

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Estudo de ésteres de derivados do ácido benzóico com álcoois
de cadeia longa como pró-fármacos destinados ao tratamento
da tuberculose**

Raquel Maria Simões Freire

Mestrado em Química
Especialização em Química

Dissertação orientada por:
Professor Doutor Luís Filipe Vicente Constantino
Professora Doutora Maria Teresa Troina Pamplona Berry

Agradecimentos

Durante a realização desta dissertação existiram vários intervenientes importantes para que esta se procedesse da melhor forma, pelo que expresso os seguintes agradecimentos:

Ao professor Luís Constantino por me aceitar neste projeto, pela sua orientação neste trabalho, apoio científico e pelas oportunidades que contribuíram para enriquecer o meu percurso académico e científico. Assim como na aceitação e inserção no grupo de investigação iMed na FFUL.

À professora Teresa Pamplona, enquanto minha orientadora da FCUL, pela sua disponibilidade e pelo esclarecimento de todas as dúvidas na realização deste trabalho.

Gostaria também de agradecer à professora Ana Paula Francisco pela sua orientação e apoio no laboratório e pelo esclarecimento de todas as minhas dúvidas no decorrer deste trabalho.

Ao Doutor David Pires do grupo de investigação *Host-Pathogen Interaction* por realizar os estudos de atividade e citotoxicidade no laboratório da doutora Elsa Anes da FFUL e fornecer os resultados assim como pela disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas.

Um grande agradecimento ao Doutor João Pais pela sua orientação e apoio científico em laboratório desde o primeiro dia que tomou conhecimento deste trabalho, que foram cruciais para a realização do mesmo bem como na escrita da dissertação, pelo acompanhamento, conselhos e ensinamentos científicos.

Um especial agradecimento às minhas colegas e amigas Sofia Serra, Raquel Mestre e Margarida Policarpo pelas conversas de incentivo, apoio, motivação, entreajuda e pelas risadas, que em dias menos bons tornaram-nos melhores; aos colegas Rúben Coutinho e Elisabete Freitas pela companhia durante a realização do trabalho em HPLC e aos restantes colegas do laboratório 104 e do grupo iMed que de algum modo contribuíram para a minha aprendizagem neste trabalho.

Também aos meus amigos que conheci durante a minha formação académica ao longo dos anos e aos de longa data: Miguel Barros, Margarida Martins, Filipa Rodrigues, Rita Sales, Mariana Oliveira, Margarida Pereira, Inês Vale, Tiago Monteiro, Luís Policarpo, Catarina António, Inês Marques, Carolina Carvalho, Andreia Pereira, Catarina Pedro, Filipa Falcato e Diana Julião, Cátia Gomes, Cristiana Domingues e Liliana Caetano agradeço pelas palavras afetuosas em momentos menos fáceis, conselhos, apoio e força incondicional ao longo destes anos.

Por último, e muito importantes, aos pais e avós, que sempre me acompanharam, pelo carinho e inspiração e à restante família pelo apoio.

Resumo

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MT). Em 2018, um total de 1,5 milhões de pessoas morreram com TB, constituindo uma das 10 principais causas de morte no mundo. Com o aparecimento da resistência aos fármacos de primeira linha contra a TB, como pirazinamida, isoniazida, rifampicina e etambutol, foi urgente a descoberta de novos agentes antimicobacterianos para combater estirpes MT resistentes. Uma abordagem interessante é o uso de pró-fármacos que demonstraram maior atividade biológica e que têm capacidade de ultrapassar dificuldades como a passagem pelas membranas celulares e a baixa absorção dos fármacos.

Estudos realizados previamente mostraram que ácidos fracos tinham atividade antimicobacteriana significativa, que aumentava a pH ácido. Uma vez que os ácidos fracos apresentam, regra geral, dificuldades de absorção e uma forte ligação às proteínas plasmáticas, uma alternativa viável será o uso de ésteres de modo a superar as más propriedades farmacocinéticas dos ácidos. No entanto, para serem eficazes, devem ser resistentes à hidrólise no plasma humano e ativados dentro da micobactéria.

Neste trabalho, foram sintetizados pró-fármacos ésteres de ácido benzóico (BA) com diferentes grupos eletroatratores, tais como 4-nitro (série 1), 3,5-dinitro (série 2), 4-(trifluorometilo) (série 3), 3,5-di(trifluorometilo) (série 4) e 2,3,4,5,6-pentafluoro (série 5). Ademais, utilizaram-se vários álcoois (propanol a tetradecanol) para se introduzirem grupos alquilo com diferentes comprimentos com a finalidade de modularem a absorção e resistência às esterases (Figura 0.1).

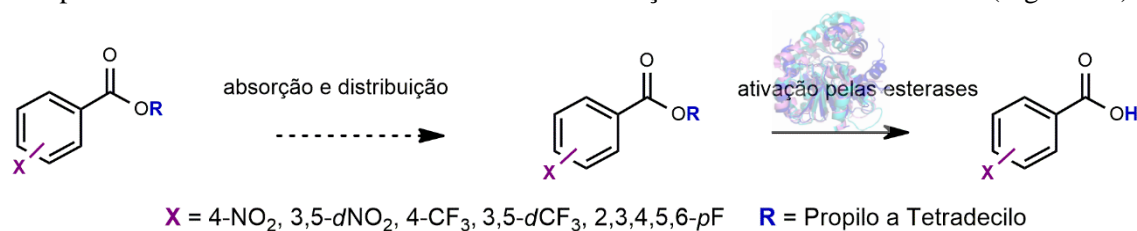


Figura 0.1. Modo de ação dos ésteres propostos dos ácidos fracos. Depois de absorvidos pelas células de *M. tuberculosis*, os pró-fármacos são clivados pelas esterases micobacterianas, libertando o ácido livre.

A estabilidade química e enzimática dos ésteres das séries 1 e 2 foi avaliada em tampão fosfato pH 7,4 a 37°C e em plasma humano pela ativação das esterases (Figura 0.1). Posteriormente, estudou-se a atividade dos ésteres e ácidos derivados de BA contra *M. tuberculosis* H37Rv e determinaram-se as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as concentrações bactericidas mínimas (CBM). Por último, avaliou-se a citotoxicidade dos ésteres e dos ácidos procedendo à sua incubação em macrófagos THP-1 e determinaram-se as concentrações letais (CL₅₀).

Os ésteres foram sintetizados por diferentes métodos - A1, A2, A3 e B, tendo a síntese das séries 1 e 2 sido realizada com maior sucesso do que a das séries 3 a 5. Os rendimentos da síntese dos ésteres variaram entre 4 e 89%. Nos estudos de estabilidade, a componente hidrolítica química foi desprezada no estudo da estabilidade enzimática, uma vez que as percentagens de degradação de éster na hidrólise química foram muito reduzidas face às percentagens de degradação de éster na hidrólise enzimática. Ademais, concluiu-se que os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo foram mais estáveis na hidrólise enzimática que os 4-nitrobenzoatos de alquilo e menos estáveis na hidrólise química. Em relação à atividade antimicobacteriana, os ésteres de cadeia longa foram mais ativos que os respetivos ácidos; os ésteres com grupos nitro foram mais ativos que os ésteres fluorados e os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo foram os mais eficazes na eliminação de *M. tuberculosis* H37Rv. Relativamente à atividade bactericida, os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo **2g** (C9) a **2j** (C12) demonstraram ser possíveis fármacos antimicobacterianos bactericidas. Através da análise

das relações estrutura-estabilidade/atividade, concluiu-se que a estabilidade dos ésteres aumentava com o aumento da lipofilia/comprimento do grupo alquilo e o efeito estereoquímico do grupo alquilo e a atividade aumentava com os substituintes nitro. Por último, o estudo da citotoxicidade dos derivados de BA em macrófagos demonstrou que os ésteres não foram tóxicos. Concluindo, oito 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo **2e** (C7) a **2l** (C14) e quatro 4-nitrobenzoatos de alquilo **1g** (C9) a **1i** (C11) e **1k** (C13) foram estáveis em plasma humano, ativos (maior atividade que os respectivos ácidos) e não tóxicos, pelo que estes ésteres mostraram ser possíveis candidatos a pró-fármacos antituberculosos.

Palavras-Chave: Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, Pró-fármacos Ésteres, Derivados de Ácido Benzoico, Esterases

Abstract

Tuberculosis (TB) is a disease caused by a *Mycobacterium tuberculosis* (MT). In 2018, a total of 1.5 million people died from TB and this disease is still one of the top 10 causes of death in the world. The emergence of resistance against the first line of TB drugs, such as pyrazinamide, isoniazid, rifampicin and ethambutol, has prompted the need of new antimycobacterial agents to combat TB drugs-resistant strains. One interesting approach is the use of prodrugs, that have often shown improved biological activities, being able to overcome poor absorption of drugs and difficulty crossing cell membranes.

Previous studies demonstrated that weak acids have a significant antimycobacterial activity, which increases acidic pH. Weak acids have difficulties in absorption and a strong binding to plasma proteins, so a viable alternative to overcome the bad pharmacokinetic properties of acids could be the use of esters. However, in order to increase efficiency, they must be resistant to hydrolysis in human plasma and activated inside the bacteria.

In this work, esters prodrugs of derivatives of benzoic acid (BA) containing different electron withdrawing groups on the aromatic ring, such as 4-nitro (series 1), 3,5-dinitro (series 2), 4-trifluoromethyl (series 3), 3,5-di(trifluoromethyl) (series 4) and 2,3,4,5,6-pentafluoro (series 5) were synthesized. In addition, several alcohols (propanol to tetradecanol) were used to introduce alkyl groups with different lengths to modulate the absorption and resistance to esterases (Figure 0.2).

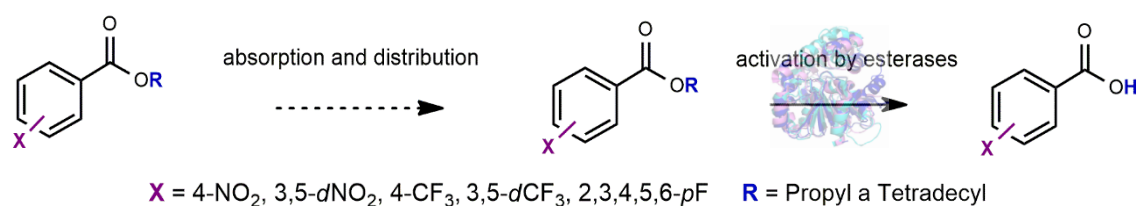


Figure 0.2. Mode of action of proposed esters of weak acids. After being absorbed by *M. tuberculosis* cells the prodrugs are cleaved by mycobacterial esterases, liberating the free acid.

The chemical and enzymatic stability of these derivatives has been studied in a phosphate buffer pH 7.4 at 37°C and in human plasma activated by esterases (Figure 0.2). After that, esters and acids derived BA activity against *M. tuberculosis* H37Rv was studied, through the quantification of minimum inhibitory concentrations (CIM) and minimum bactericidal concentrations (CBM) were determined. Finally, the cytotoxicity of esters and acids was evaluated by incubating them in THP-1 macrophages and lethal concentrations (CL₅₀) were determined.

The esters were synthesized by different methods - A1, A2, A3 and B, which the synthesis of series 1 and 2 was carried out with greater success than series 3 to 5. The yields of the ester synthesis varied between 4 and 89%. In stability studies, the hydrolytic chemical component can be neglected in the study of enzymatic stability, because the percentage of ester degradation in chemical hydrolysis was very low compared to the percentage of ester degradation in enzymatic hydrolysis. In addition, it was concluded that alkyl 3,5-dinitrobenzoates were more stable in enzymatic hydrolysis than alkyl 4-nitrobenzoates and less stable in chemical hydrolysis. Regarding the antimycobacterial activity, the long chain esters were more active than the respective acids; the esters with nitro groups were more active than the fluorinated esters and the alkyl 3,5-dinitrobenzoate were the most effective in eliminating *M. tuberculosis* H37Rv. Regarding bactericidal activity, alkyl 3,5-dinitrobenzoate **2g** (C9) to **2j** (C12) proved to be possible bactericidal antimycobacterial drugs. Through the analysis of structure-stability/activity relationships, it was observed that the stability of the esters increased with the increase of lipophilia, length and steric effect of the alkyl group and its activity increased with nitro

substituents. Finally, the study of cytotoxicity of derivatives of BA in THP-1 macrophages demonstrated that the esters were non-toxic.

Concluding, eight alkyl 3,5-dinitrobenzoate **2e** (C7) to **2l** (C14) and four alkyl 4-nitrobenzoates **1g** (C9) to **1i** (C11) and **1k** (C13) were stable in human plasma, actives (higher activity than respective acids) and non-toxic, demonstrating that these esters are viable candidates for antituberculosis prodrugs.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Ester Prodrugs, Benzoic Acid Derivatives, Esterases

Comunicações Científicas

Comunicações em Paineis:

- 1.** Freire R., Pires D., Carmo N., Pais J. P., Magalhães, M., Patrão P., Pamplona T., Anes E., Francisco A. P., Constantino L. (2019) Synthesis and Evaluation of Benzoic Acid Derivatives for the treatment of Tuberculosis. 11th iMed.ULisboa Postgraduate Students Meeting and 4th i3DU Meeting Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Lisbon (Book of Abstracts pp. 121).
- 2.** Freire R, Pires D., Carmo N., Pais J. P., Pamplona T., Anes E., Francisco A. P., Constantino L. (2019) Benzoic Acid Derivatives: Synthesis and Evaluation in Tuberculosis. Chemistry: Shaping the Future 4th Meeting of the CQUL (4ECQUL). Reitoria da Universidade de Lisboa (UL), Lisbon (Book of Abstracts pp. 128).
- 3.** Freire R, Pires D., Carmo N., Pais J. P., Pamplona T., Anes E., Francisco A. P., Constantino L. (2019) Synthesis and Evaluation of Benzoic Acid Derivatives as Prodrugs for the Treatment of Tuberculosis. Faculty of Science, University of Porto, Porto (Book of Abstracts pp.153).
- 4.** Freire R, Pires D., Carmo N., Pais J. P., Pamplona T., Anes E., Francisco A. P., Constantino L. (2020) Benzoic Acid Derivatives as Anti-TB Prodrugs: Stability and Activity against M. Tuberculosis. 2º Simpósio de Investigação em Tuberculose e Micobactérias Não Tuberculosas em Portugal. Faculdade de Farmácia Universidade de Lisboa, Lisboa.

Índice

Resumo	iv
Abstract	vi
Comunicações Científicas	viii
Índice	ix
Índice de Figuras	xii
Índice de Tabelas	xvi
Abreviaturas e Símbolos	xviii
1. Introdução Teórica	1
1.1. Tuberculose	1
1.1.1. Epidemiologia	1
1.2. Micobactéria	2
1.2.1. Diferentes Tipos de Micobactérias	2
1.2.2. Estrutura da Parede Celular de <i>M. tuberculosis</i>	3
1.3. Performance do Sistema Imunitário perante a Tuberculose	4
1.4. Prevenção da Tuberculose	5
1.5. Tratamento da Tuberculose	5
1.5.1. Fármacos de Primeira Linha e Quimioterapia da Tuberculose com Fármacos de Primeira Linha	6
1.5.2. Fármacos de Segunda Linha, Tuberculose Multirresistente (MDR-TB), Tuberculose Extensivamente Resistente (XDR-TB) e Quimioterapia com Fármacos de Segunda Linha nas Estirpes Resistentes	7
1.6. Pró-Fármacos	9
1.6.1. Ésteres como Pró-Fármacos	11
1.6.2. Hidrólise Química	11
1.6.2.1. Hidrólise Química de Ésteres	11
1.6.3. Hidrólise Enzimática	12
1.7. A Importância da Ação de Esterases em Pró-Fármacos	13
1.7.1. Esterases no Plasma Humano	15
1.7.2. Esterases <i>M. tuberculosis</i>	16
1.8. Ácidos Fracos Antimicobacterianos e Pró-Fármacos de Ácidos Fracos Antimicobacterianos	17
1.9. Objetivos do Trabalho	19
2. Resultados e Discussão dos Resultados	21
2.1. Ésteres de Ácidos Benzoicos Substituídos	21

2.2. Síntese de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos	21
2.2.1. 4-nitrobenzoatos de alquilo	22
2.2.2. 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo	23
2.2.3. 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo	24
2.2.4. 3,5-di(trifluorometil)benzoato de alquilo	24
2.2.5. 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de alquilo.....	25
2.2.6. Conclusões Gerais	25
2.2.7. Caracterização por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear...	26
2.3. Estudos de Estabilidade de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos	30
2.3.1. Estabilidade em Tampão de Fosfato.....	31
2.3.2. Estabilidade em Plasma Humano	32
2.3.3. Relação Qualitativa - Estabilidade Química/Estabilidade Enzimática	35
2.3.4. Conclusões Gerais	35
2.4. Estudos de Atividade Antimicrobacteriana de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos <i>in vitro</i>	36
2.4.1. Conclusões Gerais	39
2.5. Relações Estrutura-Estabilidade/Atividade de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos.....	40
2.5.1. Efeito da Lipofilia.....	40
2.5.2. Efeito dos Substituintes Aceitadores de Eletrões no Anel Aromático	47
2.5.3. Efeito da Acidez.....	49
2.5.4. Discussão do possível Mecanismo de Ação.....	51
2.5.5. Conclusões Gerais	52
2.6. Citotoxicidade de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos	54
3. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	59
4. Parte Experimental.....	62
4.1. Equipamento e Material	62
4.2. Reagentes e Solventes	63
4.3. Síntese de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos	63
4.3.1. Método A.....	64
4.3.1.1. Procedimento geral de preparação dos 4-nitrobenzoatos de alquilo e dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo – Método A1.....	64
4.3.2. Procedimento geral dos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo e dos 3,5-di(trifluorometil)benzoatos de alquilo - Método A2.....	69
4.3.3. Procedimento geral do 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de alquilo - Método A3.....	72
4.3.4. Método B.....	73

4.3.4.1. Procedimento geral dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo – Método B	73
4.4. Estudos de Estabilidade dos Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos	76
4.4.1. Estudos de Estabilidade Química	77
4.4.2. Estudos de Estabilidade Enzimática	77
4.5. Estudos de Atividade Antimicrobacteriana de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos	78
4.6. Citotoxicidade	79
4.7. Log P, Constantes de Acidez e Atividade Biológica	80
5. <i>Bibliografia</i>	81
6. <i>Anexos</i>	89
Anexo 1. Síntese	89
Anexo 1.1 - Mecanismo da Formação de um Cloreto de Acilo utilizando o Reagente Cloreto de Tionilo	89
Anexo 1.2 - Mecanismo de Formação do Alcóxido (álcool desprotonado por NaH)	89
Anexo 1.3. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear	90
Anexo 2. Estudos de Estabilidade	131
Anexo 2.1. Determinação do Comprimento de Onda para o Detetor UV de HPLC	131
Anexo 2.2. Curvas de Calibração em HPLC	132
Anexo 2.3. Cromatogramas em HPLC	133

Índice de Figuras

Figura 0.1. Modo de ação dos ésteres propostos dos ácidos fracos.....	iv
Figura 0.2. Mode of action of proposed esters of weak acids.	vi
Figura 1.1. Taxas de incidência de tuberculose estimadas por 100 000 habitantes, por país, em 2018 (Adaptado) ¹	1
Figura 1.2. Morfologia do bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ¹³	3
Figura 1.3. Ilustração esquemática dos componentes da estrutura do envelope celular de <i>M. tuberculosis</i> (Adaptado) ¹⁵	3
Figura 1.4. Resposta imunológica após infecção pelo <i>M. tuberculosis</i>	5
Figura 1.5. Estruturas químicas dos fármacos de primeira linha: a) PZA, b) INH, c) RFP e d) EMB.	6
Figura 1.6. Aminoglicósidos: e) amicacina, f) canamicina e g) streptomina; Fluoroquinolonas: h) (R) oxofloxacina ou (S) levofloxacina, i) ciproflaxacina, j) moxifloxacina e k) gatifloxacina ⁴⁷	8
Figura 1.7. Pró-fármaco mútuo de BA substituído.	10
Figura 1.8. Mecanismo da hidrólise química de ésteres: via catálise ácida – A _{AC} 2 (a - vermelho) e catálise básica – B _{AC} 2 (b - azul) ⁶⁰	11
Figura 1.9. Grupos catalíticos comuns em hidrolases envolvidas na hidrólise da ligação éster (Z ⁺ – grupo eletrófilo, Y: – nucleófilo, B – dador de protão e ·OR1 – grupo rejeitado) ⁵⁵	12
Figura 1.10. Esquema reacional de hidrólise de esterases.	13
Figura 1.11. Estrutura tridimensional da CES 1.....	14
Figura 1.12. Esquema simplificado para a hidrólise de ésteres pela BuChE. O mecanismo é semelhante ao das carboxilesterases ⁶⁷	16
Figura 1.13. Representação da estrutura molecular de ésteres de BA substituídos.....	20
Figura 2.1. Identificação e estrutura molecular dos 28 ésteres de ácidos benzóicos substituídos estudados.	21
Figura 2.2. Esquema geral da síntese dos ésteres de BA substituídos.	22
Figura 2.3. Representação Estrutural dos ésteres sintetizados.	27
Figura 2.4. Correlações ¹ H- ¹³ C nos espectros de HMBC de ésteres exemplos (1g, 2f, 3b e 4a) das 4 séries.	29
Figura 2.5. Representação da hidrólise do éster 4-nitrobenzoato de heptilo, 1e, (laranja) e respetiva formação de ácido 4-nitrobenzóico, A, (azul) durante 6h.	33
Figura 2.6. Representação da hidrólise do éster 3,5-dinitrobenzoato de heptilo, 2e, (laranja) e respetiva formação de ácido 3,5-dinitrobenzóico, B, (azul) durante 6h.	33
Figura 2.7. Comparação entre a lipofilia (Log P) e o número de carbonos do grupo alquilo dos 4-nitrobenzoatos de alquilo, 1a a 1l, (azul) e de 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo, 2a a 2l, (laranja).....	41
Figura 2.8. Influência da lipofilia (Log P) na estabilidade dos 4-nitrobenzoatos de alquilo em plasma humano.	42
Figura 2.9. Influência da lipofilia (Log P) na estabilidade dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo em plasma humano.	43
Figura 2.10. Influência da lipofilia dos 4-nitrobenzoatos de alquilo hidrofílicos 1a a 1f (C3 a C8) (vermelho), lipofílicos 1g a 1j (C9 a C12) (laranja) e 2j a 2l (C12 a C14) (cinzento) em <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	45

Figura 2.11. Influência da lipofilia (Log P) na atividade dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo hidrofílicos 2a a 2d (C3 a C6) (amarelo) e 2e a 2l (C7 a C14) (verde) em <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	46
Figura 2.12. Influência da acidez dos ácidos BA substituídos (A, B, C, D e E) na atividade antimicobacteriana contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	49
Figura 2.13. Influência da acidez dos ácidos BA substituídos (A, B, C, D e E) na atividade biológica contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	50
Figura 2.14. Influência da acidez do ácido libertado por hidrólise dos ésteres derivados de decanol na atividade biológica contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	50
Figura 2.15. Redução Enzimática de compostos nitrados por ação de Nitrorredutases do tipo I e II (Adaptado)^{113,114}.	54
Figura 2.16. Exemplos de Fármacos Antituberculosos com grupos nitro.	57
Figura 4.1. Síntese dos 4-nitrobenzoatos de alquilo e dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo.	64
Figura 4.2. Síntese exemplo de um derivado de ácido 4-nitrobenzóico pelo método A1 - Éster 4-nitrobenzoato de heptilo (1e).	65
Figura 4.3. Síntese exemplo de um derivado de ácido 3,5-dinitrobenzóico pelo método A - Éster 3,5-dinitrobenzoato de propilo (2a).	68
Figura 4.4. Síntese dos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo e dos 3,5-di(trifluorometil)benzoatos de alquilo pelo método A2.	69
Figura 4.5. Síntese de um derivado de ácido 4-trifluorometilbenzóico pelo método A2 - Éster 4- (trifluorometil)benzoato de decilo (3b).	70
Figura 4.6. Síntese exemplo de um derivado de ácido 3,5-di(trifluorometil)benzóico pelo método A2 - Éster 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo (4a).	71
Figura 4.7. Síntese de 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo (5a) pelo método A3.	72
Figura 4.8. Síntese dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo pelo método B.	73
Figura 4.9. Síntese exemplo de um dos derivados do ácido 3,5-dinitrobenzóico - Éster 3,5-dinitrobenzoato de tetradecilo (2l).	73
Figura 6.1. Mecanismo da formação do cloreto de acilo¹³¹.	89
Figura 6.2. Esquema reacional do método A2.	89
Figura 6.3. Espetro de ¹H RMN do composto 1a.	90
Figura 6.4. Espetro de ¹³C RMN do composto 1a.	90
Figura 6.5. Espetro de HSQC do composto 1a.	91
Figura 6.6. Espetro de HMBC do composto 1a.	91
Figura 6.7. Espetro de ¹H RMN do composto 1b.	92
Figura 6.8. Espetro de ¹³C RMN do composto 1b.	92
Figura 6.9. Espetro de HSQC do composto 1b.	93
Figura 6.10. Espetro de HMBC do composto 1b.	93
Figura 6.11. Espetro de ¹H RMN do composto 1c.	94
Figura 6.12. Espetro de ¹³C RMN do composto 1c.	94
Figura 6.13. Espetro de HSQC do composto 1c.	95
Figura 6.14. Espetro de HMBC do composto 1c.	95
Figura 6.15. Espetro de ¹H RMN do composto 1d.	96
Figura 6.16. Espetro de ¹³C RMN do composto 1d.	96
Figura 6.17. Espetro de HSQC do composto 1d.	97
Figura 6.18. Espetro de HMBC do composto 1d.	97
Figura 6.19. Espetro de ¹H RMN do composto 1e.	98
Figura 6.20. Espetro de ¹³C RMN do composto 1e.	98
Figura 6.21. Espetro de HSQC do composto 1e.	99

Figura 6.22. Espetro de HMBC do composto 1e .	99
Figura 6.23. Espetro de ^1H RMN do composto 1f .	100
Figura 6.24. Espetro de ^{13}C RMN do composto 1f .	100
Figura 6.25. Espetro de HSQC do composto 1f .	101
Figura 6.26. Espetro de HMBC do composto 1f .	101
Figura 6.27. Espetro de ^1H RMN do composto 1g .	102
Figura 6.28. Espetro de ^{13}C RMN do composto 1g .	102
Figura 6.29. Espetro de HSQC do composto 1g .	103
Figura 6.30. Espetro de HMBC do composto 1g .	103
Figura 6.31. Espetro de ^1H RMN do composto 1j .	104
Figura 6.32. Espetro de ^{13}C RMN do composto 1j .	104
Figura 6.33. Espetro de HSQC do composto 1j .	105
Figura 6.34. Espetro de HMBC do composto 1j .	105
Figura 6.35. Espetro de ^1H RMN do composto 1k .	106
Figura 6.36. Espetro de ^{13}C RMN do composto 1k .	106
Figura 6.37. Espetro de HSQC do composto 1k .	107
Figura 6.38. Espetro de HMBC do composto 1k .	107
Figura 6.39. Espetro de ^1H RMN do composto 2a .	108
Figura 6.40. Espetro de ^{13}C RMN do composto 2a .	108
Figura 6.41. Espetro de HSQC do composto 2a .	109
Figura 6.42. Espetro de HMBC do composto 2a .	109
Figura 6.43. Espetro de ^1H RMN do composto 2b .	110
Figura 6.44. Espetro de ^{13}C RMN do composto 2b .	110
Figura 6.45. Espetro de HSQC do composto 2b .	111
Figura 6.46. Espetro de HMBC do composto 2b .	111
Figura 6.47. Espetro de ^1H RMN do composto 2c .	112
Figura 6.48. Espetro de ^{13}C RMN do composto 2c .	112
Figura 6.49. Espetro de HSQC do composto 2c .	113
Figura 6.50. Espetro de HMBC do composto 2c .	113
Figura 6.51. Espetro de ^1H RMN do composto 2d .	114
Figura 6.52. Espetro de ^{13}C RMN do composto 2d .	114
Figura 6.53. Espetro de HSQC do composto 2d .	115
Figura 6.54. Espetro de HMBC do composto 2d .	115
Figura 6.55. Espetro de ^1H RMN do composto 2e .	116
Figura 6.56. Espetro de ^{13}C RMN do composto 2e .	116
Figura 6.57. Espetro de HSQC do composto 2e .	117
Figura 6.58. Espetro de HMBC do composto 2e .	117
Figura 6.59. Espetro de ^1H RMN do composto 2f .	118
Figura 6.60. Espetro de ^{13}C RMN do composto 2f .	118
Figura 6.61. Espetro de HSQC do composto 2f .	119
Figura 6.62. Espetro de HMBC do composto 2f .	119
Figura 6.63. Espetro de ^1H RMN do composto 2k .	120
Figura 6.64. Espetro de ^{13}C RMN do composto 2k .	120
Figura 6.65. Espetro de HSQC do composto 2k .	121
Figura 6.66. Espetro de HMBC do composto 2k .	121
Figura 6.67. Espetro de ^1H RMN do composto 2l .	122
Figura 6.68. Espetro de ^{13}C RMN do composto 2l .	122
Figura 6.69. Espetro de HSQC do composto 2l .	123

Figura 6.70. Espetro de HMBC do composto 2l	123
Figura 6.71. Espetro de ¹ H RMN do composto 3a	124
Figura 6.72. Espetro de ¹³ C RMN do composto 3a	124
Figura 6.73. Espetro de HSQC do composto 3a	125
Figura 6.74. Espetro de HMBC do composto 3a	125
Figura 6.75. Espetro de ¹ H RMN do composto 3b	126
Figura 6.76. Espetro de ¹³ C RMN do composto 3b	126
Figura 6.77. Espetro de HSQC do composto 3b	127
Figura 6.78. Espetro de HMBC do composto 3b	127
Figura 6.79. Espetro de ¹ H RMN do composto 4a	128
Figura 6.80. Espetro de ¹³ C RMN do composto 4a	128
Figura 6.81. Espetro de HSQC do composto 4a	129
Figura 6.82. Espetro de HMBC do composto 4a	129
Figura 6.83. Espetro de ¹ H RMN do composto 5a	130
Figura 6.84. Espetro de ¹³ C RMN do composto 5a	130
Figura 6.85. Espetro de HSQC do composto 5a	131
Figura 6.86. Determinação do comprimento de onda de absorção das soluções 2,5x10 ⁻⁴ M do ácido 4-nitrobenzóico, A (vermelho: λ = 255) e do éster 4-nitrobenzoato de hexilo, 1d (vermelho: λ = 255) e de ácido 3,5-dinitrobenzóico, B (branco: λ = 230) e do éster 3,5-dinitrobenzoato de hexilo, 2d (azul: λ = 230).	131
Figura 6.87. Exemplo de curva de calibração do éster 4-nitrobenzoato de decilo, 1h , obtida através da análise por HPLC das soluções com concentrações 1x10 ⁻⁷ M, 5x10 ⁻⁷ M, 1x10 ⁻⁶ M, 5x10 ⁻⁶ M, 1x10 ⁻⁵ M, 5x10 ⁻⁵ M, 1x10 ⁻⁴ M e 5x10 ⁻⁴ M.....	132
Figura 6.88. Exemplo de curva de calibração do éster 3,5-dinitrobenzoato de decilo, 2h , obtida através da análise por HPLC das soluções com concentrações 1x10 ⁻⁷ M, 5x10 ⁻⁷ M, 1x10 ⁻⁶ M, 5x10 ⁻⁶ M, 1x10 ⁻⁵ M, 5x10 ⁻⁵ M, 1x10 ⁻⁴ M e 5x10 ⁻⁴ M.....	132
Figura 6.89. Cromatograma do composto 4-nitrobenzoato de nonilo, 1g , após 2h de reação de hidrólise enzimática.	133
Figura 6.90. Cromatograma do composto 3,5-dinitrobenzoato de heptilo, 2e , após 1h de reação de hidrólise enzimática.....	134

