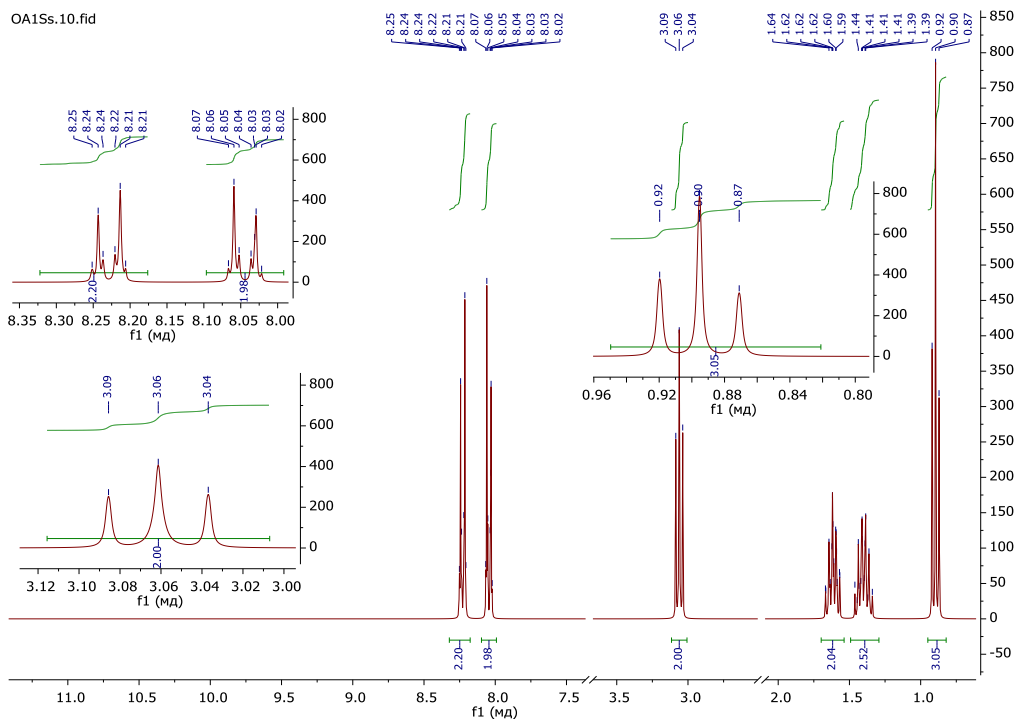
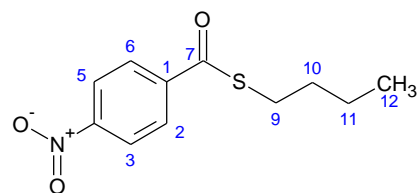


Figura 146 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 10a

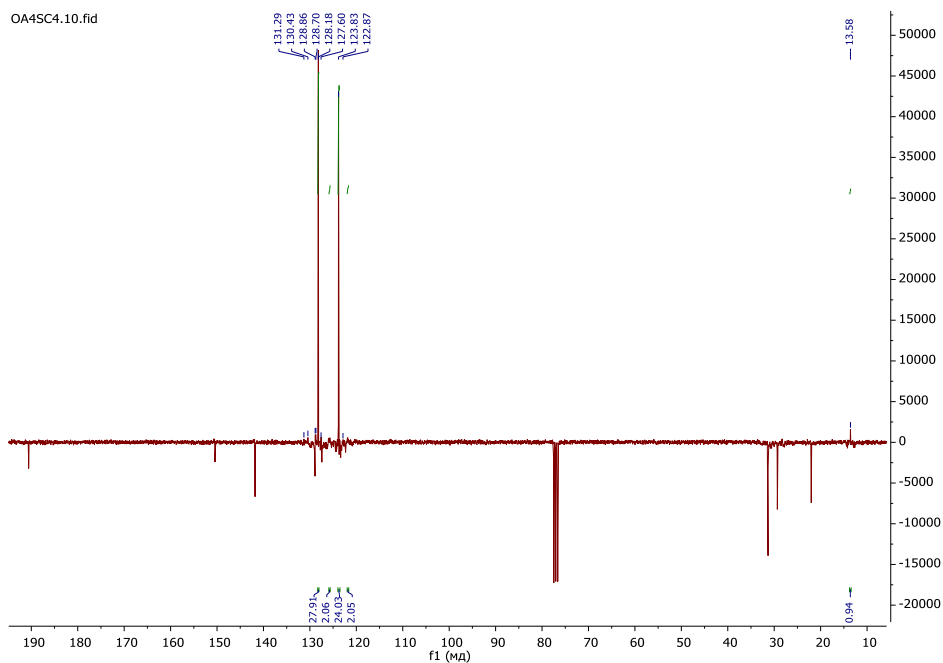


Figura 147 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 10a

35. 4-nitro-tiobenzoato de octilo (10c)