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Resumo dos medicamentos utilizados no tratamento da TB, nomeadamente classe, nome, tipo de agente e a via biológica abrangida.	9
Tabela 1.2. Classificação das esterases da Comitte de Nomenclatura de Enzima e respetivo número de Comissão ⁵⁵	13
Tabela 1.3. Ácidos fracos com atividade anti-TB e a sua ação em <i>M. tuberculosis</i> ⁵⁸	18
Tabela 2.1. Sumário das características e rendimentos obtidos dos 4-nitrobenzoatos de alquilo.....	22
Tabela 2.2. Comparação entre os rendimentos obtidos e tempos reacionais dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo nos métodos de síntese A1 e B.....	23
Tabela 2.3. Sumário das características e rendimentos obtidos dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo.....	23
Tabela 2.4. Comparação entre os tempos reacionais e os rendimentos obtidos nos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo com e sem ativação do álcool com hidreto de sódio..	24
Tabela 2.5. Sumário das características dos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo.....	24
Tabela 2.6. Comparação entre os tempos reacionais e os rendimentos obtidos do éster 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo com e sem ativação do álcool com hidreto de sódio..	25
Tabela 2.7. Sumário das características do éster 3,5-di(trifluorometil)benzoatos de decilo.	25
Tabela 2.8. Sumário das características de 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo.....	25
Tabela 2.9. Sumário dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de protão presentes nos espetros ¹ H RMN (<i>sa</i> - singuleto alargado, <i>d</i> - duplete, <i>t</i> - tripleto, <i>m</i> - multiplete).....	27
Tabela 2.10. Sumário dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de carbono presentes nos espetros ¹³ C RMN.....	28
Tabela 2.11. Tempos de retenção (<i>t_R</i>) e comprimentos de onda de absorção (<i>λ</i>) dos ésteres de BA substituídos nos estudos de HPLC no eluente acetonitrilo:água (80:20) com dihidrogenofosfato de potássio (0,001 mol/dm ³ e 0,002% (v/v) de ácido fosfórico (85%)).	30
Tabela 2.12. Estudo da hidrólise química.	31
Tabela 2.13. Estudo da hidrólise enzimática.....	34
Tabela 2.14. Percentagem de degradação de 3,5-dinitrobenzoato de propilo (2a) e hexilo (2d) em hidrólise química e enzimática às 6h.	35
Tabela 2.15. Atividade Antimicobacteriana dos ésteres de BA substituídos sintetizados testados em <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	37
Tabela 2.16. Citotoxicidade dos ésteres de BA substituídos sintetizados em macrófagos THP-1.	56
Tabela 4.1. Condições experimentais da síntese de 4-nitrobenzoatos de alquilo pelo método A1.....	65
Tabela 4.2. Sumário das características e rendimentos obtidos dos 4-nitrobenzoatos de alquilo.....	67
Tabela 4.3. Condições experimentais da síntese de 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo pelo método A1.....	68
Tabela 4.4. Sumário das características e rendimentos obtidos dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo.....	69
Tabela 4.5. Sumário das condições experimentais utilizadas na síntese dos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo pelo método A2.....	70
Tabela 4.6. Sumário das características dos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo.....	71

Tabela 4.7. Sumário das condições experimentais na síntese de 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo pelo método B.	74
Tabela 4.8. Sumário das características e rendimentos obtidos dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo.	75
Tabela 4.9. Sumário das condições utilizadas no método analítico de HPLC.	76
Tabela 4.10. Valores de Log P de todos os compostos estudados e constantes de acidez dos ácidos BA substituídos.	80
Tabela 6.1. Curvas de Calibração obtidas através da análise por HPLC das soluções com concentrações 1×10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-4} M e 5×10^{-4} M.	132
Tabela 6.2. Tempos de retenção do éster, 1g, e do ácido 4-nitrobenzóico, A.	133
Tabela 6.3. Tempos de retenção do éster, 2e, e do ácido 3,5-dinitrobenzóico, B.	134

Abreviaturas e Símbolos

^{13}C – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

^{13}C RMN – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Protão

^1H – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Protão

^1H RMN – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Protão

4NBA – Ácido *p*-nitrobenzóico/ Ácido 4-nitrobenzóico

A_{Ac}2 – Catálise Ácida Bimolecular com Clivagem no Grupo Acilo

AChE – Acetilcolinesterase

ACN – Acetonitrilo

ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade

AG – Arabinogalactano

Ala - Alanina

Alb – Albumina

AM – Ácidos Micólicos

Anti-TB – Antituberculose

ASH – Albumina Sérica Humana

Asp – Ácido Aspártico

BA – Ácido Benzóico

B_{Ac}2 – Catálise Básica Bimolecular com Clivagem no Grupo Acilo

BCG – *Bacillus Calmette-Guérin* – Bacilo *Calmette-Guérin*

BuChE – Butirilcolinesterase

C – Citosina

CBM – *Minimum Bactericidal Concentrations* – Concentração Bactericida Mínima

CE – Carboxilesterases

CIM – *Minimum Inhibitory Concentrations* – Concentração Inibitória Mínima

CL₅₀ – Concentração Letal a 50%

CMT – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Ct – Concentração

Cys – Cisteína

d – Dupletto

DBA – Ácido 4-dodeciloxilbenzóico

DCM – Diclorometano

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* – Ácido Desoxirribonucleico

EMB – Etambutol

ENR – Espécies Reativas de Azoto

FAD – Dinucleótido de Flavina Adenina

FBS – Soro Bovino Fetal

FMN – Mononucleótido de Flavina

G – Guanina

Gli – Glicina

Glu – Ácido Glutâmico

HDL – Lipoproteína de Alta de Densidade

His – Histidina

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* – Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HSQC – <i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i> – Correlação Heteronuclear de Quantum-Simples	NaH – Hidreto de Sódio
Hz – Hertz	NADH – Dinucleótido de Nicotinamida Adenina
I – Força Iónica	NADPH – Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida Adenina
IL – Interleucina	NO – Óxido Nítrico
INF – Interferência	NTR – Nitrorredutases
INH – Isoniazida	OADC – Ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase
IUBMB – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular	OBA – Ácido 4-octilbenzóico
J - Constantes de Acoplamento	ODs – Densidades Óticas
k_{obs} – Constante de Velocidade de Reação de Pseudo-Primeira Ordem	OMS – Organização Mundial de Saúde
LAM – Lipoarabinomanano	PAS – Ácido Para-aminossalicílico
LCA – Álcoois de Cadeia Longa	PBS – Tampão de Fosfato Salino – <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade	PE – Prolina-Glutamato
Leu – Leucina	PEE – Prolina-Prolina-Glutamato
Lip – Lipases	p.f – Ponto de Fusão
LOA – Ácido Linoleico	PG – Peptidoglicano
Log P – Coeficiente de Partição	PMA – Acetato de Tetradecanoilforbol
m – Multiplete	POA – Ácido Pirazinóico
M. – <i>Mycobacterium</i>	PON – Paraoxonase
MAP – Micolil-arabinogalactano peptidoglicano	ppm – Partes por Milhão
MDR-TB – Tuberculose Multirresistente	PZA – Pirazinamida
MM – Membrana Micobacteriana	q – Quarteto
MNT – Micobactéria Não Tuberculosa	RFP – Rifampicina
mRNA – <i>Messenger Ribonucleic Acid</i> – Ácido Ribonucleico mensageiro	RMN – Ressonância Molecular Nuclear
MT – <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RNA – <i>Ribonucleic Acid</i> – Ácido Ribonucleico
NA – Ácido Nicotínico	RpsA – Proteína Ribossómica S1
	RR-TB – Tuberculose Resistente à Rifampicina

sa – Singuleto Alargado

SA – Ácido Salicílico

SAR – *Structure–Activity Relationship* –
Relações Estrutura-Atividade

Ser – Serina

STM – Streptomicina

t – Tripleto

t_{1/2} – Tempo de Semivida

TAG – Triacilglicerol

TB – Tuberculose

THF – Tetrahydrofurano

Tyr – Tirosina

TLC – *Thin-layer Chromatography* –
Cromatografia em Camada Fina

TMS – Tetrametilsilano

UV – Ultravioleta

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

XDR-TB – Tuberculose Extensivamente
Resistente

α – Alfa

β – Beta

λ – Comprimento de Onda de Absorção

δ – Desvio Químico

γ – Gama

μ – Micro

η – Rendimento

1. Introdução Teórica

1.1. Tuberculose

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MT)¹. Esta doença afeta tipicamente os pulmões através da inalação de gotículas contendo MT (TB pulmonar), levando a tosse intensa, febre e dores no peito², mas também pode afetar outros locais do corpo (TB extrapulmonar), tais como meninges, pele, rins ou ossos e articulações³. A doença dissemina-se quando pessoas doentes com tuberculose pulmonar expelem bactérias para o ar quando tosse, por exemplo¹.

1.1.1. Epidemiologia

Em 2018, morreram cerca de 1,5 milhões de pessoas (inclui 251 000 casos com vírus da imunodeficiência humana (VIH)). Estima-se que 10 milhões de pessoas adoeceram com TB e cerca de 1,7 mil milhões de pessoas estejam infetados latentemente e que, portanto, estejam em risco de desenvolver tuberculose ativa durante a sua vida¹.

Geograficamente, as regiões de OMS mais infetadas com TB foram: Sudeste Asiático (44%), África (24%), Pacífico Ocidental (18%). Oito países representam dois terços do total: Índia (27%), China (9%), Indonésia (8%), Filipinas (6%), Paquistão (5%), Nigéria (4%), Bangladesh (4%) e África do Sul (3%), na Figura 1.1¹.

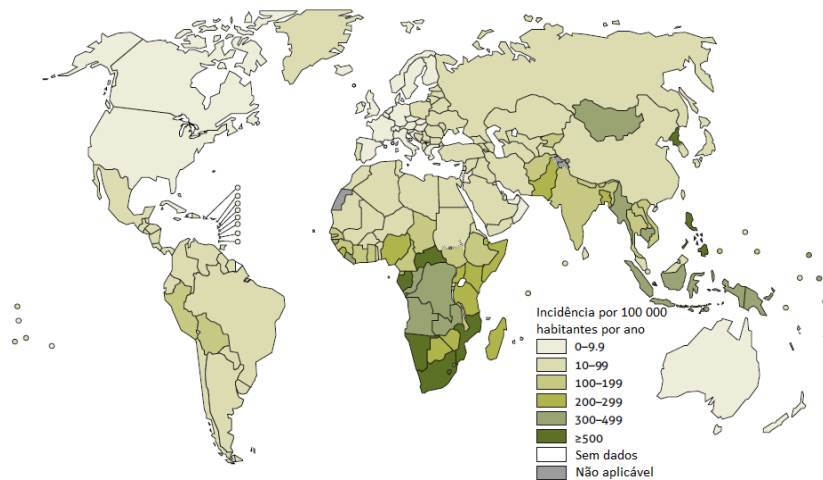


Figura 1.1. Taxas de incidência de tuberculose estimadas por 100 000 habitantes, por país, em 2018 (Adaptado)¹.

Uma ameaça à saúde pública que impede a erradicação desta doença é a tuberculose resistente a fármacos, como a tuberculose resistente a rifampicina (RR-TB), tuberculose multirresistente (MDR-TB) e tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB)^{1,4}. A RR-TB consiste na resistência à rifampicina com ou sem resistência a outros medicamentos anti-TB⁴. A MDR-TB é definida como resistência a pelo menos dois fármacos de primeira linha nomeadamente, a isoniazida e rifampicina⁴. XDR-TB é definida como MDR-TB, uma vez que apresenta resistência aos fármacos isoniazida e a rifampicina, a uma das fluoroquinolonas e a um dos três agentes injetáveis de segunda linha (amicacina, capreomicina e canamicina)^{1,4}.

Cerca de meio milhão de pessoas desenvolveram tuberculose resistente à rifampicina (RR-TB), dos quais 78% tinham tuberculose multirresistente (MDR-TB). Ademais, foram registados 13068 casos com tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB). Os cinco países que notificaram o

maior número de casos de XDR-TB foram Bielorrússia, Índia, Federação Russa, África do Sul e Ucrânia¹.

Para desenvolver racionalmente novos agentes anti-tuberculose (anti-TB), é importante estudar a genética e a fisiologia do *M. tuberculosis* e das micobactérias relacionadas, assim como a interação *M. tuberculosis*-hospedeiro para compreender como essas bactérias contornam as defesas do hospedeiro e como causam a doença⁵.

1.2. Micobactéria

Existe um grupo diverso de bactérias pertencentes à família *Mycobacteriaceae* e diferem amplamente em várias características como na ação patogénica em humanos e animais, os seus reservatórios e na dinâmica de crescimento em cultura⁶. Além do mais, para a inclusão de uma espécie no género *Mycobacterium* existem padrões mínimos tais como: i) resistência a álcool-ácido, ii) a presença de ácidos micólicos contendo 60-90 átomos de carbono e iii) uma razão de DNA de 61 a 71% de guanina (G) e citosina (C)⁷. Existem 71 espécies reconhecidas ou propostas e que podem ser distintas tendo em conta a sua velocidade de crescimento⁷.

1.2.1. Diferentes Tipos de Micobactérias

Existem vários critérios para classificar as micobactérias. Um muito usado na área da saúde é dividir as micobactérias em 3 grupos: Micobactérias Não Tuberculosas (MNT), *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium ulcerans* e Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) que causam doenças como, doença micobacteriana não tuberculosa pulmonar ou extrapulmonar, lepra, úlcera de Buruli e tuberculose, respetivamente⁶. As micobactérias destes grupos estão envolvidas essencialmente em infeções humanas⁶.

As Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) englobam uma série de micobactérias que podem ser patogénicas ou não patogénicas e, por sua vez, causar doenças não tuberculosas pulmonares ou extrapulmonares⁸⁻¹⁰. Ademais, embora se encontrem maioritariamente na água, também podem ser encontradas no solo⁶. Existem mais de 160 espécies diferentes associadas a doenças pulmonares e a sua localização varia mundialmente¹¹.

M. leprae e *M. ulcerans* também são patogénicos micobacterianos^{6,10} e como a lepra e a úlcera de Buruli são doenças muito distintas, estas micobactérias não são incluídas como MNT⁶.

As micobactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) são características por causar doença tuberculose em mamíferos, incluindo humanos e incluem os *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum*^{6,7,10,12}. Estas micobactérias são características por terem uma velocidade de crescimento lento e por serem patogénicas^{6,7}.

Classificação Taxonômica do *Mycobacterium tuberculosis*:

Reino: *Bacteria*
Filo: *Actinobacteria*
Classe: *Actinobacteria*
Sub-classe: *Actinobacteridae*
Ordem: *Actinomycetales*
Sub-ordem: *Cornebacterineae*
Família: *Mycobacteriaceae*
Gênero: *Mycobacterium*⁷



Figura 1.2. Morfologia do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*¹³.

O *Mycobacterium tuberculosis* é um bacilo pertencente ao gênero *Mycobacterium*, em forma de bastonete não móvel com um comprimento da haste entre 2-4 μm e uma largura entre 0,2-0,5 μm (Figura 1.2). Esta micobactéria pertence ao grupo das bactérias ácido-álcool resistentes e é aeróbia obrigatória¹².

1.2.2. Estrutura da Parede Celular de *M. tuberculosis*

O envelope celular de *M. tuberculosis* é constituído por (do interior para o exterior): uma membrana citoplasmática, uma parede celular tripartida e uma cápsula mais externa composta por proteínas e polissacáridos (Figura 1.3)¹⁴. Esta arquitetura complexa desempenha um papel crucial no crescimento celular, sobrevivência, virulência e permeabilidade aos antibióticos¹⁴.

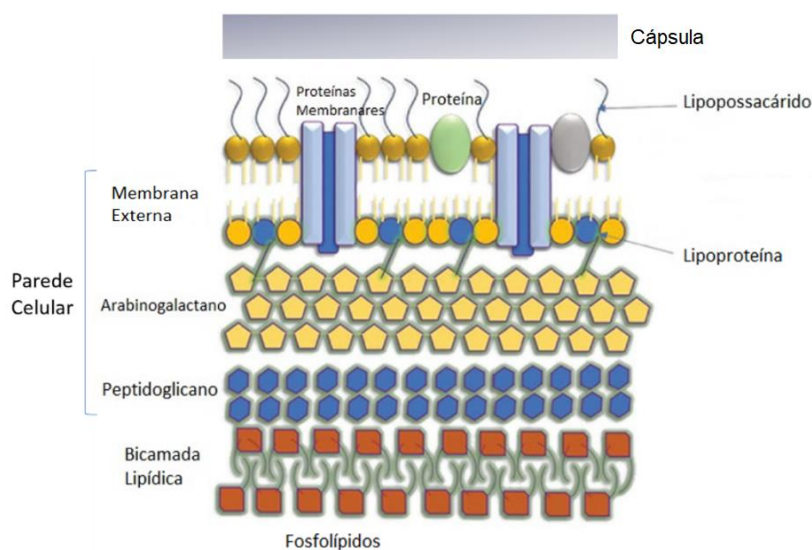


Figura 1.3. Ilustração esquemática dos componentes da estrutura do envelope celular de *M. tuberculosis* (Adaptado)¹⁵.

A parede celular de *M. tuberculosis* é única e com grande complexidade e hidrofobicidade, o que contribui para a sua resistência e reduzida permeabilidade a determinados fármacos^{12,16-18}. A parede celular é um complexo tripartido gigante composto pela membrana externa, a chamada membrana micobacteriana (MM), por arabinogalactano (AG) e por peptidoglicano (PG)¹⁹.

O componente AG é o principal polissacárido da parede celular¹², pois serve para manter a integridade da parede celular e ancorar a camada de ácidos micólicos (AM) impermeável à camada PG¹⁶ por via da ligação fosfodiéster²⁰.

O componente PG é um composto versátil que confere rigidez suficiente ao *M. tuberculosis* para manter a sua forma de haste e mantê-la suficientemente flexível para garantir o seu crescimento bacteriano¹⁶.

Alguns ácidos micólicos (AM) da MM ligam-se a AG, e, por sua vez, AG liga-se covalentemente a PG e originam um complexo micolil-arabinogalactano peptidoglicano (MAP), constituindo assim a camada interna de MM¹⁹. O complexo MAP é um complexo insolúvel¹⁶ responsável pelas propriedades ácido-álcool resistentes da micobactéria¹².

O componente AM é um ácido gordo de cadeia longa, mais especificamente, o ácido gordo *cis*-diciclopropilo¹², cuja função é conferir fluidez à membrana celular e responsável pela impermeabilidade da parede bacteriana¹⁴⁻¹⁶. A patogenicidade desta micobactéria está relacionada com este constituinte celular²¹.

A camada externa de MM é composta por lípidos livres, ou seja, ligados não covalentemente à célula¹⁹. Esta camada é mais densa que a camada interna, sendo rica em lípidos e proteínas que interagem com o sistema imunológico do hospedeiro¹⁶.

A parede celular de *M. tuberculosis*, em particular, tem sulfolípidos como é o caso de Lipoarabinomanano (LAM), um complexo polissacárido lipídico que se estende da membrana plasmática até à superfície. A existência destes sulfolípidos constituem um elevado conteúdo lipídico da parede celular (> 60% da massa total da parede celular), o que explica a sua elevada impermeabilidade¹⁷.

O elevado conteúdo lipídico da parede celular é uma barreira na difusão de antimicrobianos²³. Os fármacos hidrófobos difundem-se com alguma facilidade pela parede celular, mas o mesmo não se sucede com os antimicrobianos hidrofílicos (fármacos hidrofílicos)²³, que conseguem atravessar a membrana pelas porinas existentes^{16,22,23}. Em contraste, os solutos lipofílicos são incapazes de passar eficientemente pelas porinas¹⁶. As porinas são canais proteicos que existem na parede celular responsáveis pela passagem de água, iões e pequenas moléculas²³.

1.3. Performance do Sistema Imunitário perante a Tuberculose

A infeção de TB inicia-se com a inalação de gotículas pequenas, que contêm bacilos de *M. tuberculosis*, e, são transmitidas quando as pessoas infetadas tosse²⁴. Quando as gotículas atingem os alvéolos pulmonares depositam-se nos mesmos (Figura 1.4 A)¹⁷. Deste modo, desencadeia-se uma resposta imunitária por parte das células imunes macrófagos^{17,24-26} e células dendríticas¹⁷.

Após a infeção, ocorre uma resposta inicial no local por parte de macrófagos²⁷ que iniciam o processo de fagocitose de MT, produzindo e maturando os fagossomas^{17,28}. Todavia, MT consegue sobreviver e replicar-se nos macrófagos infetados, uma vez que tem a capacidade de bloquear a maturação e a acidificação do fagossoma e, conseqüentemente, tornar as enzimas lisossômicas (que requerem pH baixo) menos eficazes^{17,27,28}. Outro mecanismo de defesa de MT é inibição da fusão entre o fagossoma e o lisossoma, não permitindo assim a formação do fagolisossoma²⁷. Isto permite que as bactérias se multipliquem nos fagossomas destes macrófagos (Figura 1.4 B)^{17,27,28}.

O recrutamento de células imunes (especificamente linfócitos T) para combater os macrófagos infectados proporciona a formação de granulomas. Estas estruturas contêm células imunes em vários estágios de diferenciação. À medida que o granuloma cresce devido à acumulação de macrófagos e linfócitos, formam-se centros necrosos de aspeto caseoso²⁹. Nestes últimos, as bactérias podem permanecer num estado de dormência (TB latente) até reunirem as condições necessárias para prosseguirem à sua reativação, proliferação e transmissão (Figura 1.4 C)^{17,30}, desenvolvendo assim TB ativa numa fase mais tardia^{17,30}. Na maioria dos casos, a doença permanece latente durante anos, podendo-se manifestar em situações de imunossupressão, como em doentes infectados com VIH³⁰.

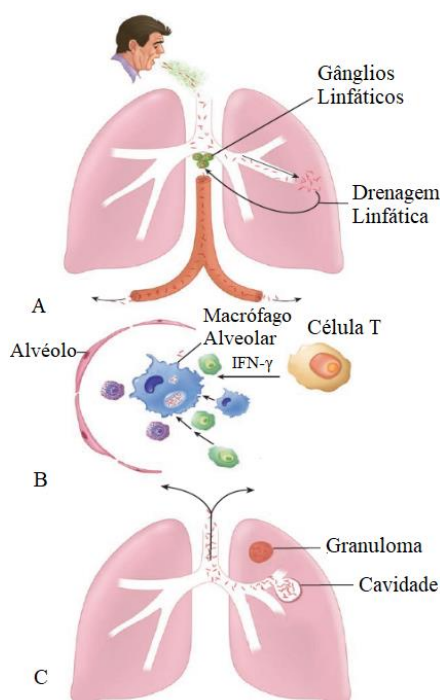


Figura 1.4. Resposta imunológica após infecção pelo *M. tuberculosis*. A. Inalação das gotículas de *M. tuberculosis* e circulação dos mesmos pela drenagem linfática; B. Ativação de macrófagos para uma resposta imunológica; C. Formação de granuloma quando ocorre reativação dos bacilos e originam cavidades, que permitem que os organismos sejam tossidos para infectar outra pessoa (Adaptado)¹⁷.

1.4. Prevenção da Tuberculose

A prevenção da Tuberculose passa pela administração da vacina *Mycobacterium bovis-bacillus Calmette - Guérin* (BCG) em crianças, evitando a tuberculose em crianças^{1,12} e a meningite por *M. tuberculosis*^{1,31}. Esta vacina é constituída por uma estirpe atenuada de *M. bovis*³¹. Em adultos, a vacinação com BCG não previne de maneira confiável a infecção^{31,32}, o desenvolvimento da tuberculose latente ou a reativação da doença latente³¹. A estirpe da vacina é degradada por enzimas lisossômicas e o antígeno processado é apresentado ao sistema imunológico do hospedeiro de modo a ativá-lo e para ser imune à *M. tuberculosis*³³.

1.5. Tratamento da Tuberculose

O primeiro fármaco utilizado no combate à tuberculose foi o antibiótico streptomina (STM) isolado de *Streptomyces griseus* contra MT. Infelizmente, com a utilização de um único medicamento, MT desenvolveu resistência rapidamente ao antibiótico, pelo que a quimioterapia

de TB passou a ser uma terapia combinada por vários fármacos que, entretanto, surgiram. Em 1952, a terapia combinada era streptomina e ácido para-aminossalicílico durante 1 ano e com a descoberta de novos antimicrobianos mais eficazes, as terapias aplicadas começaram a ser menos prolongadas até à descoberta da terapia atual de seis meses recomendada pela OMS¹⁴. Atualmente é comum classificar os fármacos disponíveis em fármacos de primeira linha e fármacos de segunda linha.

1.5.1. Fármacos de Primeira Linha e Quimioterapia da Tuberculose com Fármacos de Primeira Linha

A terapia TB combinada atual é aplicada em doentes durante seis meses e é constituída pela administração dos fármacos de primeira linha (Figura 1.5): pirazinamida (PZA), isoniazida (INH), rifampicina (RFP) e etambutol (EMB) durante dois meses e de seguida por INH e RFP durante quatro meses¹⁴.

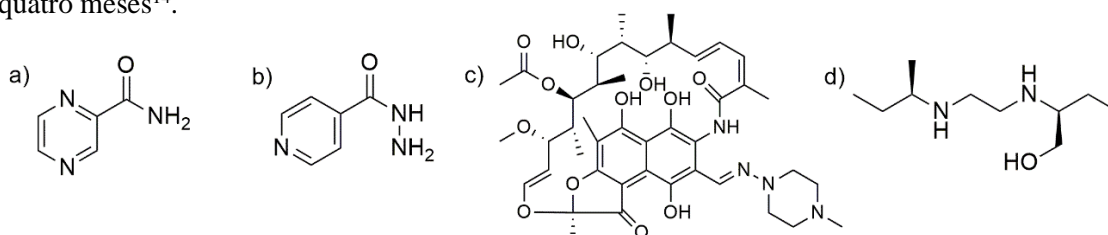


Figura 1.5. Estruturas químicas dos fármacos de primeira linha: a) PZA, b) INH, c) RFP e d) EMB.

a) Pirazinamida

A Pirazinamida, PZA, é um pró-fármaco bactericida³⁴, que é convertido na sua forma ativa, o ácido pirazinóico (POA), análogo estrutural do ácido nicotínico, pela enzima pirazinamidase/nicotinamidase codificada pelo gene *pncA*. Foi observado que a PZA causa interferências no potencial de membrana e causa depleção de energia³⁵⁻³⁷ especialmente no MT, pois possui um mecanismo de efluxo deficiente, quando comparado com outras micobactérias^{37,38}. O mecanismo de ação do POA, apesar de extensivamente estudado, ainda é controverso^{36,38,39}, no entanto, uma característica geral de vários estudos realizados é o facto de que a suscetibilidade de MT é aumentada a pH mais baixos^{36,38-40}, provavelmente devido à sua melhor internalização na célula na forma protonada^{36,38,39}. Este facto suporta uma das primeiras hipóteses de modo de ação, em que a PZA é transformada em POA que atua como um protonóforo e transfere prótons de um ambiente extracelular ácido para o citoplasma, resultando em acidificação do meio intracelular e colapso do potencial de membrana³⁵. Contudo, estudos demonstraram que a sua ação não é estritamente dependente do pH, apenas favorecida com a acidificação do meio extracelular^{41,42}, e que a ação do POA não se traduz necessariamente numa diminuição do pH intracelular⁴¹.

Outros estudos demonstraram também que o modo de ação de POA pode estar associado à inibição da função de outros alvos moleculares, como por exemplo, a função dos genes *rpsA* e *panD* e a enzima sintetase de ácidos gordos FAS-I. *RpsA* codifica a proteína ribossómica S1, responsável pela biossíntese de pantotenato e coenzima A e *panD* codifica a descarboxilase de aspartato, responsável pela biossíntese de coenzima A^{34,39,43}. A inibição de FAS-I, responsável pela biossíntese de ácidos gordos, compromete a biossíntese de MA³⁵. Muito destes hipotéticos alvos moleculares foram identificados por serem genes que quando sofrem mutações, causam resistência a PZA e/ou POA, no entanto, o principal mecanismo de resistência ao fármaco PZA consiste em mutações no gene *pncA*³⁹, impedindo a sua transformação na sua forma ativa, POA³⁵.

Este fármaco tem um papel muito importante no tratamento da TB, pois permitiu que a terapia fosse menos prolongada, passando dos 9 a 12 meses para os 6 meses^{40,44}. Além disso, estudos mostraram que um regime de PZA combinado com rifampicina por 2 meses é tão eficaz para prevenir TB em portadores de VIH como um tratamento de isoniazida por 6 meses⁴⁴.

b) Isoniazida

A Isoniazida (INH) é quimicamente conhecida como uma hidrazida do ácido isonicotínico^{14,45}. É um pró-fármaco que se pensa ter como mecanismo principal a inibição da biossíntese dos ácidos micólicos^{34,39,45,46}. A INH é ativada pela catalase-peroxidase (enzima sintetizada pela expressão do gene *katG*)^{14,34,45,46}, pelo que são produzidos radicais livres, como radicais de isonicotínio^{45,46}. Estes radicais inibem a produção dos ácidos micólicos, comprometendo assim, o envelope celular de *M. tuberculosis* e resulta na sua morte celular^{39,40}.

c) Rifampicina

A Rifampicina (RFP) é um fármaco bactericida, que atua em bacilos MT ativos e latentes e inibe a atividade da RNA polimerase dependente do DNA³⁴. Deste modo, não ocorre a transcrição devido à ligação de RFP à subunidade β da RNA polimerase^{34,39}, o que impede a síntese de mRNA e, conseqüentemente, cessa a síntese proteica. Esta situação leva à morte do bacilo³⁴. Aos pacientes infetados com estirpes MT resistentes a este fármaco está associada a Tuberculose Resistente a Rifampicina (RR-TB)⁴.

d) Etambutol

O Etambutol (EMB) é um fármaco bacteriostático contra bacilos ativos¹⁴. O seu mecanismo de ação atua na interrupção da síntese de arabinogalactano, através da inibição da enzima arabinosiltransferase^{14,39,46}. O impedimento da síntese de arabinogalactano^{14,39}, principal polissacárido da parede celular da micobactéria, inibe a formação do complexo micolil-arabinogalactano peptidoglicano e, portanto, leva ao aumento da permeabilidade da parede celular¹⁴.

1.5.2. Fármacos de Segunda Linha, Tuberculose Multirresistente (MDR-TB), Tuberculose Extensivamente Resistente (XDR-TB) e Quimioterapia com Fármacos de Segunda Linha nas Estirpes Resistentes

Estudos genéticos mostraram que a maioria dos casos de resistência do *M. tuberculosis* a fármacos antimicobacterianos resulta de mutações espontâneas em genes que codificam o alvo do fármaco ou enzimas envolvidas na ativação do fármaco⁴⁰. A resistência de medicamentos de primeira linha origina casos que podem levar a grandes dificuldades de tratamento nomeadamente ao aparecimento de pacientes com Tuberculose Multirresistente (MDR-TB)⁴⁰. A MDR-TB é definida como resistência a pelo menos dois fármacos de primeira linha nomeadamente, a isoniazida e rifampicina^{1,4,12,39,40,45}. Esta situação verifica-se geralmente devido ao tratamento inadequado do paciente⁴⁰. Contudo, é possível controlar MDR-TB com um tratamento concomitante com três a quatro fármacos de segunda linha usados rotineiramente para tratar os pacientes com MDR-TB⁴⁰. O tratamento ocorre entre 18 e 24 meses⁴.

Os fármacos de segunda linha utilizados no tratamento de MDR-TB são aminoglicósidos (amicacina, canamicina e streptomina) e fluoroquinolonas (ofloxacina, ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina e gatifloxacina)^{14,47}, cicloserina/terizidona, etionamida, capreomicina e ácido para-aminossalicílico e encontram-se representados na Figura 1.6⁴⁸.

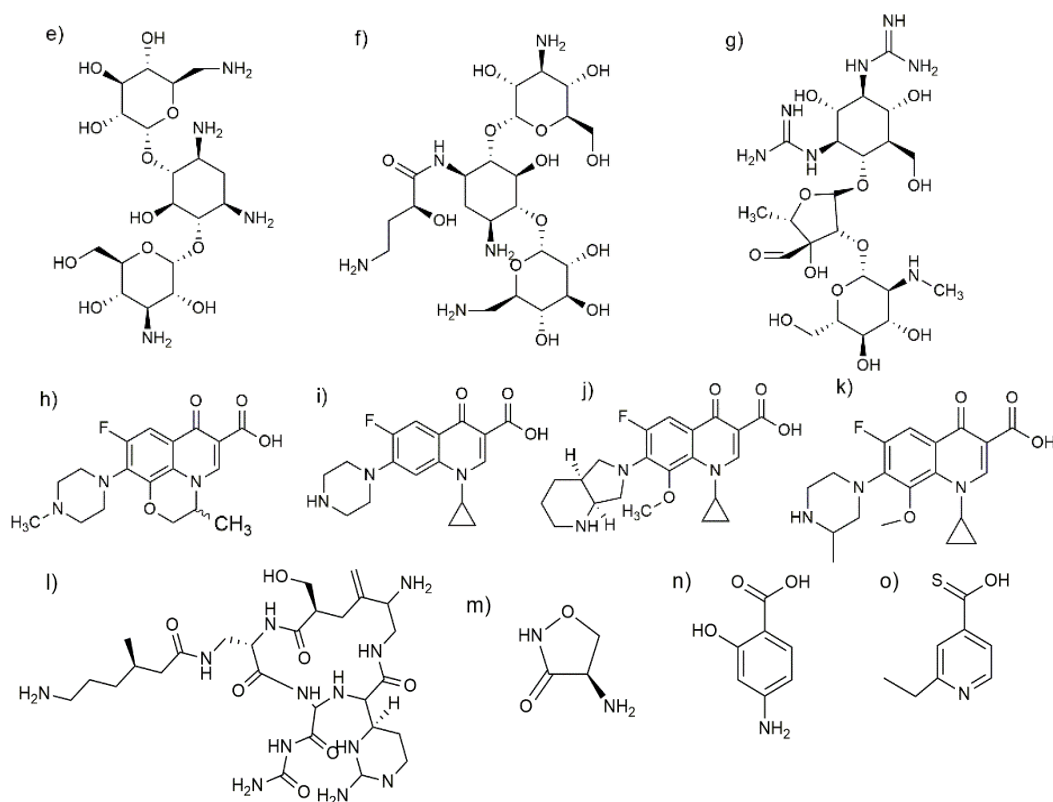


Figura 1.6. Aminoglicósidos: e) amicacina, f) canamicina e g) streptomina; Fluoroquinolonas: h) (R) oxofloxacina ou (S) levofloxacina, i) ciprofloxacina, j) moxifloxacina e k) gatifloxacina⁴⁷.

Com a utilização dos fármacos de segunda linha é possível combater a MDR-TB. Contudo, as estirpes MDR-TB tornam-se resistentes quando o tratamento MDR-TB é interrompido devido a uma amplificação dos padrões de resistência por causa de um tratamento incorreto e transmissão nas comunidades e instalações, originando assim, a Tuberculose Extensivamente Resistente (XDR-TB)⁴.

A XDR-TB é definida como MDR-TB, uma vez que apresenta resistência a isoniazida e a rifampicina e resistência a uma das fluoroquinolonas e a um dos três agentes injetáveis de segunda linha (amicacina, capreomicina e canamicina)^{1,12,39,45}.

Os fármacos de segunda linha utilizados no combate à XDR-TB são a cicloserina, o ácido *para*-aminossalicílico e as tioamidas (etionamida/protionamida)⁴⁸.

A Tabela 1.1 sumariza as características dos fármacos de primeira e segunda linha^{14,34,39,45,47,48}.

Tabela 1.1. Resumo dos medicamentos utilizados no tratamento da TB, nomeadamente classe, nome, tipo de agente e a via biológica abrangida.

Classe	Fármaco	Agente	Mecanismo de ação
1ª linha	PZA	Bactericida	- Acidificação do citoplasma e depleção do potencial de membrana - Inibição da biossíntese de Pantotenato e Coenzima A - Inibição da biossíntese de ácidos gordos/AM
	INH		Inibição de biossíntese de AM
	RFP		Inibição da atividade de RNA polimerase dependente de DNA
	EMB	Bacteriostático	Inibição da síntese de arabinogalactano
2ª linha	Aminoglicósidos	Bactericida	Inibição da síntese de proteínas, que interferem na integridade da membrana celular
	Fluoroquinolonas	Bacteriostático	Inibição da síntese de DNA
	Capreomicina		Inibição da síntese de proteínas
	Cicloserina		Inibição da síntese de peptidoglicano
	Ácido para-aminossalicílico		Inibição da síntese de ácido fólico e inibição da absorção de ferro
	Etionamida		Inibição da biossíntese de MA

A descoberta de novos fármacos para a tuberculose continua a ser essencial para o seu combate e, conseqüentemente, na aplicação de novas terapias.

1.6. Pró-Fármacos

Os pró-fármacos são compostos farmacologicamente inativos, constituídos por um princípio ativo ligado covalentemente a uma molécula quimicamente inerte^{49,50}. A ligação entre os constituintes dos pró-fármacos é clivada por mecanismos químicos ou enzimáticos *in vivo* e ocorre a libertação do fármaco ativo para desempenhar o seu papel farmacológico desejado^{49,51-55}.

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^{49,52}.

O desenvolvimento de pró-fármacos teve como objetivos: melhorar as propriedades físico-químicas, nomeadamente a estabilidade química, baixa solubilidade, sensibilidade ao ácido, baixa lipofilia, as propriedades farmacocinéticas como baixa absorção oral, permeabilidade membranar reduzida, baixa distribuição pelo corpo, curta duração de ação, toxicidade, melhorar o sabor, aliviar a dor (quando administrado por via intravenosa) e farmacodinâmicas que podem estar relacionadas com a toxicidade e com o design dos fármacos (para aumentar a interação fármaco-recetor), uma vez que os fármacos podem possuir propriedades *in vitro* desejadas, mas que são desfavoráveis *in vivo*^{49-54,56,57}.

Os pró-fármacos podem ser amplamente classificados em dois grupos⁵⁷: pró-fármacos com transportador e pró-fármacos bioprecusores^{50,52,53,57}. Em relação aos pró-fármacos com transportador são pró-fármacos que contém uma ligação temporária de uma determinada substância farmacologicamente ativa com um grupo transportador transitório que possui propriedades físico-químicas ou farmacocinéticas aprimoradas e que pode ser facilmente

removido *in vivo*, geralmente por clivagem hidrolítica⁵³, como por exemplo, um éster que é hidrolisado num fármaco ativo contendo um ácido carboxílico. Como regra, o pró-fármaco é inativo ou menos ativo que o composto original, a ligação entre a substância ativa do fármaco e o grupo transportador deve ser quebrada *in vivo* e o pró-fármaco, assim como o grupo transportador libertado *in vivo*, que não deve ser tóxico^{50,53}. Dentro dos pró-fármacos com transportador incluem-se os pró-fármacos mútuos, também designados por co-fármacos⁵¹. Os pró-fármacos bioprecusores são compostos que são convertidos metabolicamente ou por métodos químicos num novo composto, o qual é o fármaco biologicamente ativo e não são necessários transportadores^{51,53}.

Alguns dos grupos funcionais mais comuns existentes em fármacos parentais, nomeadamente, grupos carboxilo, hidroxilo, amina, fosfato e carbonilo são responsáveis pelo design de pró-fármacos^{51,52}. Os pró-fármacos tipicamente produzidos através da modificação destes grupos originam pró-fármacos ésteres, carbonatos, carbamatos, amidas, fosfatos e oximas^{51,52}.

Para melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos adotam-se algumas estratégias como: para melhorar a solubilidade dos fármacos e os efeitos colaterais incorporam-se grupos ionizáveis como grupos fosfato, o que permite os fármacos serem administrados por via intravenosa ou oral e reduzem os efeitos colaterais gastro-intestinais^{50,52,53}, para melhorar a absorção e a permeabilidade em membranas celulares mascaram-se grupos polares como ácido carboxílico por menos polares ou apolares como grupos éster, uma vez que aumentam a lipofilia da molécula e o que potenciam o transporte dos fármacos pelas membranas⁵³ e para aumentar a estabilidade química pode adotar-se a estratégia anterior assim como a introdução de grupos alquilo volumosos que promove um efeito estereoquímico para impedir a abordagem de um nucleófilo ou enzima ao grupo suscetível⁴⁹.

Além disso, os pró-fármacos têm sido projetados para serem ativados por uma variedade de enzimas metabólicas, pelo que há pró-fármacos ativados por esterases (pró-fármacos ésteres), por desmetilação, por N-descarboxilação e hidrólise de amidas e fosfatos⁴⁹. No entanto, nem todos os pró-fármacos são ativados por enzimas. Alguns são ativados quimicamente⁴⁹.

Neste trabalho desenvolveram-se pró-fármacos ésteres que são classificados como pró-fármacos mútuos, uma vez que são compostos por dois componentes ativos em *M. tuberculosis*, nomeadamente, ácido carboxílico⁵⁸ e álcool^{44,59} (Figura 1.7).

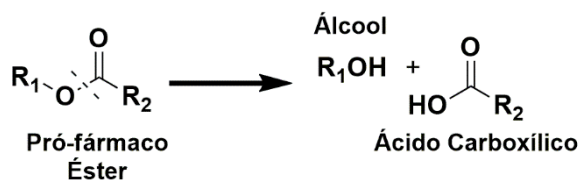


Figura 1.7. Pró-fármaco mútuo de BA substituído.

Por definição, pró-fármacos mútuos ou co-fármacos são constituídos por dois ou mais grupos farmacologicamente ativos ligados entre si, onde um é o transportador do outro. Ambos possuem atividade terapêutica pelo que se obtém um efeito sinérgico e de maior eficácia^{50,52,53}.

Os pró-fármacos mútuos possuem vantagens como maior absorção, alívio da dor no local da injeção, eliminação de sabor desagradável, toxicidade e inativação metabólica diminuída e maior estabilidade química⁵².

1.6.1. Ésteres como Pró-Fármacos

Os ésteres são os pró-fármacos mais utilizados e, em geral, têm como objetivo aumentar a lipofilia dos fármacos^{51,54}.

Deste modo, mascaram-se grupos funcionais com propriedades desfavoráveis a nível farmacocinético, como ácidos carboxílicos por grupos éster, para que os pró-fármacos consigam atravessar as membranas celulares do trato gastrointestinal⁵² dado que o aumento da lipofilia, potencia o aumento da permeabilidade dos fármacos solúveis em água e, conseqüentemente a sua biodisponibilidade⁵⁴.

A síntese de pró-fármacos ésteres ocorre através de reações de esterificação dos grupos hidroxilo ou carboxilo da molécula farmacologicamente inativa⁵⁵. Uma vez no corpo, a ligação éster é facilmente hidrolisada por esterases encontradas no sangue, fígado e outros órgãos e tecidos, incluindo carboxilesterases, acetilcolinesterases, butirilcolinesterases, paraoxonases e arilesterases⁵¹.

Um problema associado aos pró-fármacos ésteres é a dificuldade em prever suas taxas de bioconversão em humanos, e, portanto, os seus efeitos farmacológicos e toxicológicos. A utilização de dados de animais para prever a bioconversão de pró-fármacos em humanos é um problema, uma vez que espécies diferentes geralmente têm diferentes tipos de esterases com atividade biológica distinta assim como especificidades de substrato. Além disso, a bioconversão de pró-fármacos em humanos pode ser afetada por vários fatores, como idade, sexo e doença⁵⁴.

1.6.2. Hidrólise Química

A reação de hidrólise refere-se à quebra de ligações químicas por adição de uma molécula de água⁵⁵.

1.6.2.1. Hidrólise Química de Ésteres

A hidrólise química de ésteres pode ocorrer por catálise ácida representada por A ou catálise básica representada por B. Os mecanismos mais comuns são a catálise ácida bimolecular com clivagem no grupo acilo, A_{AC}2 (a), e a catálise básica bimolecular com clivagem no grupo acilo, B_{AC}2 (b). Em ambos ocorrem reações de adição-eliminação com formação de um intermediário tetraédrico (Figura 1.8)⁶⁰.

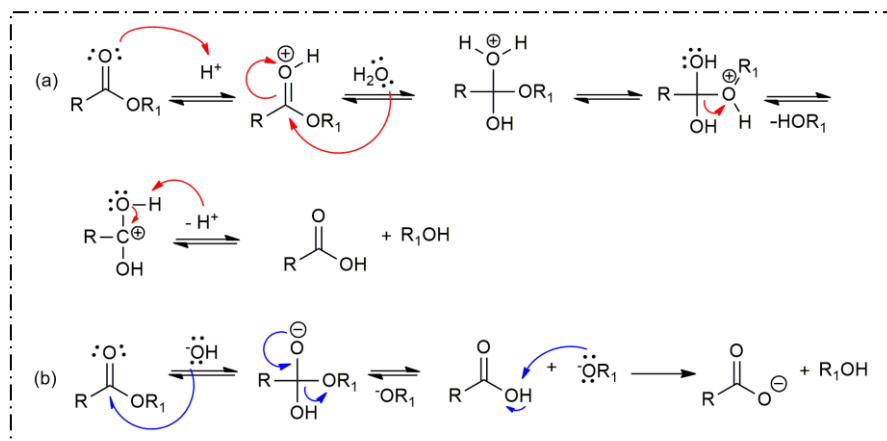


Figura 1.8. Mecanismo da hidrólise química de ésteres: via catálise ácida – A_{AC}2 (a - vermelho) e catálise básica – B_{AC}2 (b - azul)⁶⁰.

Na catálise ácida, ocorre a protonação do átomo de oxigênio do grupo carbonilo, formando-se assim um intermediário tetraédrico com carga positiva e facilita a adição posterior do nucleófilo (molécula de água) e, conseqüentemente, a clivagem do grupo acilo. Este processo é reversível, uma vez que o álcool libertado é um nucleófilo e pode atacar o ácido carboxílico formado (Figura 1.8 a)^{55,60}.

Na catálise básica, forma-se um intermediário tetraédrico com a clivagem do grupo acilo devido à adição do íon hidróxido (nucleófilo). Por sua vez, o ácido carboxílico formado é desprotonado originando um íon carboxilato em meio básico, pelo que não pode ser atacado por nucleófilos formados (OR_1^-) e, por isso, torna esta reação por catálise básica irreversível (Figura 1.8 b)^{55,60}.

A reatividade dos derivados de ácidos carboxílicos irá depender do caráter de dador ou aceitador do substituinte na porção aciloxílica como também da capacidade dos grupos álcool para serem ou não bons grupos rejeitados⁵⁵. Além disso, substituintes eletroatratores aceleram a reação de hidrólise em condições básicas⁴⁹.

Steinberg e Lena estudaram a hidrólise de diferentes ácidos benzóicos substituídos no anel aromático e concluíram que a pH próximos da neutralidade, a hidrólise dos ésteres do ácido benzóico foi predominantemente catalisada por OH^- ⁶¹.

1.6.3. Hidrólise Enzimática

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 ultrapassada⁵⁵. As enzimas que catalisam as reações de hidrólise são conhecidas como hidrolases^{55,62}.

As hidrolases têm na sua constituição três locais catalíticos no seu centro ativo. Estes três locais catalíticos incluem: um componente eletrofílico (Z^+), que aumenta a polarização do grupo carbonilo no substrato; um nucleófilo ($Y:$) para atacar o átomo carbono do grupo carbonilo, pelo que se forma um intermediário tetraédrico e, por último, um dador de prótons ($B - H$) para transformar a porção OR_1^- num melhor grupo rejeitado (Figura 1.9)⁵⁵.

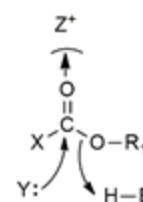


Figura 1.9. Grupos catalíticos comuns em hidrolases envolvidas na hidrólise da ligação éster (Z^+ - grupo eletrofílico, $Y:$ - nucleófilo, $B - H$ - dador de próton e OR_1^- - grupo rejeitado)⁵⁵.

Tendo em conta as estruturas dos locais catalíticos das hidrolases, estas podem ser divididas em cinco classes, nomeadamente, hidrolases de serina, treonina, cisteína, de ácido aspártico e metalohidrolases⁵⁵. Além disso, têm especificidade para uma ampla gama de substratos, tais como, péptidos, amidas, haletos, ésteres e trigliceróis⁶³. A designação atribuída às enzimas depende do tipo de substrato, sendo que muitas foram nomeadas adicionando o sufixo “ase” ao nome do seu substrato, no caso dos ésteres são as esterases⁵⁵. Assim, os compostos descritos no presente trabalho são suscetíveis à hidrólise *in vitro* e *in vivo* por enzimas metabólicas chamadas esterases⁵⁵.

1.7. A Importância da Ação de Esterases em Pró-Fármacos

As esterases (E.C. 3.1.1.X) catalisam a hidrólise de uma variedade de substratos com ligações éster, como no caso de ésteres arilo, acilgliceróis e ésteres derivados de ácidos carboxílicos^{55,63}. A ligação éster é bastante lábil e, por isso, facilmente clivada⁵⁵. Estas enzimas são amplamente distribuídas, encontrando-se em bactérias, fungos, plantas, insetos, animais e humanos, em muitos dos quais se pensa que desempenham papéis fisiológicos importantes no metabolismo lipídico e na desintoxicação de xenobióticos⁶³.

De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as enzimas esterases pertencem à classe 3 e participam na maioria das reações que envolvem a quebra da ligação éster do substrato preferencial⁵⁵. A classificação das esterases de acordo com a ligação éster que clivam está apresentada na seguinte tabela (Tabela 1.2):

Tabela 1.2. Classificação das esterases da *Comite de Nomenclatura de Enzima e respetivo número de Comissão*⁵⁵.

Enzima	Número
Hidrolases de éster carboxílico	EC 3.1.1
Hidrolases de tioléster	EC 3.1.2
Fosfoesterases	EC 3.1.3, 3.1.4, 3.1.5, 3.1.7, 3.1.8
Sulfatases	EC 3.1.6
Nucleases	EC 3.1.11-31

Tendo em conta o metabolismo xenobiótico, as esterases mais importantes na clivagem de ésteres são: carboxilesterase (EC 3.1.1.1), acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7), butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8), paraoxonase (EC 3.1.8.1), arilesterase (EC 3.1.1.2)^{51,54,55}. O citocromo P450 também consegue ativar ésteres de ácidos carboxílicos através da oxidação⁵⁴.

As carboxilesterases (CE) pertencem à família das α/β hidrolases, que catalisam a hidrólise de ésteres ligados a grupos carboxílicos, por adição de moléculas de água, originando a formação do respetivo ácido carboxílico e álcool (Figura 1.10)⁶⁴. Os produtos da hidrólise são geralmente mais polares que o éster original, pelo que têm maior solubilidade em água, o que promove e possibilita a eliminação renal⁶⁴.

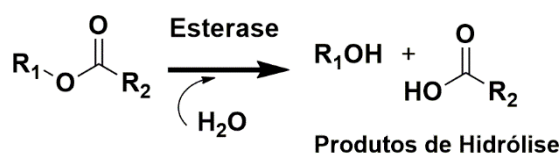


Figura 1.10. Esquema reacional de hidrólise de esterases. As esterases hidrolisam uma éster através da adição de água para formar ácido carboxílico e álcool⁶⁴.

De acordo com estudos estruturais, existem esterases que possuem uma estrutura em folha α/β , sendo que o seu *core* composto por oito folhas β ligadas por hélices α ^{55,64,65}. Este grupo de esterases inclui as colinesterases, hidrolases de epóxido, lipases e fosfotriesterases (como paraoxonase)⁶⁴. As propriedades catalíticas das α/β hidrolases estão ligadas à tríade catalítica constituída por nucleófilo, ácido e o resíduo histidina⁶⁶. O resíduo com a função de nucleófilo não é o mesmo em cada enzima, podendo ser serina, cisteína ou aspartato. A família α/β hidrolases inclui os únicos exemplos de enzimas nas quais o glutamato é utilizado como ácido na tríade catalítica⁶⁶. As carboxilesterases humanas pertencem à superfamília das hidrolases de serina⁶⁷.

No corpo humano foram identificadas cinco CES: CES1 a CES5⁶⁷, em que as CES 1 e CES 2 são as carboxilesterase humanas predominantes^{67,68}. A carboxilesterase 1 (CES1) e a carboxilesterase 2 (CES2) são as duas isoenzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos ésteres e também são conhecidas por metabolizar ésteres endógenos, incluindo ésteres de colesterol, triacilgliceróis e outros lípidos endógenos, desempenhando funções fisiológicas vitais na homeostase lipídica⁶⁷.

A CES1 existe abundantemente no fígado e adipócitos, com menor quantidade no rim, monócitos, pulmão, intestino, testículo, coração e macrófagos⁶⁷. A nível intracelular está presente no retículo endoplasmático, citosol e lisossomas^{55,64}. Por outro lado, a CES2 é expressa principalmente no intestino delgado e cólon, mas também observada nos rins, fígado, coração, cérebro e testículo⁶⁷.

Deste grupo destacam-se também as lipases (EC 3.1.1.3)⁵⁵, enzimas que hidrolisam ésteres de cadeia longa, como acilgliceróis constituintes de lípidos (triglicéridos) e originam ácidos gordos de cadeia longa, que são tipicamente insolúveis ou pouco solúveis em meio fisiológico⁶⁹⁻⁷¹. As esterases têm a característica de hidrolisarem ésteres de cadeia curta⁶⁹⁻⁷¹.

As colinesterases são uma família de enzimas que catalisam a hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético, um processo essencial que permite a restauração dos neurónios colinérgicos⁷². Estas enzimas são subdivididas em acetilcolinesterase e butirilcolinesterases^{55,72} e são as principais colinesterases humanas⁶⁸. As colinesterases desempenham funções análogas às carboxilesterases e também pertencem à família das α/β hidrolases⁷².

A AChE tem atividade em tecidos nervosos e catalisa a hidrólise da acetilcolina⁷². É encontrada também nos músculos e eritrócitos^{55,68,72}. São utilizados inibidores de acetilcolinesterase para o tratamento de Alzheimer⁵⁵. A BChE é nomeada de acordo com a sua preferência pelo substrato artificial butirilcolina⁷², sintetizada no fígado e pode ser encontrada no músculo liso, adipócitos e plasma^{55,72,73}.

As paraoxonases representam um grupo de enzimas composto por três tipos: paraoxonase 1 (PON1), paraoxonase 2 (PON2) e paraoxonase 3 (PON3)^{54,68,74}. Estas enzimas catalisam a hidrólise de um amplo espetro de compostos como ésteres derivados de ácidos carboxílicos aromáticos, organofosforados, lactonas e carbonatos cíclicos⁵⁴. A PON1 é uma paraoxonase humana central para as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias de lipoproteínas de alta densidade (HDL)⁷⁴ e existe no plasma humano e fígado⁵⁴. Esta enzima mostra atividade de arilesterase⁵⁴. A PON2 é um antioxidante celular expresso ubiquamente, que reduz o stresse oxidativo intracelular e retarda a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL)⁷⁴, e não é expressa em plasma⁵⁴. A PON3 é uma enzima associada a HDL e também retarda a oxidação de LDL como PON2, mas não de forma tão significativa porque existe em níveis mais baixos⁷⁴. Além disso, esta enzima é encontrada principalmente no fígado⁵⁴.

As arilesterases atuam em muitos ésteres fenólicos⁵⁵. As arilesterases encontram-se no sangue de mamíferos e hidrolisam paroxon e fenilacetatos⁵⁵. A atividade destas enzimas ligada ao gene da

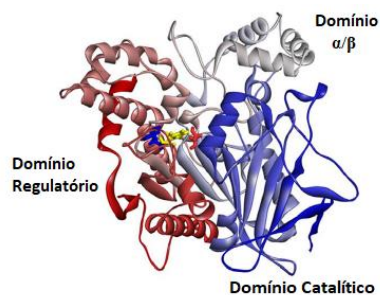


Figura 1.11. Estrutura tridimensional da CES 1. A tríade catalítica, incluindo Ser221 (vermelho), Glu354 (amarelo) e His468 (azul) e as folhas α/β (cinzento) (Adaptado)⁶⁷.

paraoxonase-1 (PON1) é conhecida por proteger as lipoproteínas da oxidação e fornecer defesa contra doenças cardiovasculares⁷⁵.

As enzimas do citocromo P450 (CYPs) são os grupos enzimáticos da fase I mais importantes e responsáveis pela biotransformação, ou seja, na oxidação clássica de muitos xenobióticos como ésteres. Caracteristicamente, os ésteres do ácido carboxílico originam um aldeído (e num ácido) invés de um álcool (e num ácido) na oxidação do grupo éster pela ação de CYPs⁵⁴. As CYPs estão presentes praticamente em todo o corpo, incluindo nas células tumorais⁵⁴.

1.7.1. Esterases no Plasma Humano

O plasma humano é composto essencialmente por água e proteínas e em menor quantidade por constituintes como hormonas e enzimas⁷⁶. Algumas enzimas presentes no plasma metabolizam pró-fármacos que possuam ligações éster⁶⁸.

As esterases existentes no plasma humano são: **Acetilcolinesterase, AChE** (EC 3.1.1.7); **Butirilcolinesterase, BuChE** (EC 3.1.1.8) e **Paraoxonase, PON** (EC 3.1.8.1)⁶⁸. As CE não existem no plasma humano em quantidade significativa⁵⁵.

Além destes três grupos, no plasma existe uma proteína muito abundante que por vezes tem alguma intervenção no metabolismo de ésteres, a **Albumina, Alb**^{55,77-79}.

A AChE possui menor atividade em plasma humano que BuChE⁸⁰ e a BuChE é a enzima colinesterase mais abundante no plasma humano^{68,73}. BuChE tem como principal função a eliminação de uma série de substâncias tóxicas, como por exemplo, a cocaína, entre outras e na proteção do organismo contra organofosfatos⁷².

A paraoxonase que se encontra no plasma humano é a PON1^{54,72}. Além do seu papel como CE, a PON1 está associada a lipoproteínas de alta densidade (HDL) e metaboliza lípidos pró-inflamatórios formados durante a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL)^{54,55,74}.

A albumina é a proteína mais abundante do plasma humano, podendo ser denominada albumina sérica humana (ASH)^{55,77-79}. A sua principal função é controlar a pressão osmótica coloidal no sangue e ligar-se a compostos exógenos e endógenos distribuindo-os pelo corpo^{55,77,78}. A ASH tem um papel farmacocinético importante, uma vez que intervém no metabolismo de muitos dos seus ligandos como fármacos ésteres^{77,78}. É considerada uma ‘pseudo-enzima’, dado que não possui atividade catalítica específica, mas alguma atividade do tipo esterásica, a qual aliada à sua elevada concentração no plasma a faz ter alguma importância relativa na hidrólise de alguns xenobióticos no plasma⁵⁵.

A butirilcolinesterase é geralmente considerada como a principal enzima responsável pela hidrólise de ésteres xenobióticos no plasma humano, estando presente numa concentração de 5 mg/L⁸¹. 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 e até amida⁸¹. Devido ao volume do local ativo e à facilidade de acesso ao mesmo, a BuChE possui uma ampla especificidade de substratos⁸².

O seu mecanismo de hidrólise é semelhante ao mecanismo das proteases de serina, mas a tríade catalítica difere da das proteases de serina por ter glutamato em vez de aspartato. A tríade catalítica da BuChE consiste em Ser198, His438 e Glu325, em que Ser198 atua como um nucleófilo num primeiro passo para iniciar a reação de hidrólise do substrato e His438 serve como uma base geral que aceita o protão do nucleófilo (Ser) para facilitar o ataque do mesmo ao grupo

carbonilo. Devido ao ataque do nucleófilo forma-se um intermediário tetraédrico no átomo de carbono, estabilizado. O intermediário tetraédrico liberta de seguida o álcool formando de novo um grupo acilo que continua ligado à serina. De seguida este intermediário reage com a água, regenerando a serina e liberta o ácido carboxílico (Figura 1.12)⁸³.

Uma das principais características da BuChE é a estabilização do oxanião tetraédrico por ligações de hidrogénio. O orifício do oxanião é composto por 3 dipolos N-H altamente conservados pela principal cadeia de resíduos Gli116, Gli117 e Ala119. Para a maioria das reações efetuadas pela BuChE, a formação do primeiro intermediário tetraédrico ou a hidrólise do intermediário éster acilserina são os passos determinantes⁸³.

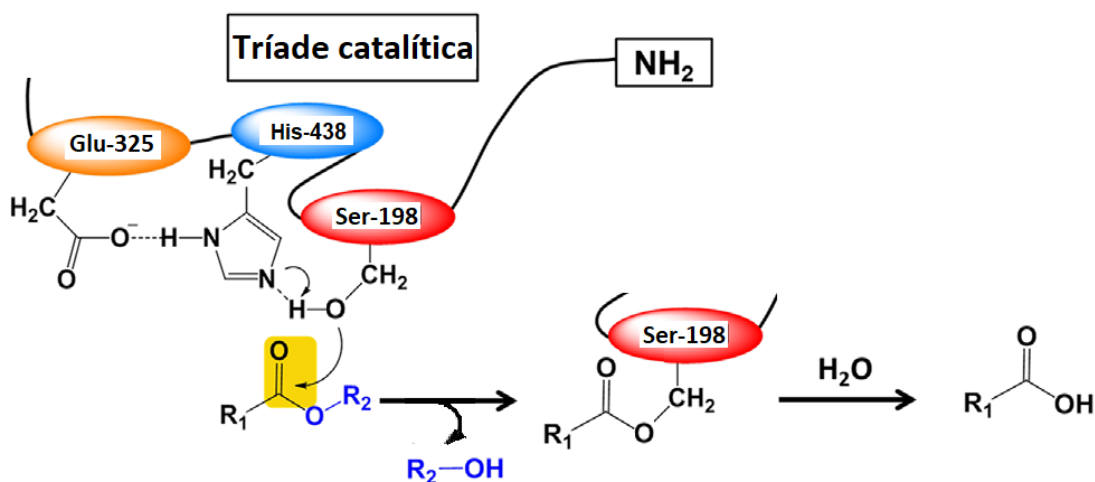


Figura 1.12. Esquema simplificado para a hidrólise de ésteres pela BuChE. O mecanismo é semelhante ao das carboxilesterases⁶⁷.

1.7.2. Esterases *M. tuberculosis*

M. tuberculosis tem a particularidade de possuir uma elevada capacidade de codificação dedicada à produção de enzimas envolvidas na sua lipogénese e lipólise⁸⁴, uma vez que participa no metabolismo lipídico para a produção de energia⁸⁵ e para a manutenção da parede celular através da síntese de ácidos gordos como ácidos micólicos⁸⁴, assegurando assim a sua sobrevivência e virulência⁸⁴⁻⁸⁶.

O genoma do *M. tuberculosis* H37Rv codifica pelo menos 250 enzimas responsáveis pelo metabolismo lipídico⁸⁶⁻⁸⁸, dos quais 24 são esterases/lipases putativas⁸⁶.

Além do mais, para completar o repertório vasto de esterases e lipases MT, são realizados vários estudos que identificam as lipases envolvidas na hidrólise de ésteres derivados de ácidos carboxílicos, como é o caso das enzimas lipolíticas. As enzimas lipolíticas identificadas são classificadas como “Família Lip”^{86,89}. A família Lip é constituída por 24 membros desde a Lip C a Lip Z e compartilham uma sequência de consenso GxSxG que corresponde à triada catalítica característica da família α/β hidrolases^{86,90}. As enzimas desta família têm sido sucessivamente isoladas, caracterizadas e estudadas, como é o exemplo de LipC (Rv0220). Esta enzima induz a ativação do sistema imunológico do hospedeiro com a produção de anticorpos e citocinas e, conseqüentemente a ativação de macrófagos THP-1 e hidrolisa cadeias curtas de C2 a C10⁸⁹. Além disso, também existem outros exemplos como LipF (Rv3487c)⁹¹, LipN (Rv2970c) e LipV

(Rv3203), em que a atividade destas enzimas é induzida a pH ácido, protegendo assim as micobactérias do stress ácido⁸⁶.

Também existe um conjunto de esterases envolvidas no metabolismo lipídico responsáveis pela sobrevivência de MT. Estas esterases hidrolisam lípidos endógenos do hospedeiro como triacilglicerol (TAG), uma fonte de energia para os estados de dormência ou de reativação de MT^{85,87}. A primeira esterase de TAG identificada foi a LipY (Rv3097) e contém um domínio prolina-glutamato (PE). A eliminação de LipY interfere na degradação dos reservatórios lipídicos e na restauração do crescimento durante a dormência da micobactéria. Ademais, a sua sobreexpressão ativa o sistema imunológico de MT, originando uma resposta imune mais robusta⁸⁵. Outra esterase de TAG é a Msh1 (Rv2672) em que o seu alvo são os lípidos do hospedeiro e hidrolisa-os no meio extracelular e é regulada em condições hipóxicas^{85,92}.

Uma classe de esterases de MT responsável pela expansão da virulência da micobactéria são as esterases contendo domínio prolina-glutamato (PE) ou domínio prolina-prolina-glutamato (PPE)^{84,85}. A família de domínio PE e PPE é uma família de proteínas específicas para micobactérias com PE ou PPE na região N-terminal e as proteínas dos domínios PE e PPE estão ligadas à antigenicidade, regulação imunológica e virulência de MT. Além disso, nas maiores famílias de domínio PE e PPE foram identificados computacionalmente oito membros da família com estrutura de dobra α/β hidrolase que foram confirmados como esterases com a clássica tríade catalítica GxSxGx⁸⁵. A esterase mais estudada é a PE11 (Rv1169 ou LipX), que está envolvida no crescimento de biofilme, na criação de uma resposta imunológica e na regulação dos níveis de lípidos associados à virulência. O efeito combinado de PE11 nos lípidos que atribuem virulência a MT e o crescimento de biofilme dependem da sua atividade esterásica⁸⁵.

1.8. Ácidos Fracos Antimicobacterianos e Pró-Fármacos de Ácidos Fracos Antimicobacterianos

A busca de novos fármacos antimicobacterianos no combate à tuberculose tem sido essencial para combater a resistência aos fármacos utilizados atualmente⁴⁰.

Uma vez que o *M. tuberculosis* é suscetível ao ácido pirazinóico (substância ativa libertada a partir de pirazinamida), no qual um dos mecanismos de ação propostos para explicar a sua atividade é o decréscimo do pH intracelular das micobactérias^{35,36,58}. A exploração de outros ácidos fracos que consigam replicar este processo torna-se relevante quer no estudo do mecanismo de ação da pirazinamida quer na procura de potenciais fármacos contra o *M. tuberculosis*⁵⁸. Os ácidos fracos antimicobacterianos são ácidos fracos característicos por apresentarem elevado valor de pK_a (baixo valor de K_a)⁹³ e atividade anti-TB⁵⁸ determinada pela concentração inibitória mínima (CIM)⁹⁴. Para determinar CIM, são incubados uma série de tubos que contém diluições em série de um antibiótico e posteriormente são observadas as CIM - ou seja, a menor concentração de antibiótico que inibe o crescimento bacteriano⁹⁴. Quando o valor de CIM é elevado significa que a concentração mínima do composto para inibir o crescimento bacteriano é elevada, pelo que o composto apresenta menor atividade antimicobacteriana.