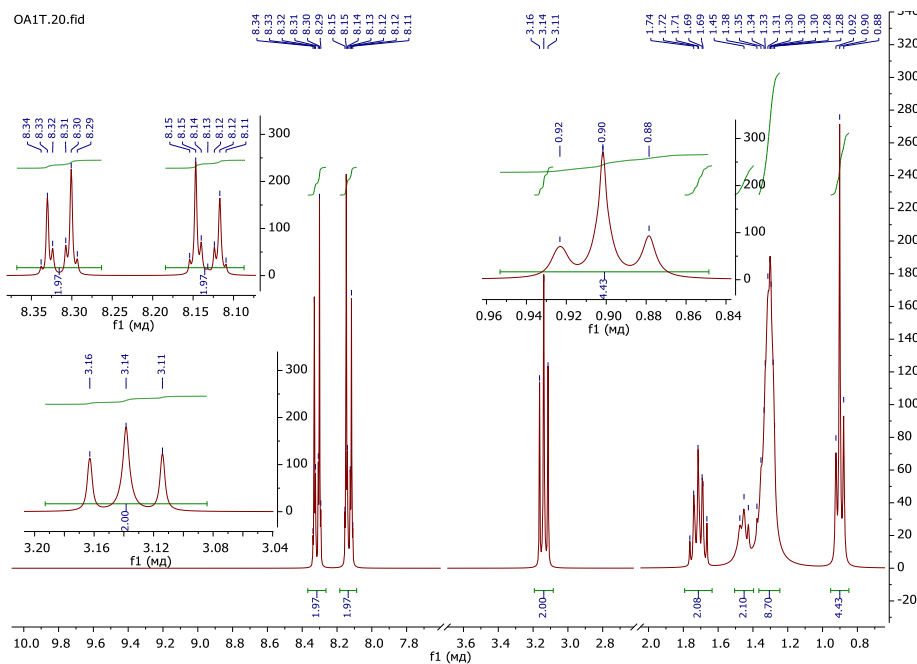
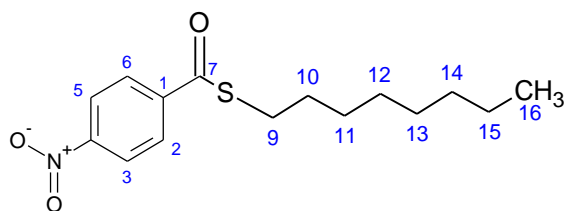


Figura 148 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 10c

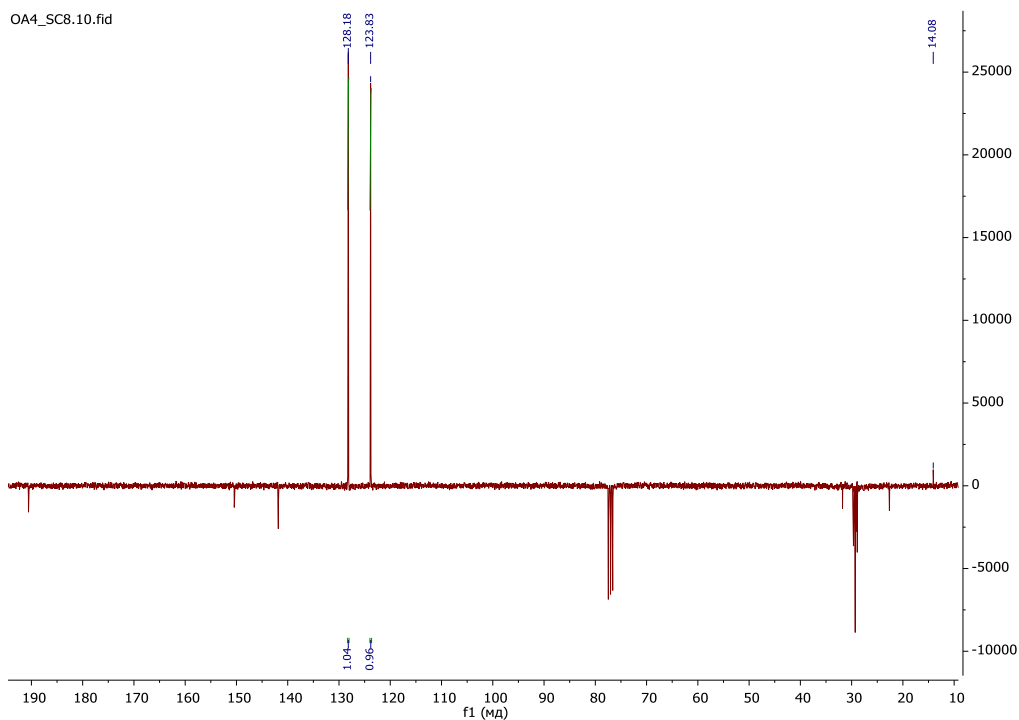


Figura 149 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 10c

36. 3,5-dinitro-tiobenzoato de butilo (11a)