Um estudo realizado por Zhang *et al.* (2003) mostrou que *M. tuberculosis* era suscetível a vários ácidos fracos ao pH de maior atividade de POA (pH 5,5) verificando-se que os ácidos com atividades antimicobacterianas inferiores ao POA (CIM 402,90 μ M) foram o ácido salicílico (SA), ácido benzóico (BA), ácido 4-octilbenzóico (OBA), ácido 4-dodeciloxilbenzóico (DBA),

ácido linoleico (LOA) e ácido *p*-nitrobenzóico (4NBA). Ademais, também era suscetível a outro ácido fraco menos ativo como, por exemplo, o ácido isonicotínico (INA)⁵⁸.

Bernheim e outros investigadores verificaram que existia uma relação entre o ácido benzóico e o crescimento bacteriano de MT, chegando à conclusão de que estas bactérias consumiam este ácido através da sua oxidação, pelo que o ácido benzóico era uma fonte de carbono^{95,96}. E além do ácido benzóico ser ativo em MT como reportado em Zhang *et al.* (2003)⁵⁸, um estudo posterior realizado por Wade *et al.* (2006) demonstrou que este ácido combinado com pirazinamida potenciava a sua ação⁹⁷.

A Tabela 1.3 sumariza a atividade e a ação de alguns ácidos fracos antimicobacterianos investigados em *M. tuberculosis*.

Tabela 1.3. Ácidos fracos com atividade anti-TB e a sua ação em *M. tuberculosis*⁵⁸.

Ácidos Fracos	CIM (µM) pH 5,5 em H37Ra	Ação em <i>M. tuberculosis</i>
POA	402,90 ⁹⁸	Baixa o pH intracelular no fagolisossoma, compromete o potencial membranar e o transporte de nutrientes ^{35,36}
SA	72,40-144,80	É um monohidroxiBA com a mesma ação que PZA ⁹⁷
INA	4061,41	Inibe a síntese de ácidos micólicos da parede celular ⁹⁹
OBA	15,79	Inibidores do metabolismo energético como PZA mas não são ativos em condições anaeróbicas ¹⁰⁰
DBA	35,90	
LOA	131,93	Inibe fortemente ou bloqueia o crescimento/ proliferação de MT ¹⁰¹
BA	302,98	Compromete o potencial membranar como PZA ⁵⁸
4NBA	65,82	Inibe o crescimento de MT, enquanto que NTM são resistentes ¹⁰²

Apesar de alguns ácidos fracos apresentarem atividade antimicobacteriana, trazem algumas limitações como o facto de não serem facilmente absorvidos através do trato gastrointestinal ou ligarem-se às proteínas do plasma⁵⁸. Uma das formas de contornar estas limitações passa pelo desenvolvimento de pró-fármacos ésteres, o que transformaria estes ácidos nos respetivos derivados ésteres para serem hidrolisados no respetivo ácido ativo *in vivo*⁵⁸. Para demonstrar atividade, estes pró-fármacos precisam de ser hidrolisados por enzimas presentes em *M. tuberculosis*, que é conhecido por conter uma variedade de esterases⁵⁸.

Neste seguimento, uma das abordagens tem sido a utilização de ésteres do ácido pirazinóico como pró-fármacos^{103,104}. Os ésteres que contêm cadeias alquílicas curta apresentaram baixa estabilidade em plasma humano e atividade antimicobacteriana, pelo que surgiu a necessidade de se sintetizarem ésteres de cadeias mais longas¹⁰³. À medida que o comprimento da cadeia alquílica aumenta, a lipofilia aumenta, permitindo uma melhor absorção através das membranas, até que o comprimento e a lipofilia da cadeia aumentam ao ponto da molécula se tornar insolúvel⁵⁶, o que compromete a utilidade dos ésteres como fármacos futuros^{56,104}.

Os ésteres de POA com cadeias alquílicas mais longas apresentaram uma estabilidade em plasma aumentada, uma vez que ésteres lipofílicos são menos hidrolisados no plasma e mais ativos em *M. tuberculosis*^{103,104}. O aumento da atividade dos ésteres lipofílicos, quando comparado com PZA, pode ser explicado pelo aumento da penetração celular nas micobactérias devido à lipofilicidade dos ésteres de POA e também pela capacidade das esterases micobacterianas

hidrolisarem esses ésteres após a ingestão celular devido às interações entre os ésteres e o local de ligação à enzima¹⁰⁴.

Também foram testados ésteres de ácido benzóico os quais demonstraram uma elevada atividade contra *M. tuberculosis* a pH baixo¹⁰⁰. Além disso, os ésteres de BA estudados continham cadeias alquílicas lineares, pelo que foi possível estabelecer uma relação entre a porção alcofílica e a lipofilia, uma vez que a suscetibilidade de *M. tuberculosis* aos ácidos aumentava à medida que o coeficiente de partição (Log P)¹⁰⁵ aumentava, o que permitiu levantar a hipótese que os compostos penetravam melhor no interior da micobactéria e seriam aí hidrolisados para libertar o ácido livre¹⁰⁰.

Um estudo realizado por Miller M. J. *et al.* (2014) em que destaca uma família de fármacos com grupos nitro, nomeadamente, as 1,3-benzotiazin-4-onas (BTZs) representadas pelo fármaco BTZ043, como uma nova classe promissora de agentes antituberculosos que demonstraram matar o MT *in vitro*, *ex vivo* e em modelos de ratos com TB. Ademais, os autores avaliaram a atividade de ésteres de ácido benzóico com substituintes nitro e trifluorometilo nas posições 1,3 do anel aromático (éster com dois grupos NO₂ e éster com os grupos NO₂ e CF₃) e demonstraram que o éster dissubstituído com NO₂ foi mais ativo face ao éster com os substituintes NO₂ e CF₃ mencionado¹⁰⁶.

Contudo, um composto ser ativo contra o *Mycobacterium tuberculosis* não é suficiente, uma vez que tem de superar a hidrólise enzimática no plasma humano para penetrar as membranas do bacilo e ser hidrolisado rapidamente na presença de esterases micobacterianas⁵⁸. Deste modo, a análise de relações estrutura-atividade (SAR) é importante no design de novos pró-fármacos anti-TB para atender às condições mencionadas¹⁰⁰.

1.9. Objetivos do Trabalho

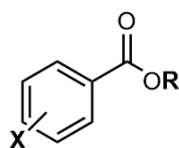
Na sequência da investigação de pró-fármacos que permitam superar a resistência à pirazinamida (PZA) contra *Mycobacterium tuberculosis*^{44,103,107,108}, verificou-se que alguns ácidos fracos possuíam atividade significativa sobre o *Mycobacterium tuberculosis* e que álcoois de cadeia longa (LCA) empregues em pró-fármacos como transportadores também possuíam atividade relevante. Surgiu então a ideia de obter pró-fármacos mútuos contendo os dois componentes unidos através de uma ligação éster. Estes compostos poderão ter potencialmente uma ação sinérgica e uma melhoria da penetração nas micobactérias devido à sua lipofilia adequada.

Os ésteres precisam de ser estáveis durante a fase de absorção e transporte, mas suficientemente lábeis perante esterases micobacterianas para serem ativados. Uma vez que as micobactérias são ricas em atividade esterásica, é possível usar uma esterase micobacteriana para libertar os fármacos no local de ação. Durante os últimos anos, o grupo onde fui integrada desenvolveu metodologia para estudar a ativação de pró-fármacos por micobactérias¹⁰⁷ comparando-a com a estabilidade dos mesmos compostos em plasma e frente a esterases do fígado, tendo demonstrado que não estão correlacionados¹⁰⁸. Por exemplo, foram obtidos pró-fármacos que são facilmente ativados por esterases micobacterianas e que demonstraram ser estáveis em plasma humano¹⁰³. É assim possível obter ésteres de LCA e ácidos fracos adequados ao uso *in vivo*. Sintetizámos ainda diferentes compostos com atividade relevante sobre a tuberculose.

De entre os vários compostos obtidos, os derivados de ácidos fracos contendo o grupo nitro mostraram-se especialmente interessantes a nível de atividade e toxicidade¹⁰⁹, pelo que os objetivos da presente dissertação se focaram na obtenção de derivados entre os LCA e ácidos fracos contendo grupos nitro, alargando assim a gama de ácidos fracos já obtidos e no estudo da sua estabilidade, atividade e toxicidade.

Concretamente foram propostos os seguintes objetivos:

1. A síntese de ésteres de ácidos fracos de BA substituídos, com diferentes substituintes eletroatratores (X) no anel benzénico (4-nitro; 3,5-dinitro, 4-(trifluorometilo); 3,5-di(trifluorometilo) e 2,3,4,5,6-pentafluoro) e diferentes grupos alquilo (R) variando de propilo a tetradecilo (Figura 1.13).



X = 4-NO₂, 3,5-dNO₂, 4-CF₃, 3,5-dCF₃, 2,3,4,5,6-pF
R = Propilo a Tetradecilo

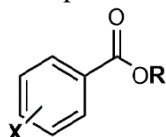
Figura 1.13. Representação da estrutura molecular de ésteres de BA substituídos. X representa o substituinte eletroatrator da porção aciloxílica e R, o grupo alquilo da porção alcoxílica da molécula.

2. O estudo de estabilidade dos ésteres sintetizados em tampão fosfato a pH 7,4 e em plasma humano com o fim de avaliar o seu comportamento durante a possível hidrólise química e enzimática, respetivamente, e concluir se os ésteres têm capacidade de serem estáveis durante a farmacocinética, em particular nas fases de absorção e distribuição.
3. O estudo da atividade antimicobacteriana dos ésteres sintetizados em *M. tuberculosis* H37Rv.
4. O estudo da citotoxicidade dos ésteres sintetizados em linhas celulares monocítica humana THP-1.
5. Com base nos estudos de estabilidade e atividade, estabelecer relações estrutura-estabilidade/atividade a fim de discutir o contributo da lipofilia/comprimento do grupo alquilo, o efeito dos substituintes aceitadores de elétrons no anel aromático e acidez dos ácidos nos estudos de estabilidade e de atividade antimicobacteriana.
6. Por último, a avaliar os ésteres sintetizados como potenciais pró-fármacos de ácidos fracos e destacar os compostos que reúnam características ideais como sofrerem uma reação de hidrólise enzimática lenta, serem ativos nas micobactérias e não tóxicos nas células humanas.

2. Resultados e Discussão dos Resultados

2.1. Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos

Estudaram-se 28 ésteres de ácidos benzóicos (BA) substituídos divididos em 5 séries. A série 1 corresponde aos 4-nitrobenzoatos de alquilo, a série 2 aos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo, a série 3 aos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo, a série 4 ao 3,5-di(trifluorometil)benzoato de alquilo e finalmente a série 5 ao 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de alquilo. A identificação e a estrutura dos ésteres como dos respectivos ácidos estão apresentadas na Figura 2.1.



Composto	X	R	Composto	X	R
1a	4-NO ₂	C ₃ H ₇	2a	3,5- <i>d</i> NO ₂	C ₃ H ₇
1b		C ₄ H ₉	2b		C ₄ H ₉
1c		C ₅ H ₁₁	2c		C ₅ H ₁₁
1d		C ₆ H ₁₃	2d		C ₆ H ₁₃
1e		C ₇ H ₁₅	2e		C ₇ H ₁₅
1f		C ₈ H ₁₇	2f		C ₈ H ₁₇
1g		C ₉ H ₁₉	2g		C ₉ H ₁₉
1h		C ₁₀ H ₂₁	2h		C ₁₀ H ₂₁
1i		C ₁₁ H ₂₃	2i		C ₁₁ H ₂₃
1j		C ₁₂ H ₂₅	2j		C ₁₂ H ₂₅
1k		C ₁₃ H ₂₇	2k		C ₁₃ H ₂₇
1l		C ₁₄ H ₂₉	2l		C ₁₄ H ₂₉
A		H	B		H
3a	4-CF ₃	C ₉ H ₁₉	4a	3,5- <i>d</i> CF ₃	C ₁₀ H ₂₁
3b		C ₁₀ H ₂₁	D		H
C		H			
5a	2,3,4,5,6- <i>p</i> F	C ₁₀ H ₂₁			
E		H			

Figura 2.1. Identificação e estrutura molecular dos 28 ésteres de ácidos benzóicos substituídos estudados.

Realizaram-se estudos de atividade antimicrobacteriana e de citotoxicidade com todos os ésteres mencionados e estudos de estabilidade com os ésteres das séries 1 e 2.

2.2. Síntese de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos

Do conjunto dos vinte e oito ésteres apresentados na Figura 2.1 foram sintetizados vinte e um ésteres. Na série 1, sintetizaram-se os ésteres **1a** a **1g**, **1j** e **1k**; na série 2, os ésteres **2a** a **2f**, **2k** e **2l**; na série 3, os ésteres **3a** e **3b**; na série 4, o éster **4a** e, por último, na série 5, o éster **5a**.

Os ésteres **1h**, **1i**, **1l**, **2g**, **2h**, **2i** e **2j** não foram sintetizados, uma vez que existiam em laboratório.

Neste trabalho, os ésteres foram sintetizados partindo dos ácidos benzóicos substituídos correspondentes, os quais, após conversão nos respectivos cloretos de ácido (Método A) ou derivados de imidazol (Método B) reagiram com diferentes álcoois (propanol a tetradecanol).

Recorrendo ao Método A foram testadas três condições de reação diferentes: A1 onde o álcool reagiu na sua forma neutra no solvente diclorometano (DCM) a 50°C durante 48h (série 1) ou no solvente tetrahidrofurano (THF) a 78°C durante 65h (série 2); A2 onde o álcool foi inicialmente ativado (desprotonado com hidreto de sódio (NaH)), reagindo o respectivo alcóxido em tetrahidrofurano (THF) a 78°C; e finalmente A3 onde o álcool reagiu na forma neutra no solvente THF a 78°C durante dois dias. Pelo Método B, o derivado imidazol reagiu unicamente por uma via que envolveu o álcool na sua forma neutra no solvente THF a 77°C (Figura 2.2).

A Figura 2.2 descreve o esquema geral das sínteses dos ésteres de BA substituídos.

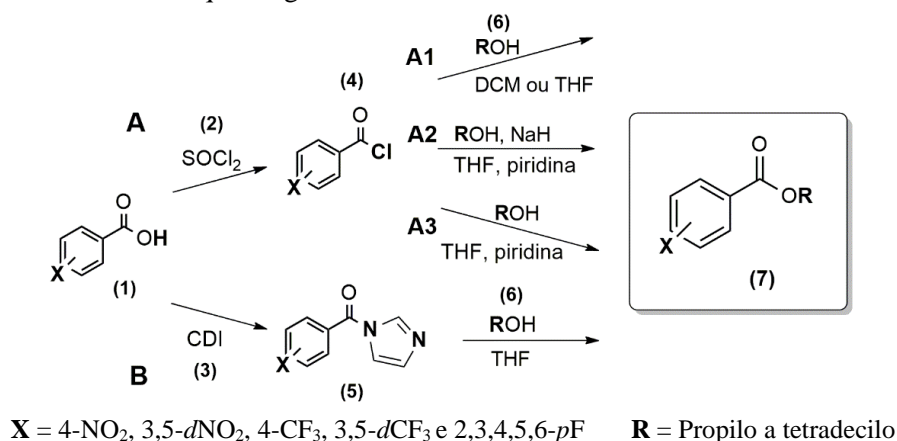


Figura 2.2. Esquema geral da síntese dos ésteres de BA substituídos.

De seguida, serão apresentados os compostos finais sintetizados e respetivas características (aspeto e ponto de fusão (p.f)) e os rendimentos das reações. Todos os ésteres encontravam-se puros de acordo com a caracterização obtida por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

2.2.1. 4-nitrobenzoatos de alquilo

Todos os 4-nitrobenzoatos de alquilo foram sintetizados pelo método A1.

O sumário das características e rendimentos obtidos dos 4-nitrobenzoatos de alquilo encontra-se na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Sumário das características e rendimentos obtidos dos 4-nitrobenzoatos de alquilo.

Composto	R	Método	Estado Físico	Ponto de fusão / °C	Rendimento / η (%)
1a	C ₃ H ₇	A1	Sólido Amarelo	29-31	15
1b	C ₄ H ₉	A1	Sólido Branco	32-34	89
1c	C ₅ H ₁₁	A1	Óleo Amarelo	-	80
1d	C ₆ H ₁₃	A1	Óleo Amarelo	-	25
1e	C ₇ H ₁₅	A1	Óleo Amarelo	-	80
1f	C ₈ H ₁₇	A1	Óleo Amarelo	-	6
1g	C ₉ H ₁₉	A1	Óleo Amarelo	-	24
1j	C ₁₂ H ₂₅	A1	Sólido Amarelo	38-39	67
1k	C ₁₃ H ₂₇	A1	Sólido Branco	37-38	86

Estes compostos foram obtidos com rendimentos variando entre 6% e 89%, valores correspondentes à síntese de 4-nitrobenzoato de octilo, **1f**, e 4-nitrobenzoato de butilo, **1b**, respetivamente (Tabela 2.1). Os ésteres **1a**, **1d**, **1f** e **1g** apresentarem rendimentos inferiores a

25% e foi necessário recorrer a uma segunda purificação por cromatografia em coluna *flash*, uma vez que a separação e remoção da impureza (o álcool) foi difícil de se efetuar na primeira cromatografia em coluna *flash*.

De acordo com a literatura¹¹⁰, os intervalos dos valores de pontos de fusão medidos possuem um intervalo de 1 a 2° e coincidem com os valores tabelados, o que é indicativo de uma elevada pureza.

2.2.2. 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo

Para a síntese destes ésteres, utilizou-se primeiramente o método A1 tendo os rendimentos dos compostos **2b**, **2c**, **2e**, **2k** e **2l** variando entre 4% e 8% (Tabela 2.2). Os baixos rendimentos levaram à repetição da sua síntese por um método sintético alternativo (método B) como consta na Tabela 3.3. O método B consistiu na realização de reações de esterificação com a utilização do agente de acoplamento 1,1'-carbonildiimidazol (CDI). A comparação dos resultados obtidos nos métodos A e B para os compostos **2b**, **2c**, **2e**, **2k** e **2l** apresenta-se na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Comparação entre os rendimentos obtidos e tempos reacionais dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo nos métodos de síntese A1 e B.

Composto	R	Método	Rendimento / η (%)	$t_{\text{reação}}$ / h	Método	Rendimento / η (%)	$t_{\text{reação}}$ / h
2b	C ₄ H ₉	A1	4	66	B	57	24
2c	C ₅ H ₁₁	A1	8	84	B	39	48
2e	C ₇ H ₁₅	A1	5	168	B	49	168
2k	C ₁₃ H ₂₇	A1	4	67	B	55	120
2l	C ₁₄ H ₂₉	A1	8	144	B	78	24

Comparando os métodos A1 e B verificou-se que os rendimentos dos compostos **2b**, **2c**, **2e**, **2k** e **2l** aumentaram consideravelmente com a utilização do método B, variando entre 39% e 78%. Ademais, as reações foram mais rápidas à exceção da síntese de **2e** e **2k**.

O sumário das características dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo apresenta-se na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Sumário das características e rendimentos obtidos dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo.

Composto	R	Método	Estado Físico	Ponto de fusão / °C	Rendimento / η (%)
2a	C ₃ H ₇	A1	Sólido Amarelo	70-72	60
2b	C ₄ H ₉	B	Sólido Branco	63-64	57
2c	C ₅ H ₁₁	B	Sólido Amarelo	44-46	39
2d	C ₆ H ₁₃	A1	Sólido Branco	58-59	44
2e	C ₇ H ₁₅	B	Sólido Branco	45-46	49
2f	C ₈ H ₁₇	A1	Sólido Branco	61-63	18
2k	C ₁₃ H ₂₇	B	Sólido Branco	63-64	55
2l	C ₁₄ H ₂₉	B	Sólido Branco	65-66	78

Estes compostos foram obtidos com rendimentos entre os 18% e 78%, sendo o rendimento menor da síntese de 3,5-dinitrobenzoato de octilo, **2f**, e o rendimento maior da síntese de 3,5-dinitrobenzoato de tetradecilo, **2h** (Tabela 2.3). O composto **2f** apresenta um rendimento inferior,

novamente devido à necessidade se repetir o método de purificação por cromatografia em coluna *flash* para se remover a impureza álcool.

2.2.3. 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo

Para os compostos **3a** e **3b**, realizaram-se sínteses sem ativação do álcool (pelo método A1 e A3) e com ativação do álcool com hidreto de sódio (pelo método A2) como representadas na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Comparação entre os tempos reacionais e os rendimentos obtidos nos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo com e sem ativação do álcool com hidreto de sódio.

Composto	R	Método	$t_{\text{reação}}$	Rendimento / η (%)	Método	$t_{\text{reação}}$	Rendimento / η (%)
3a	C ₉ H ₁₉	Sem ativação (A1)	9 dias	-	Com Ativação (A2)	9 dias	12
3b	C ₁₀ H ₂₁	Sem ativação (A3)	17 h	77	Com Ativação (A2)	17 h	89

Na síntese de **3a** pelo método A1 não se adicionou piridina nas duas reações com e sem ativação do álcool com hidreto de sódio (formação do ião alcóxido), o que pode justificar a obtenção de um rendimento muito inferior e um tempo reacional superior relativamente à síntese de **3b**. Deste modo, pode-se concluir que a síntese destes ésteres com a ausência da base (piridina) não é a melhor via sintética (Tabela 2.4).

Para a síntese de **3b** realizaram-se também duas reações com e sem ativação do álcool com hidreto de sódio, mas na presença de piridina ao contrário do procedimento da síntese de **3a**. Como se pode observar na Tabela 3.4, o rendimento com ativação do álcool foi superior (89%) do que sem ativação do álcool (77%). O rendimento superior é justificado pela formação do ião alcóxido (Mecanismo 2 do Anexo 1.2 – passo A) e, por sua vez, é fulcral para que ocorra a reação de adição-eliminação (Mecanismo 2 do Anexo 1.2 – passo B).

Pelo método A2, com a ativação do álcool com hidreto de sódio e a presença de base (piridina), as reações de **3a** e **3b** foram mais rápidas (Tabela 2.4). Deste modo, estas condições reacionais mencionadas são as mais adequadas para a síntese de 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo.

Por último, o sumário das características dos ésteres **3a** e **3b** apresenta-se na Tabela 2.5.

Tabela 2.5. Sumário das características dos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo.

Composto	R	Método	Estado Físico	Rendimento / η (%)
3a	C ₉ H ₁₉	A2	Óleo Amarelo Claro	12
3b	C ₁₀ H ₂₁	A2	Óleo Amarelo Claro	89

2.2.4. 3,5-di(trifluorometil)benzoato de alquilo

A síntese do composto 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo realizou-se pelos métodos A2 e A3. Tal como nos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo, também foram realizadas reações com e sem ativação do álcool com hidreto de sódio (formação do ião alcóxido) nas mesmas condições reacionais que **3b** como representado na Tabela 2.6.

Tabela 2.6. Comparação entre os tempos reacionais e os rendimentos obtidos do éster 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo com e sem ativação do álcool com hidreto de sódio.

Composto	R	Método A3	t _{reação} /h	Rendimento/η (%)	Método A2	t _{reação} /h	Rendimento/η (%)
4a	C ₁₀ H ₂₁	Sem ativação	24	36	Com ativação	24	51

De acordo com a análise da Tabela 2.6, o rendimento da síntese de 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo é superior com ativação do álcool (51%) do que sem ativação do álcool (36%). Pelo que para a síntese deste éster pelo método A2, as melhores condições são com a ativação do álcool com hidreto de sódio e na presença de base (piridina).

Assim, o sumário das características do éster 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo apresenta-se na Tabela 2.7.

Tabela 2.7. Sumário das características do éster 3,5-di(trifluorometil)benzoatos de decilo.

Composto	R	Método	Estado Físico	Rendimento / η (%)
4a	C ₁₀ H ₂₁	A2	Óleo Incolor	51

2.2.5. 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de alquilo

A síntese de **5a** pelo método A2 não ocorreu, pelo que se sintetizou o éster 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo, **5a**, por outro método, o método A3. O método A3 difere do método A2 no facto de não se ativar o álcool com hidreto de sódio previamente.

Pelo método A3, o rendimento da síntese de **5a** foi de 9%. Embora este método tenha resultado, não será o melhor para sintetizar este éster, uma vez que o rendimento obtido foi baixo e em reações anteriormente realizadas as misturas reacionais degradavam-se. Uma possível justificação para a degradação das misturas reacionais poderá ser devido à degradação do intermediário cloreto de acilo (**4**), que é característico por ser bastante reativo.

Por último, o sumário das características do éster 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo apresenta-se na Tabela 2.8.

Tabela 2.8. Sumário das características de 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo.

Composto	R	Método	Estado Físico	Rendimento / η (%)
5a	C ₁₀ H ₂₁	A3	Óleo amarelo claro	9

2.2.6. Conclusões Gerais

Os 4-nitrobenzoatos de alquilo foram sintetizados com rendimentos superiores a 65% pelo método A1. Os ésteres **1a**, **1d**, **1f** e **1g** apresentaram rendimentos inferiores a 25%. Nestes ésteres foi necessário uma purificação adicional por cromatografia em coluna *flash* com o eluente hexano e acetato de etilo 9:1. Deste modo, caso se sintetizem estes compostos novamente, deve ser utilizado na sua purificação um eluente com menor polaridade para permitir que ocorra uma eluição lenta do álcool que não reagiu.

Os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo foram sintetizados pelo método A1 e B. Pelo método A1, as reações ocorreram durante 66h e 168h e os rendimentos variaram entre 4% e 8% e pelo método

B, a maioria das reações realizadas demoraram 24h e 48h e os rendimentos variaram entre 39% e 78%. Assim, pelo método B as reações foram mais rápidas e os rendimentos mais elevados e pode-se concluir que este método demonstrou ser o método de síntese mais adequado para a síntese da série 2. Além disso, é possível evitar-se a utilização do reagente cloreto de tionilo que é tóxico.

A síntese dos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo foi seguida pelos métodos A1 a A3 e a do 3,5-di(trifluorometil)benzoato de alquilo pelos métodos A2 e A3, tendo-se verificado que as melhores condições reacionais envolviam a ativação do álcool com hidreto de sódio e na presença de base (piridina), pelo método A2.

Apenas se procedeu à síntese do éster 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo, **4a**, e do éster 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo, **5a**, uma vez que os ésteres com melhores resultados de atividade até à data nos trabalhos realizados no grupo de investigação foram os ésteres derivados de decanol.

O 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo, **5a**, foi sintetizado pelo método A3. Embora a reação de esterificação tenha ocorrido, este método não será a melhor via sintética, uma vez que o rendimento obtido foi baixo (9%) e em algumas reações as misturas reacionais degradavam-se. O método A3 difere de A1, uma vez que não se ativa o álcool previamente com hidreto de sódio na presença de base (piridina) e de método A2, uma vez que se ativa o álcool com hidreto de sódio na presença de base (piridina).

Um possível método alternativo de síntese de 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo, de 3,5-di(trifluorometil)benzoato de alquilo e de 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo pode ser o método B. Neste método utilizou-se um agente de acoplamento 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) que reagiu com o ácido carboxílico e originou um derivado de imidazol (**5**). Este intermediário é característico por ser menos reativo que o cloreto de acilo (**4**), pelo que os problemas de degradação nos métodos A2 e A3 (derivados de cloretos de acilo) podem ser evitados. Esta hipótese foi aplicada na síntese de alguns ésteres de 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo, uma vez que quando estes ésteres foram sintetizados pelo método B as reações ocorreram mais rapidamente e obtiveram-se rendimentos superiores, comprovando assim que este método de síntese foi uma boa alternativa. Deste modo, o método B pode ser um método a utilizar para a síntese dos ésteres da série 4 e 5.

2.2.7. Caracterização por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Para a caracterização estrutural dos ésteres realizaram-se as experiências de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (^1H RMN), carbono (^{13}C RMN), Correlação Heteronuclear de Quantum-Simples (HSQC “Heteronuclear Single-Quantum Correlation”), espectro bidimensional com as correlações entre os núcleos envolvidos que estão distantes por uma ligação química e Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações (HMBC “Heteronuclear Multiple Bond Correlation”), espectro bidimensional com as correlações entre os núcleos envolvidos que estão distantes por mais do que uma ligação química. O solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado (CDCl_3). Este solvente foi usado como padrão na análise dos espectros obtidos. Os espectros de RMN encontram-se no Anexo 1.3 e os valores dos desvios químicos dos sinais de protão e de carbono dos espectros de RMN dos ésteres das séries 1 a 5 (Figura 2.3) nas Tabelas 2.9 e 2.10. As correlações ^1H - ^{13}C de HMBC também contribuíram para atribuição dos

sinais de próton e carbono (Figura 2.4). Os sinais de próton e carbono de **5a** foram atribuídos por comparação com os outros espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN de ésteres derivados de decanol.

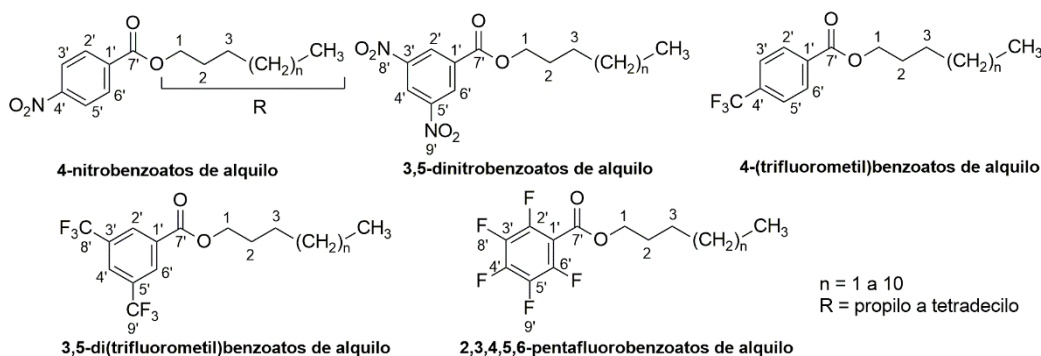


Figura 2.3. Representação Estrutural dos ésteres sintetizados.

Tabela 2.9. Sumário dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de próton presentes nos espectros ^1H RMN (*sa* - singuleto alargado, *d* - duplete, *t* - triplete, *m* - multiplete).

Éster	Prótons Aromáticos			Prótons da Cadeia Alquílica			
	C3'/5'	C2'/6'	C4'	C1	C2	C3 - Cx	CH ₃
1a	8,29, A (AA'BB')	8,21, B (AA'BB')		4,34, <i>t</i>	1,76-1,83, <i>m</i>	1,04, <i>t</i>	
1b	8,28, A (AA'BB')	8,20, B (AA'BB')		4,36, <i>t</i>	1,71-1,85, <i>m</i>	1,41-1,55, <i>m</i>	0,99, <i>t</i>
1c	8,29, A (AA'BB')	8,21, B (AA'BB')		4,36, <i>t</i>	1,73-1,86, <i>m</i>	1,32-1,49, <i>m</i>	0,93, <i>t</i>
1d	8,29, A (AA'BB')	8,21, B (AA'BB')		4,37, <i>t</i>	1,75-1,85, <i>m</i>	1,27-1,51, <i>m</i>	0,90, <i>t</i>
1e	8,29, A (AA'BB')	8,21, B (AA'BB')	-	4,36, <i>t</i>	1,73-1,84, <i>m</i>	1,24-1,50, <i>m</i>	0,89, <i>t</i>
1f	8,29, A (AA'BB')	8,21, B (AA'BB')		4,37, <i>t</i>	1,73-1,85, <i>m</i>	1,23-1,50, <i>m</i>	0,89, <i>t</i>
1g	8,29, A (AA'BB')	8,21, B (AA'BB')		4,37, <i>t</i>	1,73-1,86, <i>m</i>	1,21-1,51, <i>m</i>	0,88, <i>t</i>
1j	8,29, A (AA'BB')	8,20, B (AA'BB')		4,37, <i>t</i>	1,73-1,86, <i>m</i>	1,21-1,50, <i>m</i>	0,88, <i>t</i>
1k	8,29, A (AA'BB')	8,21, B (AA'BB')		4,37, <i>t</i>	1,73-1,85, <i>m</i>	1,22-1,50, <i>m</i>	0,88, <i>t</i>
2a		9,16, <i>d</i>	9,22, <i>t</i>	4,42, <i>t</i>	1,80-1,93, <i>m</i>	1,06, <i>t</i>	
2b		9,15, <i>d</i>	9,23, <i>t</i>	4,46, <i>t</i>	1,77-1,88, <i>m</i>	1,43-1,55, <i>m</i>	1,01, <i>t</i>
2c		9,16, <i>d</i>	9,22, <i>t</i>	4,45, <i>t</i>	1,78-1,90, <i>m</i>	1,36-1,49, <i>m</i>	0,95, <i>t</i>
2d		9,16, <i>d</i>	9,23, <i>t</i>	4,45, <i>t</i>	1,77-1,89, <i>m</i>	1,29-1,50, <i>m</i>	0,92, <i>t</i>
2e		9,16, <i>d</i>	9,22, <i>t</i>	4,45, <i>t</i>	1,78-1,89, <i>m</i>	1,28-1,49, <i>m</i>	0,90, <i>t</i>
2f		9,16, <i>d</i>	9,22, <i>t</i>	4,45, <i>t</i>	1,78-1,89, <i>m</i>	1,25-1,50, <i>m</i>	0,89, <i>t</i>
2k		9,16, <i>d</i>	9,22, <i>t</i>	4,45, <i>t</i>	1,78-1,89, <i>m</i>	1,23-1,49, <i>m</i>	0,88, <i>t</i>
2l		9,16, <i>d</i>	9,23, <i>t</i>	4,44, <i>t</i>	1,77-1,88, <i>m</i>	1,21-1,49, <i>m</i>	0,87, <i>t</i>
3a	7,70, <i>d</i>	8,16, <i>d</i>		4,35, <i>t</i>	1,71-1,83, <i>m</i>	1,21-1,50, <i>m</i>	0,88, <i>t</i>
3b	7,70, <i>d</i>	8,15, <i>d</i>		4,34, <i>t</i>	1,71-1,84, <i>m</i>	1,21-1,50, <i>m</i>	0,88, <i>t</i>
4a	-	8,48, <i>sa</i>	8,06, <i>sa</i>	4,39, <i>t</i>	1,74-1,80, <i>m</i>	1,20-1,50, <i>m</i>	0,87, <i>t</i>
5a	-	-	-	4,38, <i>t</i>	1,69-1,82, <i>m</i>	1,20-1,48, <i>m</i>	0,88, <i>t</i>

Tabela 2.10. Sumário dos desvios químicos (em ppm) dos sinais de carbono presentes nos espectros ¹³C RMN.

Éster	Carbonos Aromáticos						Carbonos da Cadeia Alquílica				
	C1'	C2'/6'	C3'/5'	C4'	C7'	C8'	C9'	C1	C2	C3-Cx	CH ₃
1a	136,04	130,80	123,66	150,65	164,84	-		67,63	22,16	10,58	
1b	136,04	130,79	123,65	150,64	164,89		65,95	30,78	19,35	13,84	
1c	136,02	130,80	123,66	150,60	164,90		66,25	28,44	28,25	14,10	
1d	135,89	130,67	123,54	150,47	164,78		66,26	28,69	25,78	14,14	
1e	136,00	130,79	123,66	150,57	164,90		66,26	28,72	26,07	14,21	
1f	136,06	130,80	123,66	150,65	164,90		66,27	28,75	26,12	14,21	
1g	135,06	130,80	123,66	150,65	164,90		66,27	26,12	26,12	14,22	
1j	136,06	130,80	123,66	150,65	164,90		66,27	28,76	26,12	14,24	
1k	136,06	130,80	123,65	150,65	164,90		66,27	28,75	26,12	14,24	
2a	134,33	129,45	148,84	122,44	162,70	-		68,63	22,12	10,52	10,52
2b	134,16	129,54	148,64	122,42	162,71		66,99	30,71	19,30	13,82	
2c	134,35	129,55	148,85	122,43	162,71		67,29	28,39	28,16	14,06	
2d	134,35	129,54	148,85	122,42	162,71		67,30	28,66	25,70	14,10	
2e	134,35	129,45	148,84	122,43	162,75		67,30	28,70	26,00	14,17	
2f	134,20	129,39	148,69	122,27	162,56		67,15	28,54	25,88	14,05	
2k	134,36	129,45	148,85	122,42	162,71		67,31	28,70	26,04	14,25	
2l	134,28	129,57	148,76	122,44	162,70		67,30	28,67	26,02	14,27	
3a	133,93	130,06	125,25	135,14	165,60	124,61		65,87	28,80	26,15	14,21
3b	133,83	130,08	125,52	135,09	165,62	133,83		65,88	28,77	26,14	14,26
4a	131,89	129,69	132,34	126,25	164,01	124,25		65,44	28,57	29,24	14,12
5a	109,88	145,44	139,87	154,72	165,83	-		65,33	28,78	26,04	14,12

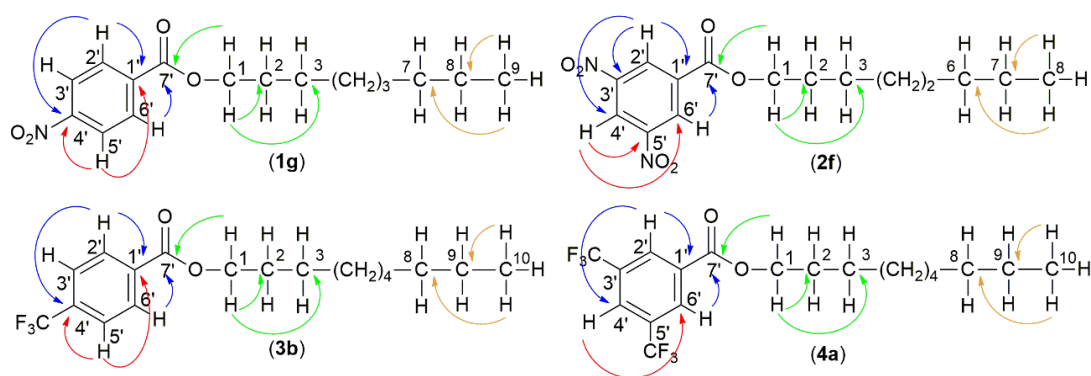


Figura 2.4. Correlações ^1H - ^{13}C nos espectros de HMBC de ésteres exemplos (1g, 2f, 3b e 4a) das 4 séries.

Através da análise de ^1H RMN, os sinais dos prótons aromáticos da série 1 apresentaram um sistema AA'BB' em que a parte A do sistema corresponde aos H3'/5' e a parte B do sistema aos H2'/6', na série 2 multiplicidade *d* e *t*, na série 3 *d* e na série 4 *sa*. Os sinais dos prótons da cadeia alquílica em todas as séries apresentaram multiplicidade *t* ligados ao C1, *m* ligados ao C2, *m* ligados ao C3-Cx (observou-se a sobreposição dos sinais de próton dos grupos alquilo a partir de três carbonos (multipletos largos) e *t* nos sinais do grupo metilo (Tabela 2.9).

2.3. Estudos de Estabilidade de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos

No corpo humano existem várias barreiras que um pró-fármaco éster, como os ésteres abordados neste trabalho, precisa de ultrapassar para atingir o seu alvo. Para além de ter de ser capaz de atravessar as várias membranas, o pró-fármaco não deverá sofrer hidrólise pelas esterases humanas (hidrólise enzimática) nem hidrólise química (hidrólise não enzimática) significativa.

A estabilidade dos 4-nitrobenzoatos de alquilo e 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo foi estudada com a finalidade de conhecer a estabilidade destes ésteres em condições semelhantes às encontradas no plasma humano até estes atingirem as micobactérias alvo nos hospedeiros. Foram para isso estudados estudos cinéticos quer em tampão fosfato a pH 7,4 (para avaliar a reação de hidrólise química) quer em plasma humano (para avaliar a reação de hidrólise enzimática).

A hidrólise dos compostos foi estudada utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em coluna de fase reversa e as condições experimentais encontram-se descritas no Subcapítulo 4.4. do Procedimento Experimental – Estudos de Estabilidade dos Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos. Os comprimentos de onda de absorção dos ésteres e ácidos determinados por espectroscopia UV/Visível encontram-se no Anexo 2.1. De seguida serão apresentados os tempos de retenção dos ésteres analisados (Tabela 2.11).

Tabela 2.11. Tempos de retenção (tR) e comprimentos de onda de absorção (λ) dos ésteres de BA substituídos nos estudos de HPLC no eluente acetonitrilo:água (80:20) com dihidrogenofosfato de potássio (0,001 mol/dm³ e 0,002% (v/v) de ácido fosfórico (85%)). tR em minutos e λ em nanómetros.

Composto	X	R	Comprimento de onda(λ)/ nm	Tempo de retenção (tR)/ min
1a	4-NO ₂	C ₃ H ₇	255	3,31
1b		C ₄ H ₉		3,67
1c		C ₅ H ₁₁		4,42
1d		C ₆ H ₁₃		5,08
1e		C ₇ H ₁₅		5,85
1f		C ₈ H ₁₇		6,74
1g		C ₉ H ₁₉		8,03
1h		C ₁₀ H ₂₁		9,68
1i		C ₁₁ H ₂₃		11,34
1j		C ₁₂ H ₂₅		14,52
1k		C ₁₃ H ₂₇		17,69
1l	C ₁₄ H ₂₉	22,56		
A		H		2,39
2a	3,5-dNO ₂	C ₃ H ₇	230	3,67
2b		C ₄ H ₉		3,78
2c		C ₅ H ₁₁		4,12
2d		C ₆ H ₁₃		4,62
2e		C ₇ H ₁₅		5,17
2f		C ₈ H ₁₇		5,99
2g		C ₉ H ₁₉		7,05
2h		C ₁₀ H ₂₁		8,38
2i		C ₁₁ H ₂₃		10,06
2j		C ₁₂ H ₂₅		12,26
2k		C ₁₃ H ₂₇		17,87
2l	C ₁₄ H ₂₉	18,89		
B		H		2,09

É possível observar que os tempos de retenção dos ésteres nas séries 1 e 2 aumentam com o aumento do comprimento da cadeia alquílica, uma vez que a afinidade para a fase estacionária da coluna aumenta e, deste modo, os analitos ficam mais retidos na mesma (Tabela 2.11).

Os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo apresentam tempos de retenção inferiores aos tempos de retenção dos 4-nitrobenzoatos alquilo, uma vez que os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo são mais polares, pelo que têm menor afinidade com a fase estacionária apolar da coluna (Tabela 2.11).

2.3.1. Estabilidade em Tampão de Fosfato

A hidrólise química dos vinte e quatro ésteres (série 1 - **1a** a **1l** e série 2 - **2a** a **2l**) foi avaliada em tampão fosfato a pH fisiológico para determinar a sua influência nos estudos enzimáticos. Preparou-se uma solução de fosfato com concentração (Ct) 0,01M, força iónica (I) 0,15M e pH 7,4. A estabilidade de todos os ésteres foi avaliada no pH mencionado em soluções com 20% de acetonitrilo (ACN) e à temperatura de 37°C durante duas semanas, como descrito no Subcapítulo 4.4.1 do Procedimento Experimental – Estudos de Estabilidade Química.

Para avaliar o comportamento do éster e ácido, ao longo do tempo, prepararam-se ensaios para determinar o decaimento do éster e a formação de ácido em que se acompanhou a evolução da reação pela percentagem de degradação de éster. Os ensaios foram realizados em triplicado e acompanhados por um controlo negativo constituído por acetonitrilo e éster para se monitorizar a concentração de éster não hidrolisado na reação em simultâneo com a concentração de éster hidrolisado nos controlos positivos ao longo do tempo.

Os resultados dos estudos foram quantificados pelas curvas de calibração determinadas previamente (Anexo 2.2) através da análise dos cromatogramas obtidos (Anexo 2.3). A partir da quantificação das concentrações de éster e de ácido calcularam-se as percentagens de degradação de éster (Equação 4.1 do Subcapítulo 4.4.1) como contam na Tabela 2.12.

Tabela 2.12. Estudo da hidrólise química. Percentagem de degradação de éster ao longo de duas semanas em tampão de fosfato pH 7,4, à temperatura 37°C, n=3 – número de amostras para cada composto. Concentração inicial de éster - 5×10^{-4} M com 2% de ACN.

Composto	X	R	% Degradação de éster				
			24h	48h	72h	168 h	336h
1a	4-NO ₂	C ₃ H ₇	3,84	5,61	7,42	12,15	25,52
1d		C ₆ H ₁₃	2,13	2,73	3,51	4,31	11,47
1g		C ₉ H ₁₉	1,26	2,19	2,62	4,06	5,78
1k		C ₁₃ H ₂₇	2,09	2,13	2,66	3,54	4,48
2a	3,5- <i>d</i> NO ₂	C ₃ H ₇	20,64	46,46	60,51	84,17	105,31*
2d		C ₆ H ₁₃	12,41	13,63	16,04	21,11	26,95
2g		C ₉ H ₁₉	2,51	4,39	6,47	8,73	11,61
2k		C ₁₃ H ₂₇	3,36	3,92	4,11	5,49	7,83

* Valores superiores a 100% estão associados a erros experimentais do aparelho HPLC

No estudo de estabilidade em tampão de fosfato a pH fisiológico a 37°C, consideraram-se como compostos estáveis os ésteres de BA substituídos que tiveram uma percentagem de degradação de éster inferior a 25% ao fim de 168h (uma semana). Os ésteres do ácido 4-nitrobenzóico e do ácido 3,5-dinitrobenzóico mostraram ser estáveis em tampão fosfato a pH 7,4, dado que apresentaram percentagens de degradação de éster reduzidas durante duas semanas, à exceção de

2a (Tabela 2.12). Não se calcularam constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) e tempos de semivida da hidrólise química ($t_{1/2}$) devido à elevada estabilidade dos compostos, pelo que os resultados quantitativos foram as percentagens de degradação de éster.

O composto **2a** mostrou ser o composto menos estável em tampão fosfato a pH fisiológico, uma vez que apresentou uma percentagem de degradação de éster superior a 50% da concentração inicial em uma semana. Para este composto (**2a**), determinou-se a constante de velocidade de reação de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) e tempo de semivida ($t_{1/2}$), sendo k_{obs} de $1,27 \times 10^{-2} \pm 0,3 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2}$ de $54,49 \pm 1,35 \text{ h}$.

Concluiu-se que os 4-nitrobenzoatos de alquilo mostraram ser mais estáveis em tampão fosfato a pH 7,4 que os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo (Tabela 2.12).

Steinberg e Lena estudaram a hidrólise de diferentes ácidos benzóicos a pH próximos da neutralidade e concluíram que a pH 7,4, a hidrólise dos ésteres do ácido benzóico foi predominantemente catalisada por OH^- (hidrólise química a condições básicas)⁶¹.

Caso o mecanismo de hidrólise química dos ésteres deste trabalho ocorra pela via básica (B_{AC2}), a hidrólise é influenciada predominantemente pelos efeitos eletrónicos (favorecida pela presença de grupos eletroatratores na molécula) e estereoquímicos (desfavorecida pela introdução de grupos volumosos) da molécula⁴⁹. Ademais, o facto de os ésteres monossustituídos serem mais estáveis que os dissustituídos é concordante com a literatura perante um mecanismo de hidrólise básico, uma vez que a introdução de grupos eletroatratores (grupos nitro) no anel aromático promovem o aumento da reatividade do grupo carbonilo para que reaja com um nucleófilo (ião hidroxilo) e, conseqüentemente, para que o grupo acilo (grupo rejeitado) seja eliminado.

2.3.2. Estabilidade em Plasma Humano

Para desenvolver um pró-fármaco resistente às esterases humanas é necessário estudar a sua estabilidade em plasma humano, uma vez que este tem de atingir o seu alvo, o *M. tuberculosis*, em quantidades suficientes para ser convertido no fármaco ativo pelas esterases micobacterianas.

A estabilidade em plasma humano avalia a hidrólise enzimática pelas esterases do plasma humano. Deste modo, foram realizados estudos de estabilidade com os ésteres de BA de modo a avaliar a reação enzimática e selecionar assim os ésteres mais adequados do ponto de vista de estabilidade frente a essas mesmas esterases.

A estabilidade enzimática dos ésteres de BA substituídos foi estudada num meio composto por 80% de plasma humano e 20% de tampão fosfato a pH 7,4 com $C_t=0,01\text{M}$ e $I=0,15\text{M}$, como descrito no Subcapítulo 4.4.2 do Procedimento Experimental – Estudos de Estabilidade Enzimática.

Tal como no estudo anterior, para avaliar o comportamento do éster e ácido, ao longo do tempo, prepararam-se ensaios para determinar o decaimento do éster e a formação de ácido. Os resultados deste estudo foram obtidos de ensaios triplicados e quantificados pelas curvas de calibração determinadas previamente (Anexo 2.2) através da análise dos cromatogramas obtidos (Anexo 2.3).

Os resultados do estudo de estabilidade em plasma humano encontram-se exemplificados nas Figuras 2.5 (éster **1e**) e 2.6 (éster **2e**).

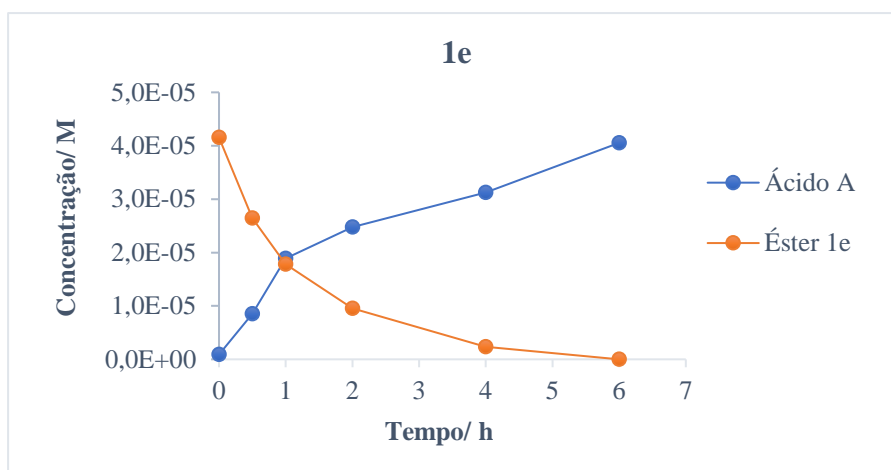


Figura 2.5. Representação da hidrólise do éster 4-nitrobenzoato de heptilo, 1e, (laranja) e respectiva formação de ácido 4-nitrobenzóico, A, (azul) durante 6h.

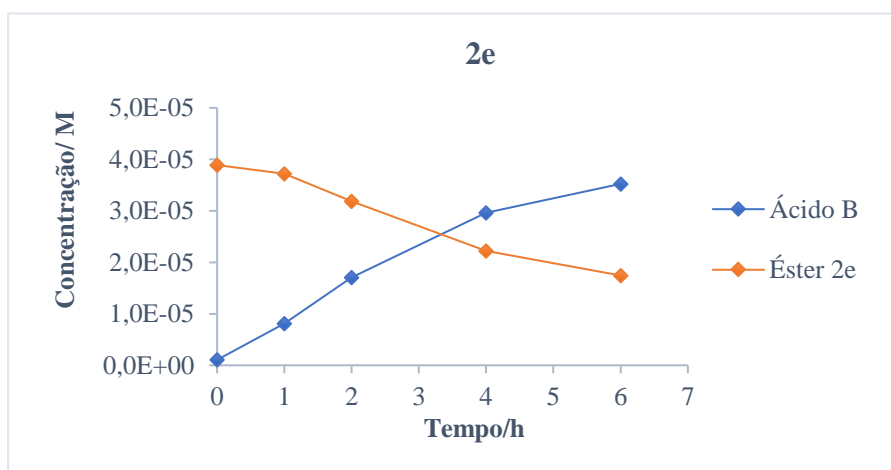


Figura 2.6. Representação da hidrólise do éster 3,5-dinitrobenzoato de heptilo, 2e, (laranja) e respectiva formação de ácido 3,5-dinitrobenzóico, B, (azul) durante 6h.

Nas Figuras 2.5 e 2.6 observou-se uma diminuição na concentração de éster em simultâneo com um aumento da concentração de ácido (1:1), pelo que se seguiu o progresso da reação pela decomposição do éster, que corresponde quantitativamente à percentagem de degradação de éster (Equação 4.1 do Subcapítulo 4.4.1). Além disso, os estudos de estabilidade no plasma humano foram interpretados a partir das constantes de velocidade de reação de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) e dos tempos de semivida ($t_{1/2}$) como se encontram na Tabela 2.13. Os k_{obs} foram obtidos a partir de ensaios em triplicado para cada éster e correspondem ao declive da reta do gráfico \ln (concentração de éster) *versus* tempo (h) (Equação 4.2 do Subcapítulo 4.4.1). E os valores de $t_{1/2}$ foram obtidos a partir dessas constantes (Equação 4.3 do Subcapítulo 4.4.1). Também se determinaram as percentagens de degradação dos ésteres (Tabela 2.13).

É de notar que os ensaios de estabilidade plasmática foram realizados durante 72h devido à natureza biológica do meio. No caso de $t_{1/2}$ superiores a 72h, os resultados foram estimados.

Na Tabela 2.13 encontram-se os resultados de estabilidade em plasma humano dos ésteres.

Tabela 2.13. Estudo da hidrólise enzimática. Constantes de velocidade de reação e tempos de semivida e as respectivas percentagens de degradação de éster de BA em plasma humano à temperatura 37°C durante 24h, n=3 – número de amostras para cada composto. Concentração inicial de éster - 5×10^{-4} M com 2% de ACN.

Composto	X	R	$k_{obs} \times 100$ (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	% Degradação de éster		
					24h	72h	
1a	4-NO ₂	C ₃ H ₇	189,40 ± 1,48	0,37 ± 0,030	97	-	
1b		C ₄ H ₉	197,86 ± 3,79	0,35 ± 0,0067	101	-	
1c		C ₅ H ₁₁	185,22 ± 24,10	0,38 ± 0,047	100	-	
1d		C ₆ H ₁₃	68,59 ± 12,08	1,03 ± 0,17	99	-	
1e		C ₇ H ₁₅	79,16 ± 11,09	0,89 ± 0,12	98	-	
1f		C ₈ H ₁₇	78,51 ± 5,21	0,89 ± 0,058	95	-	
1g		C ₉ H ₁₉	23,39 ± 1,03	2,97 ± 0,13	92	-	
1h		C ₁₀ H ₂₁	6,86 ± 0,10	10,11 ± 0,15	56	82*	
1i		C ₁₁ H ₂₃	3,89 ± 0,12	17,96 ± 0,56	29	82	
1j		C ₁₂ H ₂₅	3,56 ± 0,05	19,46 ± 0,27	28	73	
1k		C ₁₃ H ₂₇	2,76 ± 0,11	25,56 ± 1,04	32	65	
1l		C ₁₄ H ₂₉	1,78 ± 0,02	38,90 ± 0,35	25	46	
2a		3,5- <i>d</i> NO ₂	C ₃ H ₇	17,51 ± 1,76	3,98 ± 0,40	103	-
2b			C ₄ H ₉	9,68 ± 0,12	7,16 ± 0,09	111	-
2c	C ₅ H ₁₁		14,55 ± 3,65	4,95 ± 1,13	115	-	
2d	C ₆ H ₁₃		15,72 ± 1,02	4,42 ± 0,29	107	-	
2e	C ₇ H ₁₅		20,73 ± 4,17	3,41 ± 0,69	100	-	
2f	C ₈ H ₁₇		9,07 ± 0,26	7,65 ± 0,22	106	-	
2g	C ₉ H ₁₉		3,74 ± 0,24	19,12 ± 1,16	105	-	
2h	C ₁₀ H ₂₁		2,58 ± 0,18	25,98 ± 1,08	79	97	
2i	C ₁₁ H ₂₃		1,56 ± 0,14	44,65 ± 4,28	55	76	
2j	C ₁₂ H ₂₅		1,34 ± 0,11	51,93 ± 4,12	51	90	
2k	C ₁₃ H ₂₇		1,12 ± 0,05	61,91 ± 2,90	45	86	
2l	C ₁₄ H ₂₉		0,97 ± 0,23	74,09 ± 18,66	22	83	

*Percentagem de degradação de éster às 48h

Tendo em conta que os compostos devem ser estáveis durante algumas horas para sobreviverem à fase de transporte, consideraram-se como compostos estáveis os ésteres de BA que tiveram tempos de semivida igual ou superiores a 3h. Deste modo, verificou-se que todos os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo e de 4-nitrobenzoatos de alquilo com grupos nonilo a tetradecilo (**1g** a **1l**) foram estáveis em plasma humano (Tabela 2.13).

Nos ésteres 3,5-dinitrobenzoatos, o composto menos estável foi o 3,5-dinitrobenzoato de heptilo, **2e** ($t_{1/2} = 3,41$ h) que apresentou o valor de k_{obs} mais elevado ($k_{obs} = 2,07 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$) e o mais estável foi o 4-nitrobenzoato de tetradecilo, **2l** ($t_{1/2} = 74,09$ h) que apresentou o valor de k_{obs} mais baixo ($k_{obs} = 9,7 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$). Na série de 4-nitrobenzoatos, o composto menos estável foi o 4-nitrobenzoato de butilo, **1b** ($t_{1/2} = 0,35$ h) que apresentou o valor de k_{obs} mais elevado ($k_{obs} = 1,89 \text{ h}^{-1}$) e o mais estável foi o 4-nitrobenzoato de tetradecilo, **1l** ($t_{1/2} = 38,90$ h) que apresentou o valor de k_{obs} mais baixo ($k_{obs} = 1,78 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$).

Com base nestes resultados, os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo hidrolisaram mais lentamente (k_{obs} 4-NO₂ > k_{obs} 3,5-*d*NO₂) pelo que apresentaram maior estabilidade em plasma humano do que os 4-nitrobenzoatos de alquilo (Tabela 2.13). Assim, mostraram ser piores substratos para as enzimas plasmáticas do que os 4-nitrobenzoatos de alquilo. Ademais, observa-se que o facto de os ésteres possuírem dois grupos nitro em vez de um compromete a velocidade de hidrólise em meio biológico. Isto sugere que possivelmente a existência de dois grupos nitro nas posições 3 e 5 do

anel aromático provocam um efeito estereoquímico que impossibilita a interação entre o grupo carbonilo dos ésteres com a enzima, o que condiciona a sua hidrólise neste meio.

2.3.3. Relação Qualitativa - Estabilidade Química/Estabilidade Enzimática

Os resultados dos estudos de estabilidade mostraram que a reação de hidrólise enzimática foi muito mais rápida que a hidrólise química em tampão fosfato a pH 7,4, uma vez que quando se compararam as percentagens de degradação de éster presentes nas Tabelas 2.12 e 2.13 observou-se que, durante 24h como 72h, as percentagens de degradação de éster por hidrólise química foram pelo menos 10 vezes inferiores face às percentagens de degradação de éster por hidrólise enzimática, pelo que foi possível desprezar a hidrólise química no estudo de estabilidade em plasma humano.

Analisando os resultados do composto **2a**, verificou-se que este composto é instável em tampão de fosfato a pH 7,4 e estável em plasma humano. Na hidrólise química, o éster apresentou uma constante de velocidade de reação inferior e tempo de semivida superior ($k_{obs} = 1,27 \times 10^{-2} \pm 0,0003 \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2} = 54,49 \pm 1,35 \text{ h}$) aos valores obtidos na hidrólise enzimática ($k_{obs} = 1,75 \times 10^{-1} \pm 0,018 \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2} = 3,99 \pm 0,40 \text{ h}$) e as percentagens de degradação de éster por hidrólise química foram pelo menos 10 vezes inferiores comparativamente com as percentagens de degradação de éster na hidrólise enzimática. Estes resultados sugerem que na estabilidade em plasma humano a hidrólise enzimática é significativamente mais importante que a hidrólise química.

Quando se analisam os resultados da hidrólise química e enzimática de **2a** e **2d** (Tabelas 2.12 e 2.13) verificou-se a premissa anterior quando se comparam as percentagens de degradação de éster obtidas às 6h mencionadas na Tabela 2.14.

Tabela 2.14. Percentagem de degradação de 3,5-dinitrobenzoato de propilo (**2a**) e hexilo (**2d**) em hidrólise química e enzimática às 6h.

Composto	% Degradação de Éster	
	Hidrólise Química	Hidrólise Enzimática
2a	6,98	68,50
2d	7,16	70,12

Deste modo, a hidrólise enzimática foi também a principal componente hidrolítica dos compostos estudados.

2.3.4. Conclusões Gerais

Um fármaco projetado para atuar em macrófagos infetados com *M. tuberculosis* deve sobreviver ao transporte em plasma para conseguir alcançar o alvo de ação¹⁰³.

Os 4-nitrobenzoatos de alquilo hidrolisaram mais lentamente em tampão fosfato a pH 7,4, pelo que foram mais estáveis comparativamente com os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo, uma vez que apresentam menos substituintes eletroatratores no anel aromático. No entanto, era esperado observar-se a mesma conclusão no estudo de estabilidade em plasma humano, mas neste estudo os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo foram mais estáveis. Ademais, o facto de os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo mostrarem ser mais estáveis indica que estes ésteres foram piores substratos das esterases plasmáticas.

No estudo de estabilidade dos ésteres de BA em plasma humano verificou-se, que o contributo da hidrólise química durante a hidrólise enzimática pode ser desprezado, uma vez que as percentagens de degradação de éster obtidas foram pelo menos 10 vezes inferiores. Desta forma, as constantes de velocidade de reação e os tempos de semivida de cada éster devem-se maioritariamente à atividade das esterasas humanas.

Quanto maior a estabilidade enzimática, menor a probabilidade de o pró-fármaco ser metabolizado ao circular na corrente sanguínea e, por sua vez de poder sobreviver à fase de transporte⁴⁹. Deste modo, os 4-nitrobenzoatos de alquilo **1g** a **1l** (C9 a C14) e os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo **2a** a **2l** (C3 a C14) demonstraram estabilidade compatível com os objetivos de poder atingir as micobactérias sem serem metabolizados pelas esterasas do plasma humano.

2.4. Estudos de Atividade Antimicobacteriana de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos *in vitro*

Depois de demonstrado que a maioria dos ésteres de BA substituídos possuem estabilidade em plasma compatível com a sua sobrevivência no mesmo durante a fase de distribuição no organismo, foi estudada a atividade dos compostos desenvolvidos frente ao *M. tuberculosis*.

Os estudos de atividade antimicobacteriana foram realizados pelo Doutor David Pires do grupo de investigação *Host-Pathogen Interaction* – laboratório da Doutora Elsa Anes da Faculdade de Farmácia Universidade de Lisboa. Os procedimentos experimentais dos estudos de atividade encontram-se descritos no Subcapítulo 4.5 do Procedimento Experimental – Estudos de Estabilidade dos Ésteres de Ácido Benzóico.

Os resultados de atividade foram determinados em concentrações inibitórias mínimas (CIM) e em concentrações bactericidas mínimas (CBM) na estirpe *Mycobacterium. tuberculosis* H37Rv. A partir do método de microdiluição em placas de 96 poços, observou-se o crescimento das micobactérias com os ésteres de BA em estudo através da turvação visível em cada poço e determinaram-se as CIM⁹⁴, em µg/mL e µM, quando a uma dada concentração já não se observou turbidez nos poços. Também se determinaram as CBM⁹⁴, em µg/mL e µM, a partir da menor concentração de compostos que não resultou em crescimento bacteriano visível nas placas.

Valores de CIM elevados significam que a concentração mínima do composto para inibir o crescimento bacteriano é elevada, logo o composto apresenta menor atividade antimicobacteriana.

Quando o valor de CBM é elevado significa que a concentração mínima do composto que resulta do declínio de 99,9% na contagem de colónias é elevada, pelo que o composto é comparativamente um pior agente antimicrobiano.

A isoniazida (INH) foi utilizada como controlo positivo para a inibição do crescimento (fármaco de primeira linha contra a tuberculose).

O estudo da atividade antimicobacteriana teve como objetivo avaliar a atividade de cada éster e relacionar os resultados de atividade com a estrutura química das moléculas.

Os resultados de atividade antimicobacteriana dos ésteres encontram-se na Tabela 2.15.

Tabela 2.15. Atividade Antimicobacteriana dos ésteres de BA substituídos sintetizados testados em *M. tuberculosis* H37Rv. Os resultados da atividade foram representados pela concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida em µg/mL e µM. DMSO (controlo negativo) corresponde à cultura que cresce sem a presença de composto. INH (controlo positivo) corresponde à cultura que cresce com isoniazida no meio.