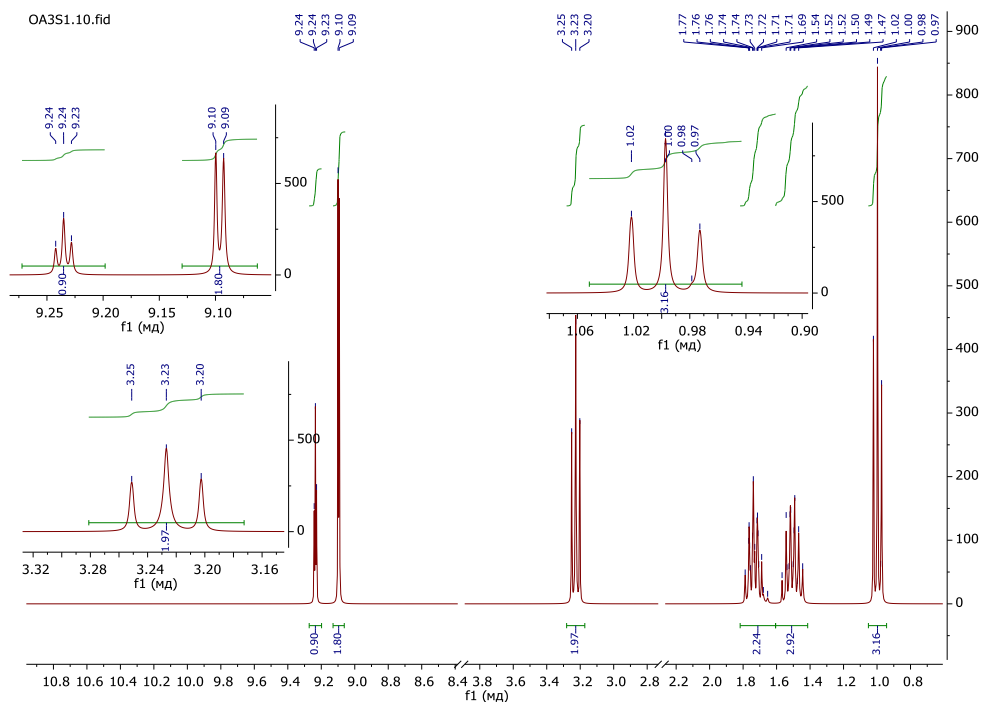
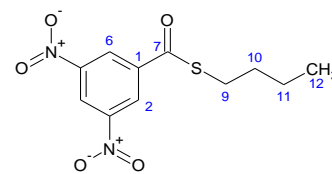