Composto	X	R	CIM (µg/mL)	CIM (µM)	CBM (µg/mL)	CBM (µM)
1a	4-NO ₂	C ₃ H ₇	160	765	> 160	> 765
1b		C ₄ H ₉	160	717	> 160	> 717
1c		C ₅ H ₁₁	80	337	> 160	> 674
1d		C ₆ H ₁₃	80	318	> 160	> 637
1e		C ₇ H ₁₅	40	151	> 160	> 603
1f		C ₈ H ₁₇	5	18	160	573
1g		C ₉ H ₁₉	5	17	160	545
1h		C ₁₀ H ₂₁	10	33	160	521
1i		C ₁₁ H ₂₃	20	62	160	498
1j		C ₁₂ H ₂₅	40	119	> 160	> 477
1k		C ₁₃ H ₂₇	20	57	> 160	> 458
1l		C ₁₄ H ₂₉	10	28	> 160	> 440
A			H	80	479	> 160
2a	3,5- <i>d</i> NO ₂	C ₃ H ₇	160	629	> 160	> 629
2b		C ₄ H ₉	160	597	> 160	> 597
2c		C ₅ H ₁₁	80	283	160	567
2d		C ₆ H ₁₃	40	135	80	270
2e		C ₇ H ₁₅	2,5	8	40	129
2f		C ₈ H ₁₇	2,5	8	5	15
2g		C ₉ H ₁₉	5	15	5	15
2h		C ₁₀ H ₂₁	5	14	5	14
2i		C ₁₁ H ₂₃	5	14	5	14
2j		C ₁₂ H ₂₅	5	13	5	13
2k		C ₁₃ H ₂₇	5	13	> 160	> 406
2l		C ₁₄ H ₂₉	10	24	> 160	> 392
B			H	80	377	> 160
3a	4-CF ₃	C ₉ H ₁₉	40	121	> 128	> 387
3b		C ₁₀ H ₂₁	128	387	> 128	> 405
C		H	80	242	> 160	> 842
4a	3,5- <i>d</i> CF ₃	C ₁₀ H ₂₁	> 128	> 321	> 128	> 321
D		H	80	310	> 160	> 620
5a	2,3,4,5,6- <i>p</i> F	C ₁₀ H ₂₁	128	363	> 160	> 454
E		H	40	189	> 128	> 604
Controlo Negativo		DMSO	> 160 (> 16%)	> 2048	> 160 (> 16%)	> 2048
Controlo Positivo		INH	0,06	0,438	0,06	0,438

A Tabela 2.15 expressa os resultados quer sob a forma de CIM quer sob a forma de CMB. Em ambos os casos os valores estão expressos em µg/ml (unidade muito usada no campo da microbiologia para expressar atividades) e µM (que pensamos ser mais adequada neste caso, pois estamos a comparar compostos com massa molecular distinta). Através da análise da Tabela 2.15, podemos verificar que a maioria dos compostos apresentaram atividades interessantes quando expressas sob a forma de CIM e quando expressas sob a forma de CBM também são interessantes, mas são mais difíceis de analisar no seu conjunto, uma vez que não foi possível obter resultados precisos para todos os compostos. Da tabela ressaltam os valores obtidos para os derivados

mononitrados e dinitrados, especialmente os ésteres com cadeias alquílicas entre C8 e C11, C13 e C14 para os derivados do ácido 4-nitrobenzóico (**1f** a **1i**, **1k** e **1l**) e os ésteres com cadeias alquílicas entre C7 e C14 para os derivados do ácido 3,5-dinitrobenzóico (**2e** a **2l**). Outra observação que ressalta da tabela é que embora todos os ácidos livres tenham demonstrado atividade, os 4-nitrobenzoatos de alquilo e 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo permitiram na maioria dos casos aumentar essa atividade enquanto que nos ésteres dos derivados fluorados esse efeito geral não foi encontrado.

Numa análise mais profunda da Tabela 2.15 observa-se que os ésteres derivados de propanol e butanol nas séries de 4-nitrobenzoatos de alquilo e 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo (**1a**, **1b**, **2a** e **2b**) foram os ésteres menos ativos (MIC_{1a} 765 μ M, MIC_{1b} 717 μ M, MIC_{2a} 629 μ M e MIC_{2b} 597 μ M) não trazendo a este nível vantagem relativamente aos respetivos ácidos livres (4-nitrobenzóico e 3,5-dinitrobenzóico) que apresentaram CIM_A 479 μ M e CIM_B 377 μ M, respetivamente. Já o composto **3a**, o éster com cadeia alquílica de nove carbonos apresentou uma atividade ligeiramente superior ao respetivo ácido livre (CIM_{3a} 121 μ M vs CIM_C 242 μ M).

Ademais, os 4-nitrobenzoatos de alquilo mais ativos foram os 4-nitrobenzoatos de octilo a undecilo, tridecilo e tetradecilo, **1f** a **1i**, **1k** e **1l** (CIM_{1f} 17 μ M, CIM_{1g} 18 μ M, CIM_{1h} 33 μ M, CIM_{1i} 62 μ M, CIM_{1k} 57 μ M e CIM_{1l} 28 μ M) e nos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo, os compostos 3,5-dinitrobenzoato de heptilo a tetradecilo, **2e** a **2l** (CIM_{2e} 8 μ M, CIM_{2f} 8 μ M, CIM_{2g} 15 μ M, CIM_{2h} 14 μ M, CIM_{2i} 14 μ M, CIM_{2j} 13 μ M, CIM_{2k} 13 μ M e CIM_{2l} 24 μ M).

Moléculas polares têm dificuldades em atravessar as membranas do trato gastrointestinal, resultando numa absorção insuficiente dessas moléculas^{49,56}. Tendo em conta que os ácidos carboxílicos são moléculas polares, uma vez que possuem um grupo funcional polar (COOH), não terão capacidade de atravessar facilmente as membranas das micobactérias e atuarem no *M. tuberculosis* ao contrário dos ésteres.

Não foi possível neste trabalho analisar a estabilidade em tampão fosfato a pH 7,4 e em plasma dos ésteres fluorados, uma vez que as séries destes ésteres foram mais pequenas, o que dificulta a procura de explicações para o facto da abordagem via obtenção do pró-fármaco éster não ter sido tão eficiente como nos compostos nitrados. Uma hipótese a testar é que estes ésteres tenham mais dificuldade em ser hidrolisados e que, portanto, não consigam dar origem ao respetivo ácido carboxílico. De um modo geral e extrapolando para os outros compostos, os ésteres de cadeia mais curta são hidrolisados mais rapidamente. O facto do composto **3a** (C9), que foi o derivado fluorado com cadeia alquílica mais curta, ter demonstrado atividade superior ao respetivo ácido livre parece ir nesse sentido.

Os resultados obtidos a nível do aumento de atividade via esterificação nos nitrobenzoatos de alquilo são concordantes com o estudo realizado por Constantino L. *et al.* (2009), o qual descreve a atividade antimicobacteriana de ésteres derivados de ácido pirazinóico, nomeadamente, pirazinoato de dodecilo (CIM_{C12} 68 – 137 μ M), pirazinoato de tetradecilo (CIM_{C14} 31 – 62 μ M) e pirazinoato de hexadecilo (CIM_{C16} 115 μ M). Também estes ésteres apresentaram melhor atividade antimicobacteriana que o ácido libertado (ácido pirazinóico, CIM_{POA} 1612 μ M). Pelo que os autores concluíram que os ésteres derivados de ácido pirazinóico, tinham potencial para serem alternativas terapêuticas em relação aos fármacos anti-TB utilizados como é o caso do fármaco pirazinamida (CIM_{PZA} 1625 μ M)¹⁰³. Deste modo, os ésteres **1f** (C8) a **1i** (C11), **1k** (C13) e **1l** (C14) e **2e** (C7) a **2l** (C14) também podiam ser considerados como potenciais alternativas terapêuticas anti-TB.

Os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo foram mais ativos que os 4-nitrobenzoatos de alquilo. Este resultado sugere que a introdução de dois grupos nitro contribui para o aumento da atividade.

A atividade antimicobacteriana dos compostos nitrados pode resultar devido a interações entre a molécula e o seu alvo, mas também através da redução catalítica dos grupos nitro por enzimas específicas¹¹¹. É assim possível que *in vivo* o pró-fármaco liberte o ácido livre no interior da bactéria, mas que este seja de seguida metabolizado a outros compostos antes de atuar. Assim, a atividade dos ésteres referidos pode estar associada à sua biorredução por parte de nitrorredutases¹¹¹⁻¹¹³.

É interessante verificar na literatura que vários fármacos com grupos nitro têm sido estudados como potenciais fármacos anti-TB, como é o caso de Pretomanida (PA-824)^{112,114,115}. Este fármaco tem a capacidade de eliminar estirpes MDR-TB bem como atividade promissora no estado latente de TB e efeitos potentes de esterilização em comparação com os fármacos rifampicina e isoniazida^{114,115}.

Os ésteres nitrados deste trabalho apresentaram maior atividade que os restantes. Uma vez que existem compostos nitro que apresentam toxicidade devido à presença destes substituintes, o objetivo seguinte desta dissertação foi a realização de testes de citotoxicidade aplicando os ésteres nitrados em macrófagos THP-1 para avaliar se os mesmos demonstrariam toxicidade sobre as células humanas (Capítulo 2.6 - Citotoxicidade de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos).

No Capítulo 2.5 estabeleceram-se relações estrutura-estabilidade/atividade e relacionaram-se os efeitos da lipofilia/comprimento do grupo alquilo, o efeito dos grupos aceitadores de eletrões no anel aromático e a acidez dos ácidos fracos com a atividade biológica (*p*CIM).

2.4.1. Conclusões Gerais

Os resultados de atividade na estirpe *M. tuberculosis* H37Rv demonstraram que a maioria dos ésteres apresentaram maior atividade que os respetivos ácidos carboxílicos (Tabela 2.15).

Os ésteres mais ativos em cada série de compostos foram os seguintes: 4-nitrobenzoato de octilo a undecilo, tridecilo e tetradecilo, **1f** a **1i**, **1k** e **1l** (CIM_{1f} 17 µM, CIM_{1g} 18 µM, CIM_{1h} 33 µM, CIM_{1i} 62 µM, CIM_{1k} 57 µM e CIM_{1l} 28 µM); 3,5-dinitrobenzoato de heptilo a tetradecilo, **2e** a **2l** (CIM_{2e} 8 µM, CIM_{2f} 8 µM, CIM_{2g} 15 µM, CIM_{2h} 14 µM, CIM_{2i} 14 µM, CIM_{2j} 13 µM, CIM_{2k} 13 µM e CIM_{2l} 24 µM); 4-(trifluorometil)benzoato de nonilo, **3a** (CIM_{3a} 121 µM), 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo, **4a** (CIM_{4a} > 321 µM) e 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo, **5a** (CIM_{5a} 363 µM) (Tabela 2.15).

Os ésteres **2g** a **2j** são compostos muito interessantes, pois apresentaram baixos valores de CIM e ao mesmo tempo apresentaram um valor de CMB que iguala o valor de CIM, pelo que podem ser considerados como possíveis antimicobacterianos bactericidas sobre a estirpe *M. tuberculosis* H37Rv.

2.5. Relações Estrutura-Estabilidade/Atividade de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos

Neste capítulo pretendeu-se relacionar as características estruturais dos ésteres sintetizados com a estabilidade em tampão fosfato a pH fisiológico, a estabilidade às enzimas plasmáticas assim como a atividade contra *M. tuberculosis*. Com essa finalidade discutiram-se vários parâmetros como o efeito da lipofilia/comprimento dos grupos alquila, o efeito dos grupos aceitadores de elétrons no anel aromático e a acidez dos ácidos fracos.

2.5.1. Efeito da Lipofilia

A lipofilia é uma propriedade físico-química importante no desenvolvimento de novos fármacos e desempenha um papel crucial no perfil farmacodinâmico do fármaco e impacto nos parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade)¹⁰⁵.

A lipofilia de um composto é medida por Log P, em que P representa o coeficiente de partição. O coeficiente de partição é definido como a razão das concentrações de um composto neutro em *n*-octanol/água sob condições de equilíbrio^{49,105}. Os compostos hidrofóbicos/lipofílicos apresentam um alto valor de P e dissolvem-se na fase orgânica (*n*-octanol), enquanto que os compostos hidrofílicos têm um baixo valor de P dissolvem-se na fase aquosa⁴⁹. Ademais, o aumento da lipofilia do fármaco promove a sua permeação nas membranas e a absorção oral^{49,56}, pelo que fármacos muito polares ou muito hidrofílicos não atravessam facilmente as membranas celulares da parede intestinal e a sua absorção insuficiente resulta numa biodisponibilidade reduzida⁴⁹.

Para moléculas com estrutura semelhante, em que apenas se varia o comprimento do grupo alquila, quanto maior o número de carbonos, maior a lipofilia das moléculas (valores de Log P aumentam)⁵⁶. Com o aumento da lipofilia deverá também existir um efeito estereoquímico devido à presença de grupos volumosos nos ésteres em estudo, mas este não foi avaliado independentemente.

A lipofilia de um composto tem importância na atividade biológica, pois a afinidade para um ambiente lipofílico facilita 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^{49,105}. Um substituinte volumoso pode agir como um escudo e impedir a interação ideal entre o fármaco e o local de ligação. Por outro lado, um substituinte volumoso pode ter o efeito inverso: facilitar a interação de um fármaco com uma enzima ou um recetor⁴⁹.

Os valores de Log P foram calculados pelo programa ALOGPS 2.1¹¹⁶ como constam na Tabela 4.10 no Subcapítulo 4.6 do Procedimento Experimental – Log P, Constantes de Acidez e Atividade Biológica.

A Figura 2.7 representa o aumento da lipofilia com o aumento do comprimento do grupo alquila (número de carbonos aumenta).

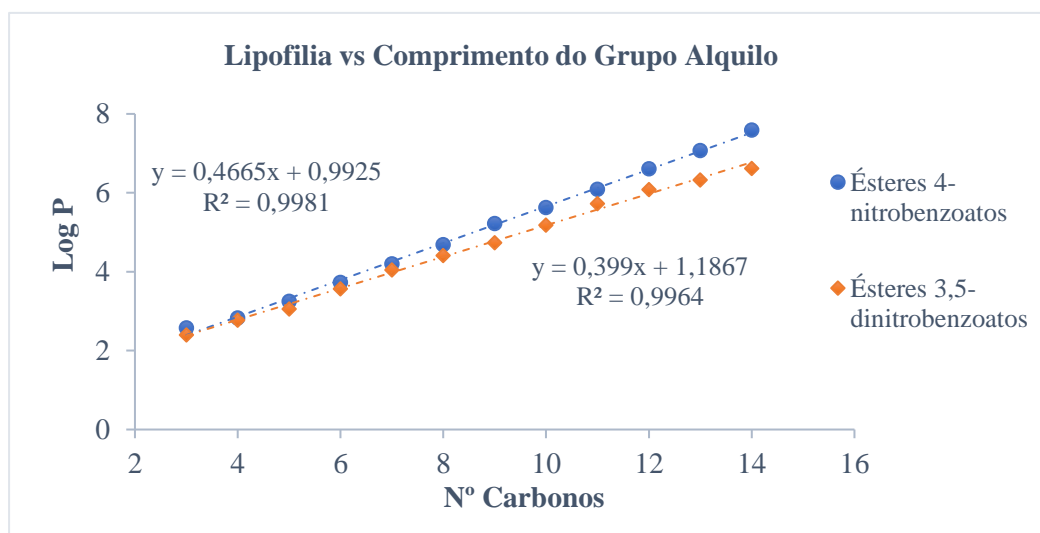


Figura 2.7. Comparação entre a lipofilia (Log P) e o número de carbonos do grupo alquila dos 4-nitrobenzoatos de alquila, 1a a 1l, (azul) e de 3,5-dinitrobenzoatos de alquila, 2a a 2l, (laranja).

A. Estudo de Estabilidade em Tampão Fosfato

As Tabelas 2.12 e 4.10 apresentam as percentagens de degradação de éster resultante da hidrólise química e os valores de Log P dos ésteres em estudo, respetivamente.

Embora não se tenham obtido valores de k_{obs} das reações de hidrólise química dos ésteres em estudo, é possível constatar através da Tabela 2.12 que as percentagens de degradação de éster de ambas as séries de compostos diminuem com o aumento do número de carbonos do grupo alquila e, conseqüentemente com a lipofilia (Log P aumenta). Estes resultados permitem inferir que a velocidade da reação de hidrólise química dos ésteres diminui devido à lipofilia/aumento do comprimento do grupo alquila, pelo que estes fatores contribuem para o aumento da estabilidade dos ésteres em tampão fosfato a pH 7,4 (contribuição da porção alcoólica para o aumento da estabilidade química dos ésteres).

B. Estudo de Estabilidade em Plasma Humano

Estudou-se a influência da lipofilia dos compostos na estabilidade plasmática, usando os valores de Log P e Log k_{obs} presentes nas Tabelas 4.10 e 2.13, respetivamente.

As Figuras 2.8 e 2.9 apresentam a análise do efeito de lipofilia/comprimento do grupo alquila dos 4-nitrobenzoatos de alquila e 3,5-dinitrobenzoatos de alquila, respetivamente, na estabilidade enzimática. Mais especificamente, a tendência decrescente da velocidade de hidrólise com o aumento da lipofilia para cada série de ésteres.

B1. 4-nitrobenzoatos de alquilo

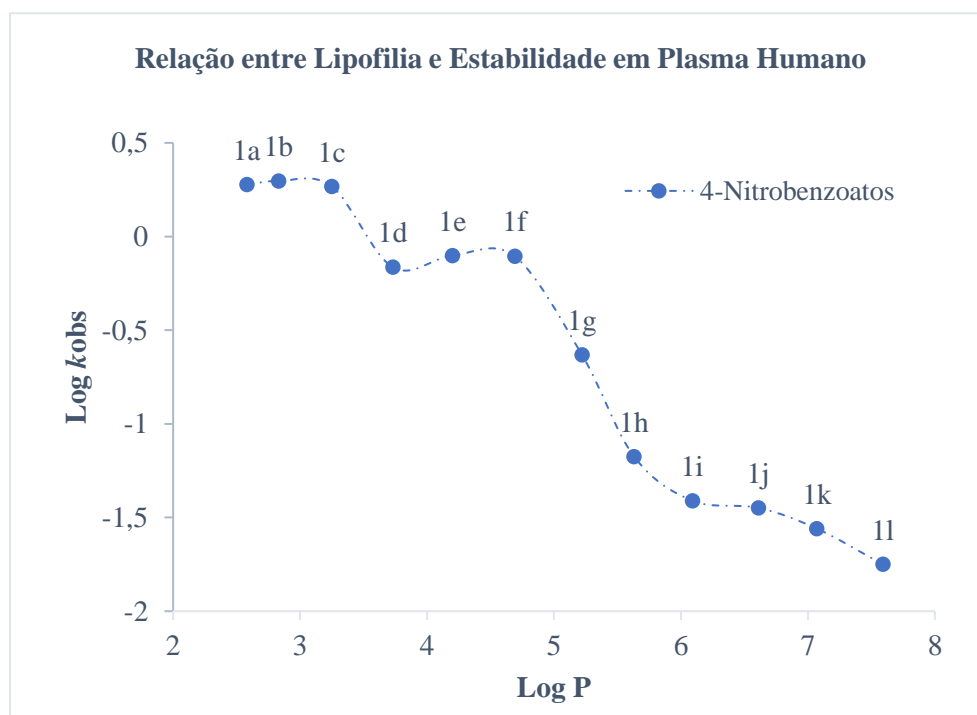


Figura 2.8. Influência da lipofilia (Log P) na estabilidade dos 4-nitrobenzoatos de alquilo em plasma humano.

Através da análise da Figura 2.8 e Tabela 2.13, pode observar-se uma tendência decrescente entre a lipofilia e as constantes de velocidade dos 4-nitrobenzoatos de alquilo, sendo, no entanto, mais acentuada de **1f** (C8) a **1l** (C14) do que de **1a** (C3) a **1f** (C8). Nos ésteres de cadeia alquílica curta de **1a** (C3) a **1c** (C5) e **1d** (C6) a **1f** (C8) observa-se uma ligeira tendência crescente entre a lipofilia e as constantes de velocidade.

Na série 1, o composto hidrolisado mais rapidamente foi o 4-nitrobenzoato de butilo, **1b** ($t_{1/2} = 0,35h$) que apresentou o valor de k_{obs} mais elevado ($k_{obs} = 1,98 h^{-1}$) e menor lipofilia (Log P 2,83) e o compostos hidrolisado mais lentamente foi o 4-nitrobenzoato de tetradecilo, **1l** ($t_{1/2} = 38,90 h$) que apresentou o valor de k_{obs} mais baixo ($k_{obs} = 1,78 \times 10^{-2} h^{-1}$) e maior lipofilia (Log P 7,59). Deste modo, quanto maior a lipofilia, menor é a velocidade de reação de hidrólise e, conseqüentemente, maior a estabilidade enzimática neste grupo de ésteres (Tabela 2.13).

Analisando o grupo de ésteres **1a** (C3) a **1f** (C8), observa-se que as constantes de velocidade aumentam com o aumento da lipofilia de **1a** (C3) a **1c** (C5) e de **1d** (C6) a **1f** (C8), tendo-se verificado um decréscimo nas constantes de velocidade nos ésteres com os grupos hexilo a octilo comparativamente com os grupos propilo a pentilo e o valor máximo de constante de velocidade no éster com o grupo butilo. Estes resultados foram observados por outro autor, mais especificamente num estudo realizado por Valente E. sobre a variação do número de carbonos do grupo alquilo de benzoatos não substituídos de etilo a butilo, hexilo e octilo com as constantes de velocidade de reação em plasma humano. Na hidrólise em plasma, o autor observou um valor máximo de constante de velocidade na hidrólise do benzoato de butilo e depois um decréscimo para o benzoato de hexilo¹⁰⁸. Ademais, estes resultados são concordantes num estudo efetuado por Jordan M. *et al.* (1998)¹¹⁷ sobre a estabilidade de ésteres derivados de oxprenolol com cadeias alquílicas curtas (acetilo a pentilo) em plasma humano (30%) que observaram que a velocidade

de hidrólise dos ésteres diminui com o aumento da lipofilia devido ao aumento do comprimento do grupo alquilo.

Os ésteres 4-nitrobenzoatos mais lipofílicos (C9 a C14) mostraram ser os compostos mais estáveis que os ésteres de cadeia alquílica curta (C3 a C8) em plasma humano, o que é compatível com os resultados de um estudo realizado por Constantino L. *et al.* (2009) que compara a estabilidade de ésteres do ácido pirazinóico em plasma humano com a sua lipofilia¹⁰³. Neste estudo conclui-se que os ésteres mais lipofílicos, nomeadamente com grupos alquilo dodecilo (Log P 4,55), tetradecilo (Log P 5,46) e hexadecilo (Log P 5,85) apresentam valores inferiores de k_{obs} nomeadamente 42×10^3 , 31×10^3 e $14,9 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$, respetivamente, em comparação com o éster com o grupo butilo (Log P 0,9) com $k_{obs} 418 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$, o que indica que os ésteres com maior lipofilia são mais estáveis em plasma humano que os ésteres menos lipofílicos (ésteres com cadeia alquílica curta).

B2. 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo

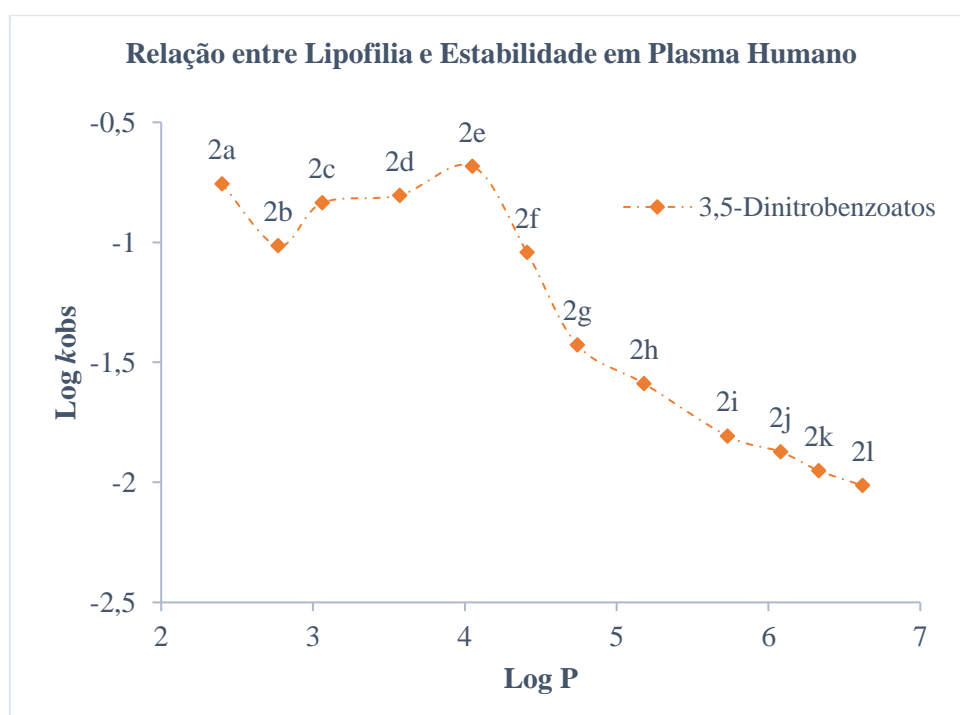


Figura 2.9. Influência da lipofilia (Log P) na estabilidade dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo em plasma humano.

Através da análise da Figura 2.9, pode observar-se duas zonas. Uma primeira zona onde existe uma ligeira tendência crescente de **2a** (C3) a **2e** (C7), sendo visível a existência de um máximo pouco acentuado em **2e** (C7) e uma segunda zona com tendência decrescente acentuada de **2f** (C8) a **2l** (C14).

Observando a Figura 5.3 e a Tabela 3.3, o composto hidrolisado mais rapidamente foi o 3,5-dinitrobenzoato de heptilo, **2e** ($t_{1/2} = 3,41 \text{ h}$), apresentando o valor de k_{obs} mais elevado ($k_{obs} = 2,07 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$) e menor lipofilia (Log P 4,05) e o composto hidrolisado mais lentamente foi o 3,5-dinitrobenzoato de tetradecilo, **2l** ($t_{1/2} = 79,09 \text{ h}$) com o valor de k_{obs} mais baixo ($k_{obs} = 9,7 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$) e maior lipofilia (Log P 6,62).

Através da análise de **2a** (C3) a **2e** (C7) na Figura 2.9 observou-se que existe um ligeiro aumento da velocidade de hidrólise (k_{obs} aumentam) com o aumento da lipofilia nos ésteres com grupos

butilo a heptilo. Estes resultados foram observados anteriormente para ésteres do ácido benzóico, nicotínico e pirazinóico onde também se observou um máximo a comprimentos de cadeia alquílica semelhantes¹⁰⁸. No entanto, vão contra os resultados de um estudo efetuado por Jordan M. *et al.* (1998)¹¹⁷ sobre a estabilidade de ésteres derivados de oxprenolol com cadeias alquílicas curtas (acetilo a pentilo) em plasma humano conclui que o aumento da lipofilia/comprimento do grupo alquilo (número de carbonos aumenta) diminui a velocidade de hidrólise dos ésteres. Os autores justificam os seus resultados concluindo que a taxa de hidrólise reduzida dos ésteres deve-se à interação entre os ésteres e as enzimas que poderá ser desfavorecida com o aumento da lipofilia devido ao aumento do comprimento do grupo alquilo. A realização de *docking* molecular para explorar a interação entre fármaco e enzima poderia contribuir para a explicação da velocidade da hidrólise enzimática dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo com cadeia alquílica curta ter um máximo e depois diminuir com a lipofilia dos compostos.

Os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo mais lipofílicos (C8 a C14) mostraram ser compostos mais estáveis que os ésteres hidrofílicos em plasma humano (Figura 5.3). Estes resultados são concordantes com os resultados de um estudo realizado por Constantino L. *et al.* (2009)¹⁰³ quando se compara a estabilidade de ésteres do ácido pirazinóico mais lipofílicos (C12, C14 e C16) com o éster hidrofílico (C4), onde se concluiu que o aumento da lipofilia desses ésteres aumenta a estabilidade enzimática dos mesmos frente não só ao plasma como também ao homogenato de fígado, também ele rico em esterases. Deste modo, pode-se inferir que a estabilidade dos 3,5-dinitrobenzoatos de octilo a tetradecilo (**2f** a **2l**) em plasma humano deve-se ao facto destes ésteres apresentarem lipofilia elevada.

C. Estudo da Atividade Antimicobacteriana

Nos estudos SAR, a atividade antimicobacteriana é representada pela atividade biológica. A atividade biológica (*p*CIM) representa-se pelo logaritmo do inverso da concentração inibitória mínima ($\log [1/\text{CIM}]$)⁴⁹, como representado na Tabela 4.10.

Observando a Tabela 2.15, os ésteres que demonstraram maior atividade foram os 4-nitrobenzoatos de octilo a undecilo, tridecilo e tetradecilo, **1f** a **1i**, **1k** e **1l** (Log P_{1f} 4,69, Log P_{1g} 5,22, Log P_{1h} 5,63, Log P_{1i} 6,09, Log P_{1k} 7,07 e Log P_{1l} 7,59) e os 3,5-dinitrobenzoatos de heptilo a tetradecilo, **2e** a **2l** (Log P_{2e} 4,05; Log P_{2f} 4,41; Log P_{2g} 4,74; Log P_{2h} 5,18; Log P_{2i} 5,73; Log P_{2j} 6,08, Log P_{2k} 6,33 e Log P_{2l} 6,62).

Para uma melhor análise dos resultados, observaram-se as curvas obtidas de acordo com a tendência crescente ou decrescente da atividade antimicobacteriana com o aumento da lipofilia para cada série de ésteres (Figuras 2.10 e 2.11).

C1. 4-nitrobenzoatos de alquilo

A Figura 2.10 descreve a relação entre a lipofilia e a atividade antimicobacteriana dos 4-nitrobenzoatos de alquilo.

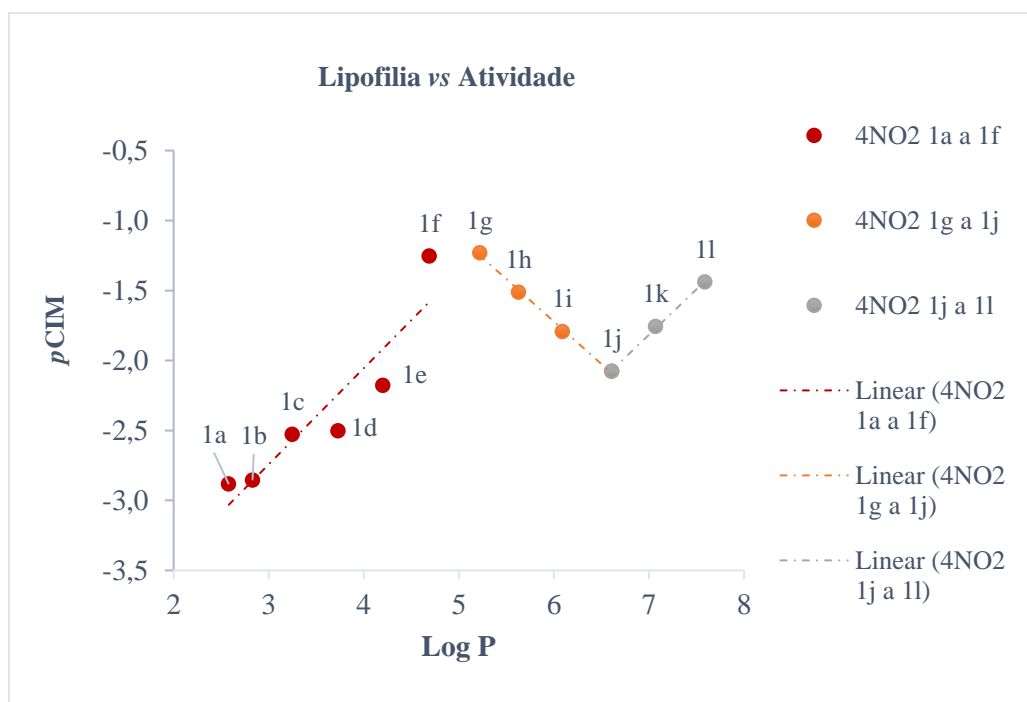


Figura 2.10. Influência da lipofilia dos 4-nitrobenzoatos de alquila hidrofílicos **1a** a **1f** (C3 a C8) (vermelho), lipofílicos **1g** a **1j** (C9 a C12) (laranja) e **2j** a **2l** (C12 a C14) (cinzento) em *M. tuberculosis* H37Rv.

Na Figura 2.10 observou-se que existiu linearidade entre o aumento da lipofilia e da atividade antimicobacteriana nos ésteres **1a** (C3) a **1f** (C8) com Log P_{1a} 2,58, Log P_{1b} 2,83, Log P_{1c} 3,25, Log P_{1d} 3,73, Log P_{1e} 4,20 e Log P_{1f} 4,69 e nos ésteres mais lipofílicos **1j** (C12) a **1l** (C14) com Log P_{1j} 6,61, Log P_{1k} 7,07 e Log P_{1l} 7,59. O aumento da atividade destes ésteres pode ser explicado pela maior capacidade de penetração dos ésteres nas membranas das micobactérias devido ao aumento da sua lipofilia e o que permite as esterases micobacterianas hidrolisarem os ésteres após a ingestão celular. Além disso, também se observou uma diferença acentuada na atividade do composto **1e** (C7) para o composto **1f** (C8). Este resultado indica que o máximo observado correspondente ao composto **1f**, sugere que a lipofilia deste composto (Log P_{1f} 4,69) representa o valor da lipofilia ótima nesta série de ésteres.

A atividade dos ésteres **1g** (C9) a **1j** (C12) com valores Log P_{1g} 5,22 a Log P_{1j} 6,61 diminuiu com o aumento da lipofilia (Figura 2.10). Possivelmente estes compostos lipofílicos (C9 a C12) difundem-se dificilmente nas membranas celulares bacterianas, uma vez que em a solubilidade dos ésteres é reduzida em água devido à elevada lipofilia dos ésteres¹⁰⁴. Logo a difusão dos ésteres através da parede celular bacteriana é dificultada e compromete a sua atividade^{56,57,104}. Era de esperar que os ésteres **1j** (C12) a **1l** (C14) apresentassem o mesmo comportamento que os ésteres **1g** a **1j**, uma vez que os ésteres **1j** a **1l** ultrapassam as condições de lipofilia ótima (Log P ~5). No entanto, a sua atividade aumenta com o aumento da lipofilia.

Estes resultados são compatíveis com um estudo realizado por Constantino L. *et al.* (2009) que compara a atividade antimicobacteriana dos ésteres do ácido pirazinóico com a sua lipofilia¹⁰³. Neste estudo conclui-se que os ésteres mais lipofílicos, nomeadamente com grupos alquila dodecilo (Log P 4,55) tetradecilo (Log P 5,46) e hexadecilo (Log P 5,85) apresentam atividade muito revelante (MIC_{C12} 68 – 137 µM, MIC_{C14} 31 – 62 µM e MIC_{C16} 115 µM) com o aumento da lipofilia dos ésteres¹⁰³. Uma possível explicação poderá ser a facilidade de hidrólise dos ésteres pelas esterases micobacterianas. É sabido que o *Mycobacterium tuberculosis* tem um

metabolismo lipídico muito desenvolvido^{15,84,118} compatível com a hidrólise facilitada de ésteres muito lipofílicos.

C2. 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo

A relação entre a lipofilia e a atividade antimicobacteriana dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo está representada na Figura 2.11.

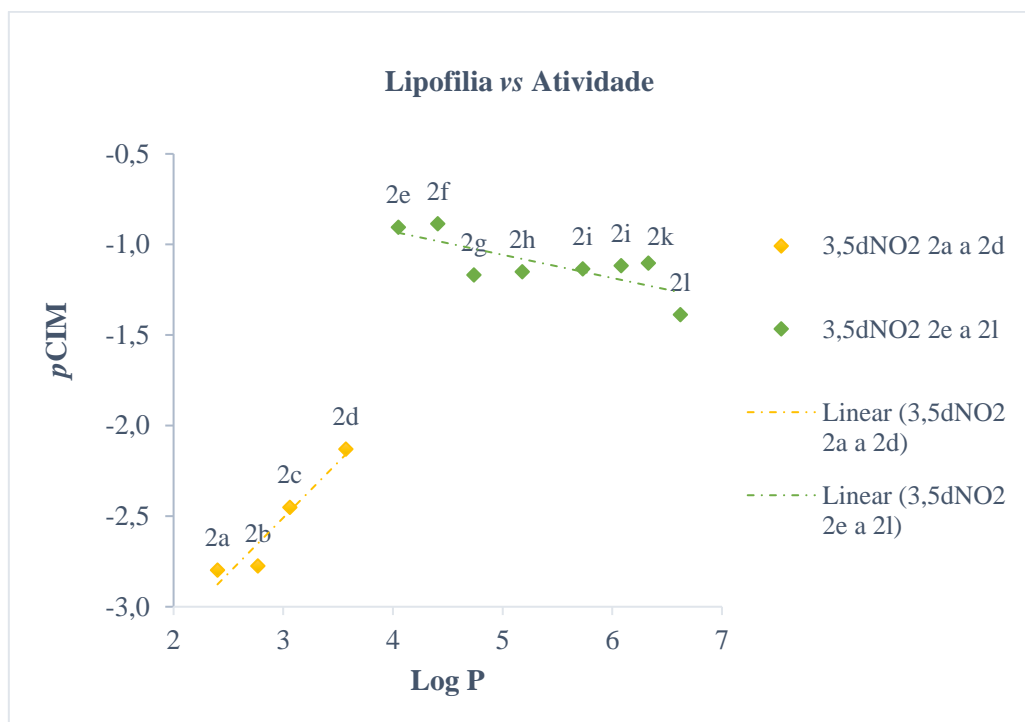


Figura 2.11. Influência da lipofilia (Log P) na atividade dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo hidrofílicos **2a** a **2d** (C3 a C6) (amarelo) e **2e** a **2l** (C7 a C14) (verde) em *M. tuberculosis* H37Rv.

Analisando os resultados representados na Figura 2.11, nos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo verificou-se que nos ésteres hidrofílicos **2a** (C3) a **2d** (C6) a atividade aumentou linearmente com a lipofilia (Log P_{2a} 2,40; Log P_{2b} 2,77; Log P_{2c} 3,06 e Log P_{2d} 3,57). Desta série de compostos, o éster **2d** será o éster com maior capacidade de penetrar as membranas celulares das micobactérias, uma vez que apresenta maior lipofilia.

Também se observou uma discrepância nos valores da atividade do composto **2d** (C6) para o composto **2e** (C7), o que indica que o composto **2e** (ponto máximo na Figura 2.11) corresponde ao éster cujo valor de lipofilia (Log P_{2e} 4,05) representa a lipofilia ótima nesta série de ésteres.

Além disso, também é visível um comportamento decrescente pouco acentuado entre a lipofilia e a atividade antimicobacteriana nos restantes ésteres lipofílicos e mais ativos.

Em cada série de ésteres observou-se uma variação da atividade com a lipofilia (aumento do número de carbonos do grupo alquilo), que pode ser explicada por alguns ésteres terem melhor afinidade com as esterases micobacterianas que os restantes e outros terem maior facilidade em atravessar as membranas.

Estes resultados são compatíveis com um estudo realizado por Zhang Y. *et al.* (2008) sobre a atividade antimicobacteriana de benzoatos não substituídos, em que se observa também uma

variação nos valores de atividade com a lipofilia/comprimento do grupo alquilo. Os investigadores justificam esses resultados devido a diferentes permeações dos compostos para dentro das micobactérias e diferentes taxas de hidrólises¹⁰⁰. Deste modo, os ésteres estudados terão diferente permeabilidade nas membranas das micobactérias e diferentes taxas de hidrólise enzimática.

Os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo foram os ésteres mais ativos contra *M. tuberculosis* H37Rv, pelo que estes ésteres terão possivelmente maiores taxas de hidrólise e maior permeabilidade nas membranas das micobactérias comparativamente com os 4-nitrobenzoatos de alquilo e desta forma, apresentam maior atividade antimicobacteriana. Não deve ser esquecido que os dois ácidos livres correspondentes (A e B) demonstraram atividades semelhantes.

2.5.2. Efeito dos Substituintes Aceitadores de Eletrões no Anel Aromático

Os efeitos eletrônicos de vários substituintes têm efeito na ionização ou polaridade de um fármaco⁴⁹. A distribuição de eletrões na estrutura do fármaco terá um efeito na forma como o fármaco se liga ao alvo e afeta a sua atividade⁵⁷. Para atingir o seu alvo de ação, o fármaco precisa de passar pelas membranas biológicas. Como regra geral, os fármacos não polares e polares na sua forma não ionizada são geralmente mais facilmente transportados para atravessar as membranas do que fármacos polares e fármacos nas suas formas ionizadas. Em suma, a polaridade pode afetar a sua permeabilidade nas membranas celulares ou a sua interação com o local de ligação na enzima⁴⁹.

Todos os compostos estudados nesta tese são derivados do ácido benzóico com diferentes substituintes no anel aromático. Os substituintes 4-nitro (NO₂), 3,5-dinitro, 4-trifluorometilo (CF₃), 3,5-di(trifluorometilo) e 2,3,4,5,6-pentafluoro (*p*F) são grupos aceitadores de eletrões e desativadores do anel aromático (ordem crescente do poder desativador: F < CF₃ < NO₂)¹¹⁹. A introdução de um ou mais substituintes no anel benzénico como grupos nitro promove a existência de efeitos indutivos e mesoméricos (ressonância) dependendo da sua posição *para* (4-nitrobenzoatos) ou *meta* (3,5-dinitrobenzoatos) no anel aromático^{49,93}.

A. Estudo de Estabilidade em Tampão Fosfato

Assumindo que a hidrólise dos derivados estudados ocorre por um mecanismo B_{AC}2, a introdução de grupos aceitadores de eletrões no anel aromático, aumenta a taxa de hidrólise⁴⁹, como é o caso dos substituintes nitro. Dado que estes substituintes tornam o anel aromático deficiente em eletrões¹⁰⁶, a deslocalização eletrónica é direcionada para o grupo nitro devido a efeitos de ressonância e indutivos que retiram densidade eletrónica ao grupo carbonilo⁹³. Deste modo, estes efeitos tornam previsivelmente o grupo carbonilo da molécula mais reativo. Consequentemente, o átomo de carbono do grupo carbonilo torna-se mais eletrofílico e dá-se mais facilmente o ataque no átomo de carbono deste grupo por parte de um nucleófilo¹¹⁹, o que favorece o aumento da taxa de hidrólise básica⁴⁹.

Admitindo que a hidrólise dos derivados estudados ocorre por um mecanismo B_{AC}2, comparando as duas séries de ésteres, verificou-se que os 4-nitrobenzoatos de alquilo apresentaram percentagens de degradação de éster inferiores às dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo, pelo que os primeiros são mais estáveis em tampão fosfato a pH 7,4 (Tabela 2.12). Estes resultados sugerem que a introdução de dois grupos nitro no anel aromático e a sua posição (3 e 5) que originam um efeito indutivo são os fatores eletrónicos que promovem a hidrólise destes ésteres.

Comparando as duas séries de ésteres, verificou-se que os 4-nitrobenzoatos de alquilo apresentaram percentagens de degradação de éster inferiores às dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo, pelo que os primeiros são mais estáveis em tampão fosfato a pH 7,4 (Tabela 2.13). Estes resultados podem ser justificados devido à introdução de grupos nitro no anel aromático, uma vez que quando se comparam os ésteres com a mesma porção alcoólica, os ésteres com dois grupos nitro são menos resistentes à hidrólise química.

B. Estudo de Estabilidade em Plasma Humano

A butirilcolinestrerase é a principal enzima responsável pela hidrólise de ésteres no plasma humano, estando presente numa concentração de 5 mg/L⁸¹. 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 éster⁸¹.

Tendo em conta o mecanismo de hidrólise pela BuChE que envolve a formação de um intermediário tetraédrico entre o nucleófilo Ser- e o substrato⁸³ será de admitir que os grupos eletroatratores como os grupos nitro facilitem a reação de hidrólise. No entanto, nas reações enzimáticas, o modo como o substrato encaixa no centro ativo é muitas vezes mais importante que os efeitos eletrónicos.

Admitindo que a hidrólise enzimática teria um mecanismo semelhante à hidrólise básica, era esperado que tal como no estudo da estabilidade química que os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo (moléculas com dois grupos eletroatratores na porção aciloxílica) seriam hidrolisados mais rapidamente e menos estáveis em tampão fosfato devido aos efeitos indutivos existente nestas moléculas. No entanto, verificou-se o contrário e esta série de ésteres possui maior estabilidade enzimática, o que provavelmente não terá a ver com efeitos eletrónicos, mas sim com menor afinidade para o substrato.

C. Estudo da Atividade Antimicobacteriana

Os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo apresentaram maior atividade *in vitro* que os 4-nitrobenzoatos de alquilo, os quais por sua vez apresentam uma atividade superior ao ácido benzóico¹⁰⁹.

Não é conhecido o mecanismo da atividade antituberculosa dos derivados nitrados do ácido benzóico (ou do próprio ácido benzóico), pelo que nesta fase é difícil racionalizar o efeito dos grupos nitro sobre a atividade exceto que de facto têm um efeito claramente positivo sobre a mesma.

Duas hipóteses podem ser levantadas, ou (i) os derivados dos ácidos fracos pelo facto de acidificarem o interior das micobactérias conseguem ter atividade contra o MT, atividade essa que provavelmente estaria relacionada com a facilidade de entrada dos compostos nas células, a ativação dos mesmos pelas esterases bacterianas e o pK_a dos ácidos libertados, ou (ii) os compostos possuem atividade *per se*.

O facto de termos obtido ésteres de ácidos com um pK_a inferior ao do ácido 3,5-dinitrobenzóico que demonstraram uma atividade inferior à dos derivados dinitrados (ver próximo ponto – 2.5.3) parece argumentar a favor da ação dos compostos nitrados sobre um alvo específico ainda não identificado.

Curiosamente, um estudo realizado por Miller M. J. *et al.* (2014) com ésteres de derivados de ácido benzóico com substituintes nitro e trifluorometilo (nas posições 1 e 3 do anel aromático)

demonstrou que o benzoato de benzilo dissustituído com grupos nitro apresentou maior atividade que o benzoato de benzilo dissustituído com os grupos NO₂ e CF₃ contra *M. tuberculosis*¹⁰⁶, o que é compatível com a nossa hipótese no sentido que provavelmente o grupo nitro terá um papel importante no seu mecanismo de ação, o qual será distinto do dos outros ácidos fracos.

2.5.3. Efeito da Acidez

Um efeito que poderá influenciar a atividade antimicobacteriana é o efeito da acidez dos ácidos BA substituídos libertados na reação de hidrólise dos ésteres estudados. De facto, vários ácidos fracos têm demonstrado atividade contra o *M. tuberculosis*⁵⁸ e seria interessante relacionar o pK_a dos ácidos com a atividade estudando uma gama de compostos com pK_a claramente inferior aos compostos estudados por Zhang *et al.* (2003)⁵⁸.

Para ajustar o equilíbrio de ionização do composto, pode-se adicionar grupos aceitadores de elétrons ou doadores de elétrons (os grupos aceitadores de elétrons baixam o pK_a, tornando os ácidos mais ionizáveis e as bases menos ionizáveis; o oposto ocorre para os grupos doadores de elétrons)⁵⁶.

A introdução dos grupos aceitadores ou doadores de elétrons têm influência na polaridade das moléculas. Consequentemente, as alterações eletrônicas modificam as estabilidades relativas das espécies, pelo que podem fornecer informação sobre como os valores de pK_a variam¹²⁰. Por exemplo, o valor do pK_a do ácido será aumentado quando um substituinte tende a estabilizar mais um cátion do que a molécula neutra correspondente, ou mais uma molécula neutra que o respetivo anião derivado. Por outro lado, o aumento da estabilização de um anião em relação às espécies neutras é fortalecedor de ácidos ou enfraquecedor de bases, como é o caso dos grupos aceitadores de elétrons¹²⁰. A introdução de grupos nitro provoca alterações eletrônicas que influenciam o pK_a¹¹¹.

Para estudar o efeito do pK_a do ácido foi estudada a atividade de uma série de ácidos benzóicos substituídos com diferentes pK_a, nomeadamente ácido 2,3,4,5,6-pentafluorobenzóico (**E**) (pK_a 1,75¹²¹), ácido 3,5-dinitrobenzóico (**B**) (pK_a 2,82¹²²), ácido 4-nitrobenzóico (**A**) (pK_a 3,42¹²²), ácido 3,5-di(trifluorometil)benzóico (**D**) (pK_a 3,81¹²¹) e ácido 4-(trifluorometil)benzóico (**D**) (pK_a 4,05¹²¹) (Figura 5.6 e 5.7). Os valores de pK_a encontram-se na Tabela 4.10

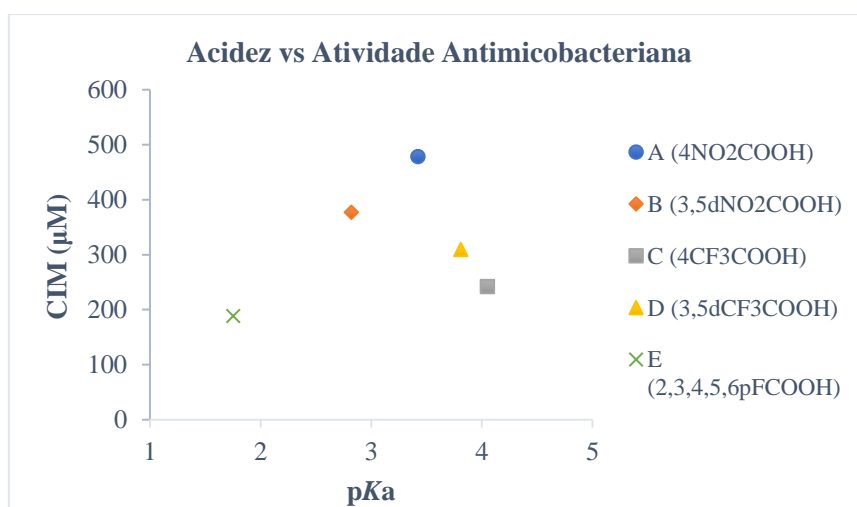


Figura 2.12. Influência da acidez dos ácidos BA substituídos (A, B, C, D e E) na atividade antimicobacteriana contra *M. tuberculosis* H37Rv.

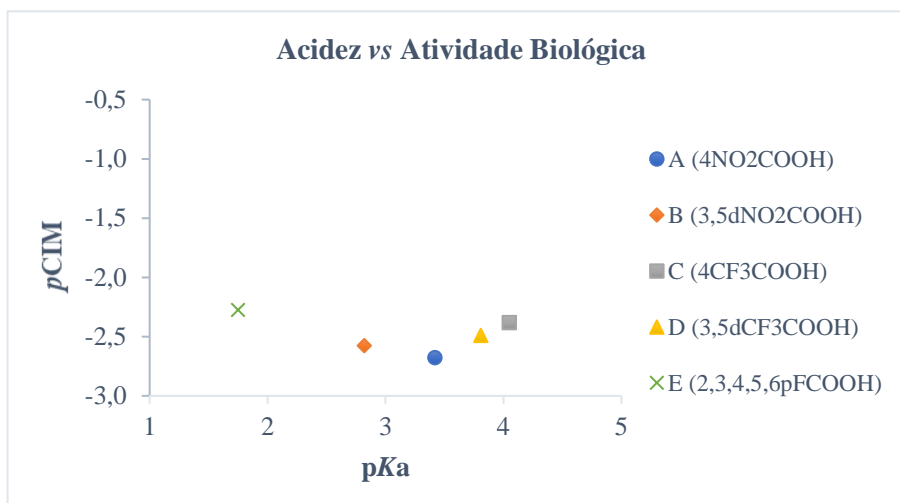


Figura 2.13. Influência da acidez dos ácidos BA substituídos (A, B, C, D e E) na atividade biológica contra *M. tuberculosis* H37Rv.

Observando os resultados nas Figuras 2.12 e 2.13, verificou-se que não existiu uma relação linear entre as constantes de acidez dos ácidos fracos e a atividade antimicobacteriana. Nos ácidos livres houve uma linearidade entre o pK_a e a atividade (maior atividade implica maior $pCIM$) apenas para 3 dos compostos (os dois ácidos nitrados e o ácido 2,3,4,5,6-pentafluorobenzóico), existindo um mínimo no pK_a do ácido 4-nitrobenzóico e invertendo-se a relação para os restantes compostos. Deve-se, no entanto, ter em atenção que todos os valores de atividade são da mesma ordem de grandeza não permitindo tirar mais conclusões.

Uma vez que era possível que alguns dos ácidos tivessem dificuldade em penetrar nas micobactérias prepararam-se ésteres dos mesmos ácidos contendo grupos alquila com 10 carbonos (**1h**, **2h**, **3b**, **4a** e **5a**) tendo sido testada a atividade dos mesmos. Os resultados estão representados na Figura 5.8.

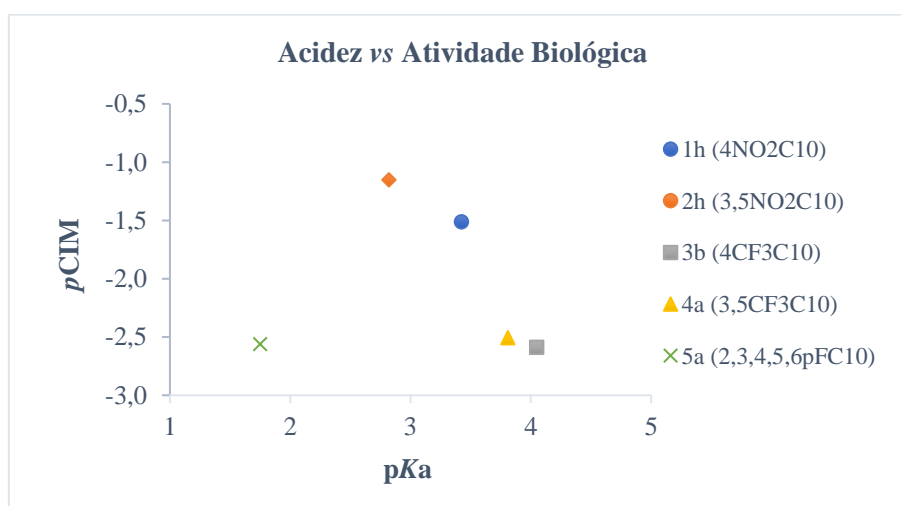


Figura 2.14. Influência da acidez do ácido libertado por hidrólise dos ésteres derivados de decanol na atividade biológica contra *M. tuberculosis* H37Rv.

Analisando a Figura 2.14, constou-se também que não existiu uma relação diretamente proporcional entre o pK_a dos ácidos BA substituídos libertados e a atividade para cada família de ésteres derivados de decanol. Curiosamente podemos verificar que a curva ficou invertida. Os

ésteres mais ativos são agora os ésteres dos ácidos benzóicos contendo substituintes nitro. Outra observação pertinente é que a esterificação permitiu aumentar significativamente a atividade no caso dos nitrobenzoatos, mas não teve o mesmo efeito nos restantes ésteres.

Os ésteres **1h**, **2h**, **3b**, **4a** e **5a** com os respetivos substituintes nitro (4-NO₂), di-nitro (3,5-*d*NO₂), trifluorometilo (4-CF₃), di-(trifluorometilo) (3,5-*d*CF₃) e 2,3,4,5,6-pentafluoro (*p*F) apresentaram a seguinte ordem crescente de atividade biológica: $pCIM_{3b} -2,59 < pCIM_{5a} -2,56 < pCIM_{4a} > -2,51 < pCIM_{1h} -1,51 < pCIM_{2h} -1,15$ (Tabela 4.10).

Tendo em conta os valores de pK_a dos ácidos BA substituídos (Tabela 4.10) era de esperar que o 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo fosse o mais ativo, uma vez que o respetivo ácido apresenta menor valor de pK_a , no entanto, o composto mais ativo foi o 3,5-dinitrobenzoato de decilo. A conclusão é que o pK_a dos ácidos livres por si só não consegue explicar a atividade dos mesmos ou dos respetivos ésteres, o que seria sempre difícil uma vez que qualquer fármaco precisa de penetrar dentro da micobactéria para atuar e qualquer pró-fármaco precisa ainda de ser também ativado.

2.5.4. Discussão do possível Mecanismo de Ação

Uma vez que não se encontrou uma relação direta entre o pK_a dos ácidos livres e a atividade dos ácidos ou dos ésteres derivados dos mesmos pode-se levantar a hipótese que nos compostos mais ativos, a atividade possa estar, pelo menos parcialmente, relacionada com os substituintes presentes na porção aciloxílica e não com a acidez dos ácidos libertados (Figuras 2.12 e 2.13). É possível que os ácidos benzóicos contendo substituintes nitro tenham dificuldade em penetrar nas micobactérias, o que poderá ter sido resolvido através da esterificação dos mesmos. Nos restantes compostos a esterificação não permitiu aumentar a atividade (na verdade até a diminuiu) o que pode ser especulativamente explicado por não ter resolvido o problema da entrada nas bactérias ou por as micobactérias não conseguirem hidrolisar os ésteres para libertar o ácido livre. Estudos com homogenatos de micobactérias são necessários para avaliar a ativação destes compostos pelas micobactérias. Em todo o caso Marta Magalhães¹⁰⁹ estudou a ativação de alguns ésteres do ácido benzóico por homogenatos de *Mycobacterium smegmatis* e concluiu que os seis derivados nitrados estudados (3,5-dinitrobenzoato de propilo, hexilo e fenilo e 4-nitrobenzoato de propilo, hexilo e fenilo) eram facilmente ativados pelo homogenato de micobactérias, pelo que será de admitir que a mesma facilidade de ativação existirá para os ésteres nitrados estudados no presente trabalho. Sendo assim é provável que os ésteres dos compostos nitrados sejam pró-fármacos dos respetivos ácidos livres.

Dos resultados obtidos nesta dissertação existe um grupo de ésteres que se destaca claramente, a elevada atividade dos ésteres do ácido 3,5-dinitrobenzóico e do ácido 4-nitrobenzóico. O que parece indicar a existência de um alvo molecular para estes compostos no *Mycobacterium tuberculosis*. Também muito importante é o facto de os ésteres mais ativos serem estáveis em tampão fosfato a pH 7,4 e terem uma estabilidade em plasma humano que potencialmente os consegue proteger das esterases existentes no plasma humano durante a fase de transporte.

A importância da existência de grupos nitro relativamente a outros grupos aceitadores de eletrões parece ser apoiada por um estudo realizado anteriormente por Miller M. J. *et al.* (2014) em que ésteres de ácido benzóico com substituintes nitro nas posições 1 e 3 do anel aromático

apresentaram maior atividade que o benzoato de benzilo dissubstituído com os grupos NO₂ e CF₃ contra *M. tuberculosis*¹⁰⁶.

A atividade dos compostos nitrados também pode estar relacionada com a redução catalítica dos grupos nitro por enzimas específicas¹¹¹, o que poderá indicar a existência de um alvo celular responsável pela atividade dos compostos reduzidos.

Os compostos com grupos nitro são ativados por nitrorredutases (NTR) e formam espécies reativas de azoto (ENR) tais como um derivado nitroso, um anião de radical nitro, um radical nitroxilo, hidroxilamina e uma amina primária, que originam toxicidade e danos no DNA bacteriano e, por isso, são responsáveis pela morte do bacilo¹¹²⁻¹¹⁴. As ENR são responsáveis pelos efeitos mutagênicos e carcinogênicos das células do hospedeiro^{112,114}.

A atividade antimicobacteriana dos ésteres do ácido 4-nitrobenzóico e do ácido 3,5-dinitrobenzóico também poderia ser explicada com a formação de compostos tóxicos para as micobactérias devido à redução dos grupos nitro, mas não serem tóxicos para o hospedeiro, como observado num estudo realizado por Souza M. V. N. *et al.* (2007)¹¹⁵. Neste estudo, os investigadores concluíram que derivados do ácido nicotínico com grupos nitro (isonicotinohidrazidas) tiveram melhor atividade que fármacos de primeira linha como isoniazida e rifampicina e não foram citotóxicos para células hospedeiras na mesma concentração. Pelo que esses derivados foram considerados como um bom ponto de partida para se encontrarem novos compostos anti-TB¹¹⁵.

Além dos efeitos tóxicos, a redução de grupos nitro também tem efeitos terapêuticos¹¹⁴, uma vez que os fármacos com os grupos nitro têm sido estudados como potenciais fármacos antituberculosos. Estes fármacos demonstram ter a capacidade de eliminar as estirpes MDR-TB assim como um efeito esterilizante e ativos contra a tuberculose por infeção latente, como é caso do fármaco nitroimidazol PA-824¹¹⁵. Esta explicação pode justificar o facto de os ésteres nitrados serem mais ativos que os restantes compostos sintetizados.

Delamanida e seu precursor PA-824 são nitroimidazóis bicíclicos. Foram originalmente investigados como radiosensibilizadores para uso na quimioterapia do cancro, mas o PA-824, também mostrou atividade bactericida potente contra *M. tuberculosis* multirresistente e agora o seu congénere Delamanida é usado no tratamento de tuberculose multirresistente. Quer a delamamida quer o PA-824 inibem a síntese de ácidos micólicos e induzem envenenamento respiratório através de um mecanismo peculiar de ativação pela nitrorredutase dependente da deazaflavina (cofator F420) (Ddn ou Rv3547), que gera metabolitos que por sua vez originam espécies reativas de azoto¹¹².

2.5.5. Conclusões Gerais

No estudo de estabilidade em tampão fosfato a pH 7,4, observou-se que a hidrólise química das duas séries de ésteres foi mais lenta à medida que o comprimento do grupo alquilo (aumento do número de carbonos) e a lipofilia aumentaram (Tabelas 2.12 e 4.10). No estudo de estabilidade em plasma humano também se observou a mesma relação nos 4-nitrobenzoatos de alquilo (Tabela 2.13 e Figura 2.8) e nos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo com cadeia alquílica comprida (C8 a C14) (Tabela 2.13 e Figura 2.9).

Os ésteres estudados apresentam diferentes porções aciloxílicas (introdução de um ou mais substituintes nitro). Os grupos aceitadores de eletrões no anel aromático aumentam a velocidade

de hidrólise por mecanismo $B_{AC}2^{46}$, o que é compatível com o facto dos 4-nitrobenzoatos de alquilo serem mais estáveis em tampão fosfato pH 7,4 comparativamente com os ésteres dissustituídos.

Relativamente à estabilidade em plasma humano, os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo mostraram ser mais estáveis que 4-nitrobenzoatos de alquilo nesse meio biológico, o que indica que estes ésteres serão piores substratos das esterases plasmáticas. Assim, é possível que a hidrólise destes compostos pelas esterases humanas seja mais afetada por efeitos estéreos que eletrónicos.

De um modo geral o aumento da cadeia alquílica dos ésteres estudados levou a um aumento da estabilidade em plasma. No caso dos 4-nitrobenzoatos de alquilo demonstrou-se haver um aumento da estabilidade como o aumento da cadeia alquílica para todos os compostos. No caso dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo houve, para as cadeias alquílicas mais pequenas, um ligeiro aumento da velocidade de hidrólise, com o aumento da lipofilia, até grupos alquilo de 6-7 carbonos, e a partir desse ponto observou-se sempre um aumento da estabilidade como o aumento da cadeia alquílica.

Relativamente à atividade, embora a lipofilia do composto em si não explique todo os resultados obtidos, será importante para facilitar a entrada dos pró-fármacos na membrana da micobactéria^{49,56}.

Ainda relativamente à lipofilia esta mostrou ser importante na atividade havendo um tamanho de cadeia ótima para os compostos estudados (log P dos compostos de cerca de 4-5).

Os ésteres nitrados apresentaram maior atividade que os ésteres fluorados (Tabela 2.15), o que sugere que os substituintes na porção alciloxílica também influenciam a atividade antimicobacteriana para além do efeito que possam ter sobre o pK_a do ácido libertado.

A elevada atividade dos ésteres do ácido 3,5-dinitrobenzóico e do ácido 4-nitrobenzóico parece indicar a existência de um alvo molecular para estes compostos no *Mycobacterium tuberculosis*. A atividade dos compostos nitrados pode estar relacionada com a redução catalítica dos grupos nitro por enzimas específicas¹¹, o que poderá indicar a existência de um alvo celular responsável pela atividade destes ésteres dos compostos reduzidos. Ademais, é ainda muito importante o facto de os ésteres com atividade elevada serem estáveis em tampão fosfato a pH 7,4 assim como em plasma humano que potencialmente os consegue proteger das esterases existentes no plasma durante a fase de transporte.

2.6. Citotoxicidade de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos

No estudo de atividade antimicrobacteriana na estirpe *M. tuberculosis* H37Rv verificou-se que os ésteres de BA substituídos mais ativos foram os ésteres com grupos nitro na sua estrutura molecular.

Muitos pró-fármacos existentes que possuem um ou mais grupos nitro nas suas estruturas moleculares são anticancerígenos, antivirais, antiparasitas e antituberculosos dependendo do seu alvo^{111,114}. Alguns fármacos com grupos nitro como fármacos nitroaromáticos possuem toxicidade e mutagenicidade, uma vez que quando metabolizados, os grupos nitro sofrem processos bioquímicos e são reduzidos pelas enzimas nitrorredutases (NTR) do Tipo I ou Tipo II^{111,113,114}. Deste modo, são produzidas espécies reativas tais como um derivado nitroso, um anião de radical nitro, um radical nitroxilo, uma hidroxilamina e uma amina primária, que são tóxicos para as células humanas e tem capacidade de causar danos no DNA das mesmas (Figura 2.15)^{111,112-114}.

As enzimas nitrorredutases (NTR) são uma família de enzimas dependentes de mononucleótido de flavina (FMN) ou dinucleótido de flavina adenina (FAD) como grupos prostéticos e utilizam dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH) e fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADPH) como agentes redutores^{113,114}. Em sistemas biológicos, a redução enzimática dos grupos nitro pode prosseguir por um mecanismo de um ou dois elétrons^{113,114}. As NTR dependentes de FMN catalisam a redução de compostos nitroaromáticos por um mecanismo de dois elétrons¹¹⁴.

Existem duas classes de enzimas NTR que reduzem grupos nitro, nomeadamente, NTR do tipo I (insensíveis ao oxigénio), que realizam reduções com dois elétrons tanto em condições aeróbias como anaeróbias e NTR do tipo II (sensíveis ao oxigénio) que realizam reduções com um elétron (Figura 2.15)^{113,114}.

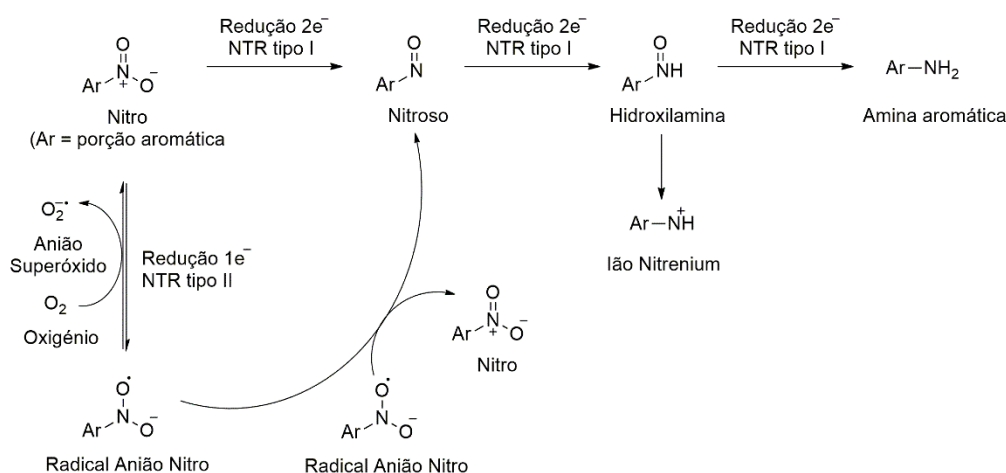


Figura 2.15. Redução Enzimática de compostos nitrados por ação de Nitrorredutases do tipo I e II (Adaptado)^{113,114}.