Figura 150 Espectro de <sup>1</sup>H RMN do composto 11a

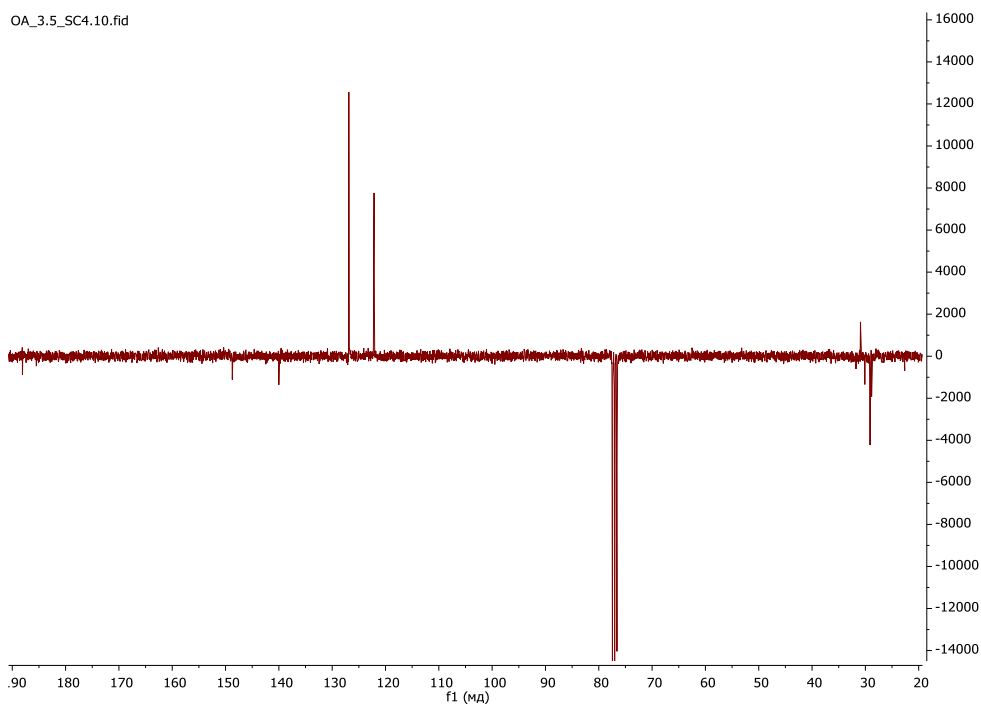


Figura 151 Espectro de <sup>13</sup>C RMN do composto 11a

### 37. 3,5-dinitro-tiobenzoato de octilo (11b)

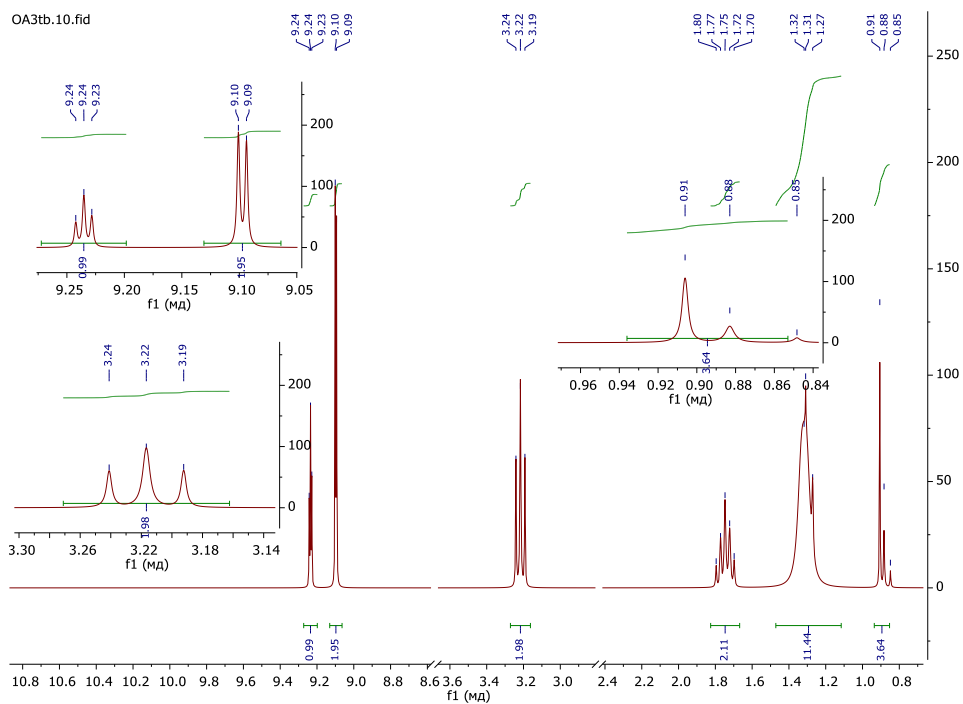
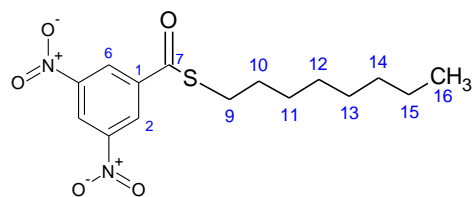


Figura 152 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do composto 11b

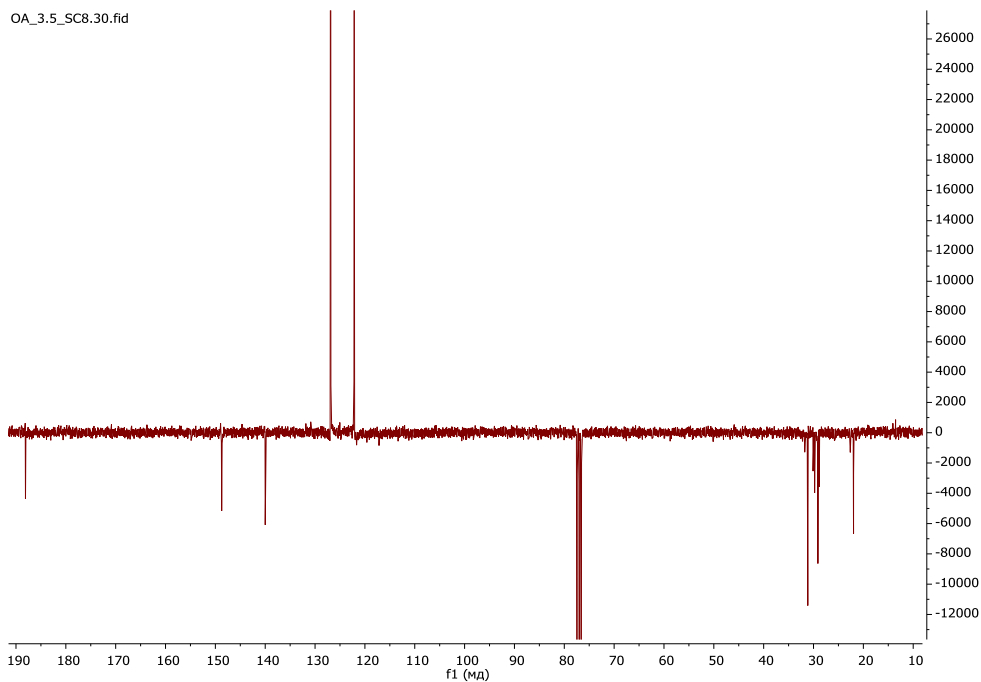


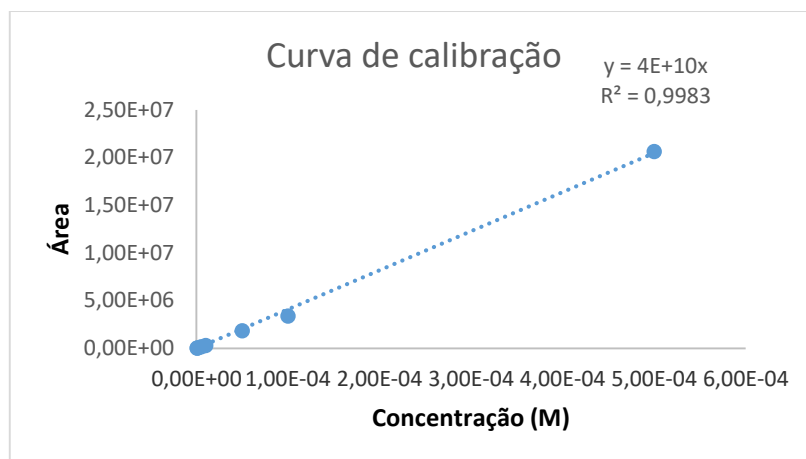
Figura 153 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto 11b.

#### **A4. Curvas de Calibração em HPLC**

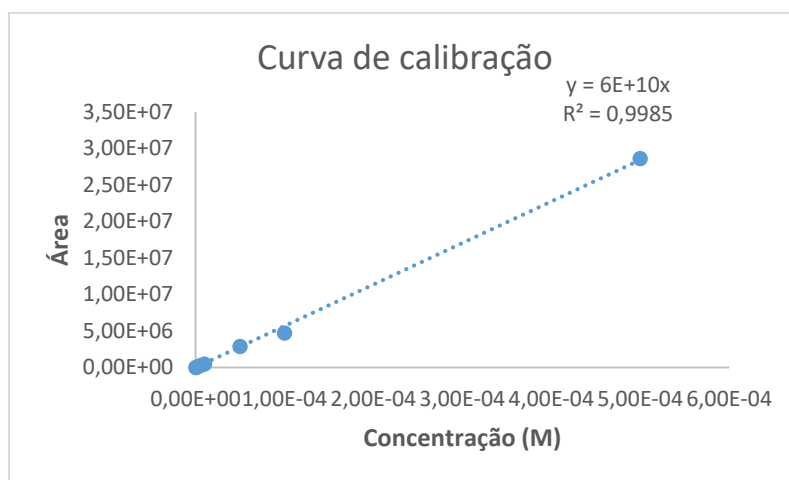
Para quantificar as concentrações de éster e ácido, as curvas de calibração de concentração foram determinadas usando sete soluções padrão com concentrações  $5 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M e  $5 \times 10^{-4}$  M (Tabela 29). Em Figura 154 e em Figura 155 estão representadas os exemplos das curvas de calibração do éster e da amida derivados de ácido 4-nitrobenzóico com 8 carbonos na cadeia alquílica.

**Tabela 29** Curvas de Calibração obtidas através da análise por HPLC das soluções com concentrações  $5 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M e  $5 \times 10^{-4}$  M.

| ésteres | X                                    | R                               | Curva de Calibração/m | Coefficiente de Correlação/ $R^2$ | amidas | X                                    | R                               | Curva de Calibração/m | Coefficiente de Correlação/ $R^2$ | ésteres | X                                    | R                               | Curva de Calibração/m | Coefficiente de Correlação/ $R^2$ |
|---------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|--------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|---------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
|         | H                                    | H                               | $y = 6,23E+10x$       | 0,9977                            |        | H                                    |                                 |                       |                                   |         | H                                    |                                 |                       |                                   |
| 1a      |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | $y = 6,01E+10x$       | 0,9987                            | 5a     |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | $y = 3,91E+10x$       | 0,9988                            | 9a      |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | $y = 7,4E+10x$        | 0,9996                            |
| 1b      |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | $y = 6,26E+10x$       | 0,9994                            | 5b     |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | $y = 6,42E+10x$       | 0,9989                            |         |                                      |                                 |                       |                                   |
| 1c      |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | $y = 6,13E+10x$       | 0,9998                            | 5c     |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | $y = 4,66E+10x$       | 1                                 | 9c      |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | $y = 6,96E+10x$       | 0,9975                            |
| 1e      |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | $y = 4,74E+10x$       | 1                                 | 5e     |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | $y = 4,63E+10x$       | 0,9973                            | 9e      |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | $y = 6,06E+10x$       | 0,9961                            |
| B       | 4-NO <sub>2</sub>                    | H                               | $y = 7,3E+10x$        | 0,9995                            |        | 4-NO <sub>2</sub>                    |                                 |                       |                                   |         | 4-NO <sub>2</sub>                    |                                 |                       |                                   |
| 2a      |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | $y = 6,58E+10x$       | 1                                 | 6a     |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | $y = 4,43E+10x$       | 0,9998                            | 10a     |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | $y = 5,6E+10x$        | 0,9992                            |
| 2b      |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | $y = 7,52E+10x$       | 1                                 | 6b     |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | $y = 6,23E+10x$       | 0,9994                            |         |                                      |                                 |                       |                                   |
| 2c      |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | $y = 7,36E+10x$       | 0,9999                            | 6c     |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | $y = 5,22E+10x$       | 1                                 | 10c     |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | $y = 7,46E+10x$       | 0,9998                            |
| 2e      |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | $y = 6,2E+10x$        | 0,9993                            | 6e     |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | $y = 1,89E+10x$       | 0,9992                            |         |                                      |                                 |                       |                                   |
|         | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 | H                               | $y = 1,12E+11x$       | 0,9996                            |        | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 |                                 |                       |                                   |         | 3,5-dNO <sub>2</sub>                 |                                 |                       |                                   |
| 3a      |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | $y = 8,6E+10x$        | 0,9998                            | 7a     |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | $y = 9,99E+10x$       | 0,9972                            | 11a     |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | $y = 1,27E+11x$       | 0,9996                            |
| 3b      |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | $y = 1,01E+11x$       | 0,9999                            | 7b     |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | $y = 1,06E+11x$       | 0,9964                            |         |                                      |                                 |                       |                                   |
| 3c      |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | $y = 1,05E+11x$       | 0,9997                            | 7c     |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | $y = 8,95E+10x$       | 0,9998                            | 11c     |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | $y = 1,39E+11x$       | 0,9997                            |
| 3d      |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | $y = 6,55E+10x$       | 0,9996                            | 7d     |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | $y = 1,04E+11x$       | 0,9997                            |         |                                      |                                 |                       |                                   |
| 3e      |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | $y = 2,61E+10x$       | 0,9983                            | 7e     |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | $y = 1,04E+11x$       | 0,9983                            | 11e     |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | $y = 1,44E+11x$       | 0,9998                            |
| 3f      |                                      | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> | $y = 9E+10x$          | 0,9997                            | 7f     |                                      | C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> | $y = 4,75E+10x$       | 0,9993                            |         |                                      |                                 |                       |                                   |
| 3g      |                                      | C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> | $y = 6,39E+10x$       | 0,9982                            | 7g     |                                      | C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> | $y = 1,25E+11x$       | 0,9974                            |         |                                      |                                 |                       |                                   |
|         | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> | H                               | $y = 2,91E+10x$       | 0,9997                            |        | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> |                                 |                       |                                   |         | 3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> |                                 |                       |                                   |
| 4a      |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | $y = 1,07E+11x$       | 0,9333                            | 8a     |                                      | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>   | $y = 4,38E+10x$       | 0,9996                            |         |                                      |                                 |                       |                                   |
| 4b      |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | $y = 6,11E+10x$       | 0,9993                            | 8b     |                                      | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>  | $y = 5,09E+10x$       | 0,9999                            |         |                                      |                                 |                       |                                   |
| 4c      |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | $y = 6,09E+10x$       | 0,9999                            | 8c     |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | $y = 5,57E+10x$       | 0,9999                            | 12c     |                                      | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | $y = 1,06E+11x$       | 0,9998                            |
| 4d      |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | $y = 5,3E+10x$        | 0,9974                            | 8d     |                                      | C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> | $y = 4,97E+10x$       | 0,9987                            |         |                                      |                                 |                       |                                   |
| 4e      |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | $y = 3,65E+10x$       | 0,9997                            | 8e     |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | $y = 6,57E+10x$       | 0,9994                            | 12e     |                                      | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | $y = 1,11E+11x$       | 1                                 |



**Figura 154** Representação gráfica da curva de calibração do composto 2c, usada na determinação da concentração do éster correspondente.



**Figura 155** Representação gráfica da curva de calibração do composto 6c, usada na determinação da concentração da amida correspondente.

## **A5. Cálculo da degradação dos ésteres/amidas nos ensaios de estabilidade química e enzimática**

Dado que se observou que a conversão de éster/amida com cadeias longas (C8-C16) no ácido não é quantitativamente equivalente, o que pode ser relacionado com a alta lipofilia e formação de precipitações, todos os cálculos foram realizados pela formação de ácido o qual foi invertido usado o controle como a concentração inicial.

$$CC_{tx} = C_{controle} - CA_{tx}, \text{ onde}$$

$CC_{tx}$  – A concentração de composto em tempo x

$CA_{tx}$  - A concentração de ácido em tempo x

$C_{controle}$  – A concentração media de controle

A fórmula utilizada para calcular a percentagem de degradação dos ésteres/amidas ao longo do tempo de ensaio está representada de seguida.

$$\text{Degradação do éster (\%)} = \frac{n_f \text{ ácido}}{n_i \text{ éster}} \times 100$$

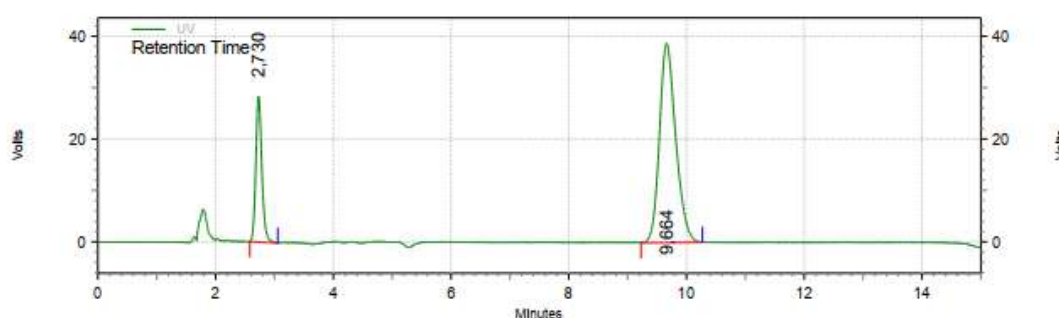
## A6. Cromatogramas em HPLC

Um exemplo de um cromatograma obtido na hidrólise química do composto 3.5-dinitrobenzoato de butilo, **3a**, após 24h de reação encontram-se na Figura 156. Os tempos de retenção do ácido e do éster encontram-se na Tabela 30.

Page 1 of 1

### Area % Report

Data File: C:\Documents and Settings\hplc\Desktop\Oiga\Estabilidade\3.5\_ABOC4\PBS\3.5\_OC4\_1\_24h  
 Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\3.5\_ABOC4.met  
 Acquired: 26-03-2021 1:19:44  
 Printed: 26-03-2021 17:14:37



| UV Results     |         |        |        |          |
|----------------|---------|--------|--------|----------|
| Retention Time | Area    | Area % | Height | Height % |
| 2,730          | 811034  | 21,43  | 113428 | 42,24    |
| 9,664          | 2974072 | 78,57  | 155095 | 57,76    |
| Totals         | 3785106 | 100,00 | 268523 | 100,00   |

**Figura 156** Cromatograma do composto 3.5-dinitrobenzoato de butilo, **3a**, após 24h de reação de hidrólise química

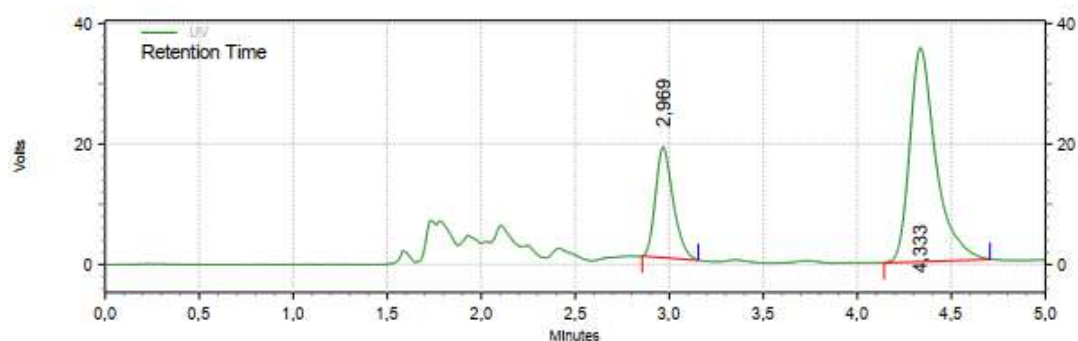
**Tabela 30** Tempos de retenção do éster, **2c**, e do ácido 4-nitrobenzóico.

| Composto  | R                             | Tempo de Retenção |
|-----------|-------------------------------|-------------------|
| <b>3a</b> | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> | 9.664             |
| <b>C</b>  | H                             | 2.730             |

Um exemplo de um cromatograma obtido na hidrólise enzimática do composto N-butil-4-nitrobenzamida, **6a**, após 54h de reação encontram-se na Figura 157. Os tempos de retenção do ácido e da amida encontram-se na Tabela 31.

## Area % Report

Data File: C:\Documents and  
 Settings\hplc\Desktop\Oiga\Estabilidade\4\_ABNC4\Plasma\4\_NC4\_3\_54h  
 Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\3.5\_ABOC4.met  
 Acquired: 06-04-2021 18:06:22  
 Printed: 06-04-2021 18:48:19



## UV Results

| Retention Time | Area    | Area % | Height | Height % |
|----------------|---------|--------|--------|----------|
| 2,969          | 480751  | 25,92  | 73687  | 34,13    |
| 4,333          | 1373799 | 74,08  | 142217 | 65,87    |
| Totals         | 1854550 | 100,00 | 215904 | 100,00   |

Figura 157 Cromatograma do composto N-butil-4-nitrobenzamida, 6a, após 54h de reação de hidrólise enzimática

Tabela 31 Tempos de retenção da amida, 6a, e do ácido 4-nitrobenzóico.

| Composto | R     | Tempo de Retenção |
|----------|-------|-------------------|
| 6a       | C8H17 | 4.333             |
| B        | H     | 2.969             |

## A7. Atividade antimicrobiana intracelular de compostos testados contra *M. bovis* BCG infectando macrófagos humanos THP-1

Para avaliar a sua capacidade atuar dentro de célula hospedeiro foram avaliados atividade em macrófago humanos THP-1 infectados pelo *M. bovis* BCG. Foram avaliados três ésteres (3,5-dinitrobenzoato de hexilo (**3b**), 3,5-dinitrobenzoato de decacilo (**3d**), 3,5-dinitrobenzoato de tetradecilo (**3f**) e três amidas (N-hexil-3,5-dinitrobenzamida (**7b**), N-decail-3,5-dinitrobenzamida (**7d**), N-tetradecilo-3,5-dinitrobenzamida (**7f**) derivados de ácido 3,5-dinitrobenzóico. Como um controle negativo foi usado DMSO e como um controle positivo foi usado isoniazida (INH).

Foi avaliado o número de bactérias viáveis numa amostra em cada momento de tempo (0, 1, 3 e 7 dia).

**Tabela 32 Atividade antimicrobiana intracelular de compostos testados contra *Mycobacterium bovis* BCG infectando macrófagos humanos THP-1. Os resultados apresentados em CFU.**

|   | cfu x10 <sup>4</sup> | compostos (na concentração 2 µg/ml): |      |       |       |      |       | 0.1 µg/ml |
|---|----------------------|--------------------------------------|------|-------|-------|------|-------|-----------|
|   | DMSO                 | 7b                                   | 7d   | 7f    | 3b    | 3d   | 3f    | INH       |
| 0 | 9,2                  | 9,2                                  | 9,2  | 9,2   | 9,2   | 9,2  | 9,2   | 9,2       |
| 1 | 15,33                | 4,58                                 | 7,33 | 14,16 | 14,58 | 12,5 | 12,16 | 9,91      |
| 3 | 10,75                | 0,40                                 | 0,32 | 10,08 | 11,87 | 12,5 | 13,66 | 1,33      |
| 7 | 11,91                | 0,05                                 | 0,03 | 13,91 | 9,83  | 8,5  | 7,25  | 0,24      |