A redução de grupos nitro com dois elétrons produz aminas por via do intermediário nitroso e hidroxilamina. Os nitroaromáticos e aminas são relativamente estáveis. Contudo, o intermediário nitroso e a hidroxilamina podem reagir com biomoléculas para exercer efeitos tóxicos, efeitos mutagénicos e cancerígenos^{111,113,114}. Além disso, há evidências que sugerem que as hidroxilaminas dissociadas na presença de condições ácidas originam íons nitrenium reativos, que também causam efeitos mutagénicos e podem reagir com o DNA (Figura 2.15)^{113,114}.

A redução de grupos nitro com um eletrão produz um radical anião nitro. Esse anião não é estável e, em condições aeróbicas, é reoxidado de volta a um grupo nitro pelo oxigénio molecular, que por sua vez é reduzido para formar um anião superóxido reativo. O ciclo redox que envolve oxigénio molecular é responsável pelos efeitos tóxicos dos compostos nitrados e pode levar à carcinogenicidade^{111,113,114}. Na ausência de oxigénio, dois radicais anião nitro podem sofrer uma reação desproporcional para formar uma molécula parental do composto nitro e um composto nitroso (Figura 2.15)¹¹⁴.

Para se estudar se os ésteres nitrados apresentaram toxicidade procedeu-se ao estudo de citotoxicidade destes ésteres em linha celular monocítica humana THP-1 (ATCC TIB202), como descrito no Subcapítulo 4.6 do Procedimento Experimental – Citotoxicidade. As concentrações dos compostos nitrados das séries 1 e 2, dos ácidos (**A** a **E**) e do éster **3a** aplicadas no meio de cultura foram 1 a 128 µg/mL e dos ésteres **3b**, **4a** e **5a** foram 2 a 512 µg/mL.

Os resultados de citotoxicidade foram obtidos através da concentração letal para 50% da população de células, CL_{50} ¹²³. 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.

A puromicina é utilizada como controlo positivo para a morte celular de células de mamíferos, como é o caso da linha celular monocítica humana THP-1. Este composto é tóxico para células eucarióticas que não contêm o gene *pac* (gene que confere resistência a este antibiótico), pelo que é usada como composto referência para testar a viabilidade celular. As concentrações de puromicina aplicadas nas linhas celulares de mamíferos variam de 1 a 10 µg/ml¹²⁴. As concentrações de puromicina aplicadas neste estudo foram 0,008 a 8 µg/mL.

Tabela 2.16. Citotoxicidade dos ésteres de BA substituídos sintetizados em macrófagos THP-1. DMSO (controlo negativo) corresponde ao meio onde não ocorre morte celular. Puromicina (controlo positivo) corresponde ao composto que provoca morte celular.

Composto	X	R	CL ₅₀ (µg/mL)	CL ₅₀ (µM)
1a	4-NO ₂	C ₃ H ₇	153	731
1b		C ₄ H ₉	155	695
1c		C ₅ H ₁₁	137	577
1d		C ₆ H ₁₃	143	571
1e		C ₇ H ₁₅	143	539
1f		C ₈ H ₁₇	122	437
1g		C ₉ H ₁₉	137	466
1h		C ₁₀ H ₂₁	149	486
1i		C ₁₁ H ₂₃	108	336
1j		C ₁₂ H ₂₅	120	358
1k		C ₁₃ H ₂₇	99	284
1l		C ₁₄ H ₂₉	52	142
A		H	130	778
2a	3,5-dNO ₂	C ₃ H ₇	99	391
2b		C ₄ H ₉	107	398
2c		C ₅ H ₁₁	107	380
2d		C ₆ H ₁₃	113	381
2e		C ₇ H ₁₅	121	391
2f		C ₈ H ₁₇	117	359
2g		C ₉ H ₁₉	117	344
2h		C ₁₀ H ₂₁	115	327
2i		C ₁₁ H ₂₃	136	370
2j		C ₁₂ H ₂₅	119	314
2k		C ₁₃ H ₂₇	108	273
2l		C ₁₄ H ₂₉	124	304
B		H	123	581
3a	4-CF ₃	C ₉ H ₁₉	126	382
3b		C ₁₀ H ₂₁	425	1345
C		H	102	536
4a	3,5-dCF ₃	C ₁₀ H ₂₁	661	1658
D		H	104	401
5a	2,3,4,5,6-pF	C ₁₀ H ₂₁	19	54
E		H	129	610
Controlo Negativo	DMSO		2,27%*	
Controlo Positivo	Puromicina		1	2

*Concentrações de DMSO presentes às concentrações mais elevadas dos compostos em estudo (128 µg/mL).

Tendo em conta os valores das concentrações letais a 50% presentes na Tabela 2.16, os ésteres nitrados do ácido benzoico e os respetivos ácidos livres demonstraram não serem tóxicos na linha celular monocítica humana THP-1 (CL₅₀ 1a a 1k 731 a 284 µM e CL₅₀ 2a a 2l 391 a 304 µM). O 4-nitrobenzoato de tetradecilo, **1l**, foi o composto nitrado que apresentou uma toxicidade mais elevada (CL₅₀ 2l 142 µM) que os ésteres nitrados quando comparado com o controlo positivo puromicina (CL₅₀ 2 µM). Comparando os compostos nitro, os 4-nitrobenzoatos de alquilo são um pouco menos tóxicos que os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo, uma vez que os valores das concentrações letais são um pouco mais elevados (Tabela 2.16).

Observando os ésteres fluorados e os respectivos ácidos livres, o composto 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo, **5a**, ($CL_{50\ 5a}$ 19 μ M) foi o éster mais tóxico dos ésteres fluorados quando comparado com o controlo positivo.

Estes resultados demonstraram que, ao contrário do que se poderia esperar, uma vez que compostos com grupos nitro são conhecidos como tóxicos para as micobactérias, os ésteres com grupos nitro tiveram a capacidade de manter a sobrevivência dos macrófagos. Assim, o facto de estes ésteres não apresentarem toxicidade nas células humanas é uma característica importante para os pró-fármacos.

Existem compostos nitroaromáticos ou nitroheteroaromáticos com efeitos terapêuticos e não mutagénicos, como por exemplo, os fármacos antituberculosos Delamanida (OPC-67683), Pretomanida (PA-824) e BTZ043 (Figura 2.16)^{106,112,114}.

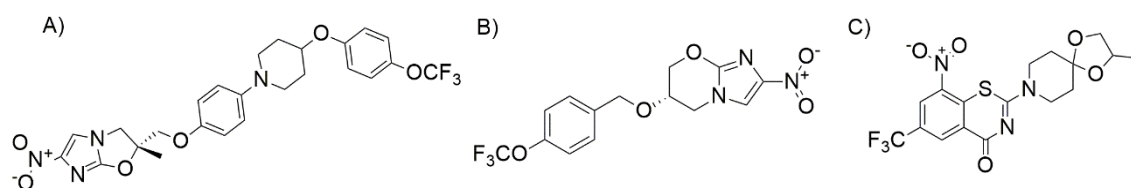


Figura 2.16. Exemplos de Fármacos Antituberculosos com grupos nitro. A) Delamanida (OPC-67683), B) Pretomanida (PA-824) e C) BTZ043.

Delamanida pertence à família 5-nitroimidazooxazol¹¹⁴ e é um fármaco inibidor da biossíntese de ácido micólico altamente ativo contra a TB, incluindo MDR-TB (Figura 2.16 A)^{112,114}. Aprovado para uso médico em 2014 na Europa, Japão e Coreia do Sul¹¹⁴. Em estudos combinados com fármacos TB convencionais como etambutol, isoniazida, pirazinamida, rifampicina, antibióticos aminoglicosídeos e quinolonas (ensaios clínicos de fase II), observou-se que as taxas de cicatrização (medidas como conversão da cultura de expectoração) eram substancialmente melhores em pacientes que tomavam adicionalmente Delamanida¹¹⁴. Os mecanismos de resistência de Delamanida foram atribuídos a genes na via de bioativação da nitrorredutase (Ddn) dependente de deazaflavina (cofator F420), que são encontrados em espécies de micobactérias, mas não em células bacterianas ou de mamíferos comuns¹²⁵. O que pode explicar porque este fármaco não possui mutagenicidade. Delamanida é um medicamento anti-TB bem tolerado e seguro quando comparado a outros medicamentos usados para tratar a MDR-TB¹²⁵.

Pretomanida (PA-824) pertence à família 5-nitroimidazooxazina¹¹⁴ tem a capacidade de atuar em MDR-TB (aprovado na fase III dos ensaios clínicos) e em LITB (Figura 2.16 B)^{114,115}. O seu principal mecanismo de ação é a inibição da síntese de lipídios e proteínas da parede celular¹¹⁴. Além disso, este pró-fármaco sofre a biorredução do grupo nitro aromático num intermediário radical anião nitro reativo dentro da célula por parte da nitrorredutase (Ddn) dependente de deazaflavina (cofator F420) e, deste modo, é ativado¹¹⁴. A redução de PA-824 origina des-nitroimidazol (desnitro) que gera espécies reativas de azoto (ENR), incluindo óxido nítrico (NO), que são mortais para MT¹¹². O envenenamento respiratório devido à libertação de óxido nítrico é o mecanismo de PA-824 em condições anaeróbias¹¹².

BTZ043 pertence à família de 1,3-Benzotiazin-4-onas (benzotiazinonas ou BTZs) e é um análogo da benzotiazina que demonstrou um potencial notável para matar MT *in vitro*, *ex vivo* e em modelos de ratos com TB (Figura 2.16 C)^{106,114}. Além disso, possui um perfil de atividade extraordinário (CIM de 1 ng/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv) quando comparado a terapêuticas existentes, como a isoniazida e etambutol^{106,114}. Este fármaco tem como alvo as enzimas

decaprenilfosforil-D-ribose-2'-epimerase (DprE1) que catalisam polissacáridos arabinogalactano e arabinomanano, constituintes da parede celular de MT^{106,112}. Com a investigação do seu mecanismo de ação, BTZ-043 mostrou ser um inibidor suicida de DprE1 devido à inibição enzimática pela conversão do grupo nitro no intermediário nitroso e uma reação covalente subsequente com o aminoácido cisteína (Cys387) de DprE1^{106,114}. Além disso, encontra-se na fase II dos ensaios clínicos e não é mutagénico, uma vez que a via redutora parece estar ausente no metabolismo humano (teste de Ames negativo para a mutagénese do DNA), pelo que não é tóxico em mamíferos¹¹².

Um estudo realizado por Miller M. J. *et al.* (2014) mostrou que análogos simples de sulfonamidas e ésteres de ácido benzóico com substituintes di-nitro eram mais ativos que as amidas. Sendo a introdução de grupos nitro no anel aromático importante para potencializar a bioatividade¹⁰⁶.

À semelhança destes fármacos anti-tuberculosos, os ésteres nitro de BA não são tóxicos e apresentam atividade contra *M. tuberculosis* potenciada pela presença dos grupos nitro no anel aromático e possivelmente não com a contribuição da redução destes grupos.

3. Conclusões e Perspetivas Futuras

Esta dissertação envolveu a síntese de vinte e oito ésteres de ácidos benzóicos substituídos (ácido 4-nitrobenzóico, 3,5-dinitrobenzóico, 4-trifluorometilbenzóico, 3,5-di(trifluorometil)benzóico e 2,3,4,5,6-pentafluorobenzóico); o estudo da estabilidade química e enzimática dos compostos (4-nitrobenzoatos e 3,5-dinitrobenzoatos) e, por fim, o estudo da citotoxicidade de todos os ésteres e dos cinco ácidos numa linha celular monocítica humana THP-1. Com os resultados dos estudos da estabilidade e atividade discutiram-se as relações estrutura-estabilidade/atividade dos ésteres.

Os compostos sintetizados foram ésteres de BA substituídos com diferentes grupos alquilo de propilo a tetradecilo, através de reações de esterificação entre um cloreto de ácido (Método A - A1, A2 e A3) ou um derivado de imidazol (Método B) com um álcool (na sua forma neutra ou na sua forma desprotonada).

Sintetizaram-se com maior sucesso, os 4-nitrobenzoatos de alquilo pelo método A1, alguns 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo pelo método A1 e B; os 4-trifluorometilbenzoatos de alquilo e 3,5-ditrifluorometilbenzoato de decilo pelo método A2 e o 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo pelo método A3.

Os compostos obtidos com maiores rendimentos foram: nos 4-nitrobenzoatos de alquilo, o 4-nitrobenzoato de butilo, **1b** (89%); nos 3,5-dinitrobenzoato de alquilo, o 3,5-dinitrobenzoato de tetradecilo, **2l** (78%) e nos 4-trifluorometilbenzoatos de alquilo, o 4-trifluorometilbenzoato de decilo, **3b** (89%). O 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo, **4a** e o 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo, **5a**, foram obtidos com os rendimentos de 51% e 9%, respetivamente.

O método B foi um bom método alternativo ao método A1 na síntese de alguns 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo. Na síntese dos compostos fluorados as melhores condições reacionais foram via a ativação do álcool com hidreto de sódio na presença de base (piridina).

Os compostos nitrados mostraram ser quimicamente estáveis no intervalo de tempo necessário para efetuar os testes de atividade e estabilidade (ou até em testes futuros *in vivo*) e a hidrólise enzimática não foi significativamente influenciada pela hidrólise química dos ésteres.

No estudo de estabilidade química, os 4-nitrobenzoatos de alquilo foram mais estáveis que os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo. Todos os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo e os 4-nitrobenzoatos de nonilo a tetradecilo (**1g** a **1l**) foram estáveis em plasma humano. Ademais, com a análise das relações estrutura-estabilidade nas séries dos 4-nitrobenzoatos de alquilo e dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo, a lipofilia/comprimento do grupo alquilo e o efeito estereoquímico potenciou a estabilidade dos ésteres (percentagem de degradação de éster diminuía com o aumento da lipofilia/comprimento do grupo alquilo).

Os ésteres 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo (moléculas com dois grupos eletroatratores na porção aciloxílica) foram hidrolisados mais rapidamente (menos estáveis) que os 4-nitrobenzoatos de alquilo em tampão fosfato e tal é justificado pelos efeitos indutivos dos grupos nitro existentes nestas moléculas. Caso a hidrólise enzimática tivesse um mecanismo de hidrólise básica, era esperado que também os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo fossem hidrolisados mais rapidamente

em plasma humano do que os 4-nitrobenzoatos de alquilo. No entanto, verificou-se o contrário, tendo a série 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo apresentado maior estabilidade enzimática, o que provavelmente não terá a ver com efeitos eletrônicos, mas sim com menor afinidade da enzima para o substrato. Este resultado é particularmente interessante, pois os ésteres dinitrados apresentaram uma atividade antimicobacteriana mais elevada.

O estudo de atividade antimicobacteriana dos ésteres de BA substituídos *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Rv permitiu concluir que os compostos nitrados apresentaram atividades superiores aos restantes, sendo que os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo foram os mais ativos. Os ésteres mais ativos na série 1 foram os 4-nitrobenzoato de octilo a undecilo, tridecilo e tetradecilo, **1f** a **1i**, **1k** e **1l** (CIM_{1f a 1i, 1k e 1l} varia entre 18 a 62, 57 e 28 μM) na série 2, 3,5-dinitrobenzoato de heptilo a tetradecilo, **2e** a **2l** (CIM_{2e a 2l} varia entre 8 e 24 μM); na série 3, o 4-trifluorometilbenzoato de decilo, **3a** (MIC_{3a} 121 μM). Por último, o 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo, **4a** (CIM_{4a} > 321 μM) e o 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo, **5a** (CIM_{5a} 363 μM).

Pela análise das relações estrutura – atividade, verificou-se que a atividade antimicobacteriana aumentou com o aumento da lipofilia/comprimento do grupo alquilo. Foi particularmente evidente o aumento da atividade conseguido com a esterificação dos ácidos benzóicos contendo grupos nitro. Para estes compostos a lipofilia mostrou ser importante havendo um comprimento de cadeia ótimo para a atividade dos compostos estudados (log P dos compostos de cerca de 4 - 5). Embora evidentemente a lipofilia do composto em si não explique todo os resultados obtidos, este parâmetro será importante para facilitar a entrada dos pró-fármacos na membrana da micobactéria^{49,56}.

Os ésteres nitrados apresentaram maior atividade que os ésteres fluorados (Tabela 2.15), o que sugere que os substituintes nitro na porção alciloxílica também influenciam a atividade antimicobacteriana para além do efeito que possam ter sobre o pK_a do ácido libertado.

Particularmente relevante foi a demonstração que a esterificação dos ácidos benzóicos estudados contendo grupos nitro, que permitiu aumentar significativamente a atividade antimicobacteriana dos mesmos sem aumentar a toxicidade.

Os ésteres nitrados mais ativos na série 1 (4-nitrobenzoatos de alquilo) foram os 4-nitrobenzoatos de octilo a undecilo, tridecilo e tetradecilo, **1f** a **1i**, **1k** e **1l** e na série 2 (3,5-dinitrobenzoatos de alquilo), os 3,5-dinitrobenzoatos de heptilo a tetradecilo, **2e**, **2f**, **2g**, **2h**, **2i**, **2j**, **2k** e **2l**. Na série 2, os ésteres **2g** a **2j** demonstraram ser possíveis fármacos antimicobacterianos bactericidas sendo os restantes ésteres bacteriostáticos.

A elevada atividade dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo e 4-nitrobenzoatos de alquilo parece indicar a existência de um alvo molecular para estes compostos no *Mycobacterium tuberculosis*. A atividade dos compostos nitrados pode estar relacionada com a redução catalítica dos grupos nitro por enzimas específicas¹¹¹, o que poderá sugerir a existência de um alvo celular responsável pela atividade destes ésteres dos compostos reduzidos. Ainda muito importante é o facto de os ésteres com maior atividade antimicobacteriana serem estáveis em tampão fosfato a pH 7,4 e possuírem estabilidade enzimática que potencialmente os consegue proteger das esterases existentes no plasma humano durante a fase de transporte.

Relativamente ao estudo da citotoxicidade, os ésteres nitrados do ácido benzóico e os respetivos ácido livres demonstraram não serem tóxicos na linha celular monocítica humana THP-1 (CL₅₀ **1a** a **1k** 731 a 284 µM e CL₅₀ **2a** a **2l** 391 a 304 µM) à exceção dos ésteres 4-nitrobenzoato de tetradecilo, **1l** (CL₅₀ **2l** 142 µM) (éster nitrado mais tóxico) e o 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo, **5a** (éster fluorado mais tóxico). O que demonstra que os ésteres com grupos nitro tiveram a capacidade de manter a sobrevivência dos macrófagos.

Deste modo, todos os objetivos deste trabalho foram alcançados, uma vez que se obteve um grupo de ésteres de BA, ativos contra *M. tuberculosis*, quimicamente estáveis e capazes de superar a hidrólise de esterases humanas, e que não demonstraram toxicidade em células humanas - **os 3,5-dinitrobenzoatos de heptilo a tetradecilo (2e a 2l)**. Ademais, os **ésteres 4-nitrobenzoato de nonilo a undecilo (1g a 1i) e tridecilo (1k)** também são candidatos interessantes a pró-fármacos antituberculosos.

Para além da atividade em modelos animais, três tipos de estudos são importantes no futuro: estudos que permitam avaliar a absorção oral destes compostos e a sua resistência frente a esterases intestinais e hepáticas, estudos de ativação frente a esterases de micobactérias e estudos que permitam elucidar o mecanismo de ação dos compostos nitrados.

Além disso, é necessário realizarem-se estudos adicionais de todos os compostos no âmbito da estabilidade e ativação por parte de enzimas hepáticas e o efeito primeira passagem para avaliar o metabolismo hepático. O estudo da hidrólise hepática destes pró-fármacos permite confirmar a sua estabilidade e se são adequados para humanos, uma vez que os compostos mais ativos são lipofílicos. Também poderia ser interessante o estudo de lipossomas para a avaliação do transporte dos 3,5-nitrobenzoatos de alquilo **2e a 2l** para as micobactérias, sendo os ésteres **2g a 2j** mais interessantes por serem bactericidas.

4. Parte Experimental

Nesta secção é descrita a síntese e caracterização de vinte e um ésteres de ácido benzoico. São igualmente descritos os estudos de estabilidade em vinte e quatro ésteres de ácido benzóico. Por fim descrevem-se os estudos de atividade antimicobacteriana em *M. tuberculosis* e estudos de citotoxicidade na linha celular monocítica humana THP-1 para vinte e oito dos referidos ésteres e cinco ácidos fracos.

4.1. Equipamento e Material

Para se pesarem os reagentes e produtos com precisão utilizou-se a balança da marca Mettler Toledo.

Para acompanhar a evolução das reações recorreu-se à técnica de cromatografia em camada fina (TLC), em que se utilizou folhas de alumínio com sílica gel F254 (Merck) com espessura de 0,25 mm. A revelação dos cromatogramas foi alcançada por radiação ultravioleta (UV) a 254 nm pela lâmpada de UV da marca Camag.

A cromatografia em coluna *flash* foi utilizada para isolar e purificar os compostos sintetizados. Utilizaram-se colunas de vidro de tamanho variável, com enchimento constituído por sílica gel 60 (Panreac AppliChem) de granulometria 0,040 – 0,063 mm.

Para a evaporação dos solventes orgânicos utilizou-se o evaporador rotativo da marca Buchi.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos num espectrofotómetro Bruker de Sistema Magnético 300MHz/54mm Ultrashield na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Os desvios químicos são expressos em partes por milhão e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Realizaram-se espectros de protão (^1H) e de carbono (^{13}C), Correlação Heteronuclear de Quantum-Simples (HSQC “Heteronuclear Single-Quantum Correlation”) e de Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações (HMBC “Heteronuclear Multiple Bond Correlation”). O clorofórmio deuterado foi o solvente utilizado para calibrar os espectros e os espectros foram analisados no programa MestreNova. Os dados obtidos encontram-se indicados pela seguinte ordem: núcleo (solvente); desvio químico (δ , ppm) [multiplicidade de sinal (s - singuleto, sa - singuleto alargado, d - duplete, t - tripleto, dt - duplo tripleto, m - multiplete), constante de acoplamento (J), intensidade relativa (nH, como número de prótons, atribuição na molécula)].

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

Os ensaios de estabilidade foram realizados num termóstato Julabo U3 7A.

Os estudos de HPLC foram realizados num sistema VWR Hitachi - Elite Lachrom Ultra constituído por duas bombas VWR Hitachi L-2160U, com injetor de amostras automático VWR Hitachi L-2200U, detetor ultravioleta VWR Hitachi UV L2400U e coluna LiChroCART® 250×4 Cartridge RP-8 (5 μm).

O espectrofotômetro UV/Visível usado para determinar os comprimentos de onda de absorção dos ésteres e ácidos testados foi Shimadzu UV/Visível UV-1603.

O aparelho de ultrassons utilizado para homogeneizar as amostras e desarejar eluentes para HPLC foi o aparelho Bandelin sonorex Tk 52.

As alíquotas dos estudos de estabilidade enzimática em plasma humano foram centrifugadas numa centrífuga da marca VWR.

Nos estudos antimicobacterianos utilizaram-se placas de cultura de 96 poços (Nunc) e as leituras das densidades óticas (ODs) das placas realizadas num leitor de placas Tecan's M200. A observação das culturas das micobactérias e das placas foi feita através do microscópio confocal Zeiss Axiovert.

Nos estudos de citotoxicidade utilizaram-se linhas celulares monocítica humana THP-1 (ATCC TIB202). Para a viabilidade celular, as células foram incubadas em alamarBlue (Invitrogen) e usou-se o um espectrofotômetro Tecan M 200 para medir a fluorescência. As células foram cultivadas em RPMI 1640 (Gibco) e foi necessário soro bovino fetal a 10% (Gibco) e Hepes (Gibco).

4.2. Reagentes e Solventes

Os solventes usados foram adquiridos comercialmente nos seguintes fornecedores: Valente e Ribeiro Lda e José Manuel Gomes dos Santos Lda.

Os reagentes utilizados foram adquiridos comercialmente e os reagentes pró-análise foram utilizados sem purificação. Os fornecedores foram: Panreac AppliChem, Sigma Aldrich, Fluka, Merck e BDH.

Nos estudos de estabilidade em HPLC utilizaram-se essencialmente os solventes acetonitrilo e metanol para HPLC e água desionizada. Para os ensaios de estabilidade e enzimática química utilizou-se uma solução de 0,01M de tampão de fosfato a pH 7,4 em que se dissolve uma pastilha de tampão fosfato 0,01M com cloreto de potássio 0,0027M e cloreto de sódio 0,137M na sua constituição da marca Fisher Scientific em 200mL de água desionizada. Nos ensaios de estabilidade enzimática utilizou-se plasma humano de doadores anónimos.

Para os estudos antimicobacterianos, as soluções foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO - Panreac AppliChem); para o controlo positivo utilizou-se o fármaco de primeira linha isoniazida (Sigma-Aldrich); o meio de cultura de bactérias Middlebrook 7H9 e o meio de cultura sólido Middlebrook 7H10 foram adquiridos da Difco e suplementados com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose, catalase) e tiloxapol adquirido da Sigma-Aldrich. A estirpe utilizada foi a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294).

4.3. Síntese de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos

Os ésteres foram sintetizados partindo dos ácidos benzóicos substituídos correspondentes, os quais, após conversão nos respetivos cloretos de ácido (Método A) ou derivados de imidazol (Método B) reagiram com diferentes álcoois (propanol a tetradecanol). Recorrendo ao Método A foram testadas três condições de reação diferentes: A1, A2 e A3.

4.3.1. Método A

Neste método, primeiramente, procede-se a uma reação entre o derivado de ácido benzóico substituído (**A**) e o cloreto de tionilo (SOCl_2) (**2**) para sintetizar o intermediário cloreto de ácido (**4**) (mecanismo 1 em Anexo 1.1). Seguidamente, adiciona-se o álcool em três condições diferentes para formar o éster:

1) Método A1 – o álcool é adicionado ao cloreto de acilo sem ativação (forma neutra) no solvente DCM ou THF;

2) Método A2 – o álcool é previamente ativado (forma de alcóxido) e reage com o cloreto de acilo em THF e na presença de piridina.

3) Método A3 - o álcool é adicionado ao cloreto de acilo sem ativação no solvente THF e na presença de piridina.

Pelo método A1 foram sintetizados os 4-nitrobenzoatos de alquilo e os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo.

Pelo método A2 foram sintetizados os 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo e o 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo. Finalmente pelo método A3 foi sintetizado o 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo.

Pelo método A foram sintetizados os 4-nitrobenzoatos de alquilo e 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo (Figura 4.1).

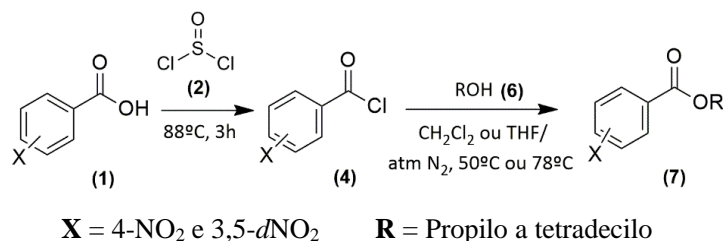


Figura 4.1. Síntese dos 4-nitrobenzoatos de alquilo e dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo.

4.3.1.1. Procedimento geral de preparação dos 4-nitrobenzoatos de alquilo e dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo – Método A1

Adicionaram-se 10 mL (138 mmol) de cloreto de tionilo (**2**) a 0,5 g (3 mmol) de ácido 4-nitrobenzóico (**A**) ou 3 mmol de ácido 3,5-dinitrobenzóico (**B**) e colocou-se a reação sob refluxo durante 3h a 88°C para se formem os cloretos de benzoílo respetivos (**4**). Durante a reação ocorreu a libertação de dióxido de enxofre até se formar o cloreto de acilo 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.

- **4-nitrobenzoatos de alquilo**

De seguida, dissolveram-se 2,5 mmol de álcool (**6**) em 10 mL de diclorometano (DCM) seco. O solvente DCM foi seco previamente com cloreto de sódio anidro. A reação ocorreu sob refluxo até se formar o éster pretendido¹²⁶ (**1e** para o caso da esterificação com o álcool $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{OH}$ – Figura 4.2). A reação foi acompanhada por cromatografia em camada fina (TLC) com uma mistura de hexano e acetato de etilo (9:1) até a reação estar completa. Para a revelação da placa utilizou-se radiação ultravioleta (UV) e o revelador químico iodo.

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 hexano e acetato de etilo (9:1).

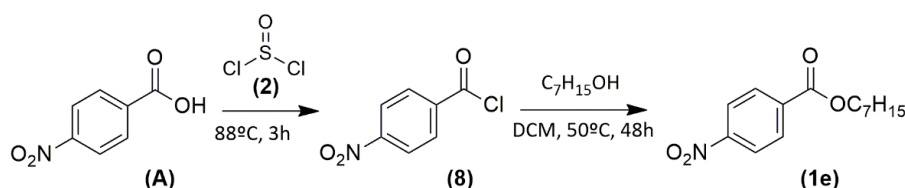


Figura 4.2. Síntese exemplo de um derivado de ácido 4-nitrobenzóico pelo método A1 - Éster 4-nitrobenzoato de heptilo (1e).

A Tabela 4.1. apresenta as condições experimentais da síntese dos 4-nitrobenzoatos de alquilo pelo método A1:

Tabela 4.1. Condições experimentais da síntese de 4-nitrobenzoatos de alquilo pelo método A1.

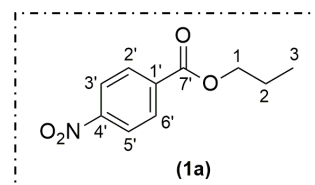
Composto	R	T ₁ ^{refluxo} / °C + agitação	t ₂ ^{refluxo} / h	T ₂ ^{refluxo} / °C + agitação	t ₂ ^{refluxo} / h	Rendimento/ %
1a	C ₃ H ₇	88	3	50	48	15
1b	C ₄ H ₉	88	3	50	48	89
1c	C ₅ H ₁₁	88	3	50	48	80
1d	C ₆ H ₁₃	88	3	50	48	25
1e	C ₇ H ₁₅	88	3	50	48	80
1f	C ₈ H ₁₇	88	3	50	48	6
1g	C ₉ H ₁₉	88	3	50	48	24
1j	C ₁₂ H ₂₅	88	3	50	48	57
1k	C ₁₃ H ₂₇	88	3	50	48	86

Por este método foram obtidos 5 compostos (1b, 1c, 1e, 1j e 1k) com bom rendimento (Tabela 4.1) e efetuada a sua caracterização estrutural por Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Caracterização Estrutural por Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear dos 4-nitrobenzoatos de alquilo

1. 4-nitrobenzoato de propilo (1a)

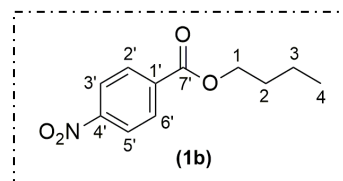
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,29 (AA'BB', 2H, C3'-H e C5'-H), 8,21 (AA'BB', 2H, C2'-H e C6'-H), 4,34 (t, J= 6 e 9 Hz, 2H, C1-H), 1,76-1,83 (m, 2H, C2-H), 1,04 (t, J= 6 e 9 Hz, 3H, C3-H).



¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 164,84 (C7'), 150,65 (C4'), 136,04 (C1'), 130,80 (C2' e C6'), 123,66 (C3' e C5'), 67,63 (C1), 22,16 (C2), 10,58 (C3).

2. 4-nitrobenzoato de butilo (1b)

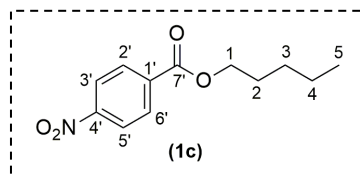
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,28 (AA'BB', 2H, C3'-H e C5'-H), 8,20 (AA'BB', 2H, C2'-H e C6'-H), 4,36 (t, J= 6 e 9 Hz, 2H, C1-H), 1,71-1,85 (m, 2H, C2-H), 1,41-1,55 (m, 2H, C3-H), 0,99 (t, J= 6 e 9 Hz, 3H, C4-H).



¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 164,89 (C7'), 150,64 (C4'), 136,04 (C1'), 130,79 (C2' e C6'), 123,65 (C3' e C5'), 65,95 (C1), 30,78 (C2), 19,35 (C3), 13,84 (C4).

3. 4-nitrobenzoato de pentilo (1c)

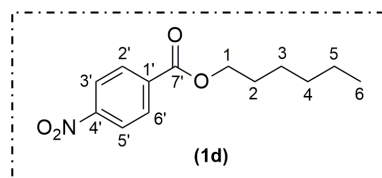
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8,29 (AA'BB', 2H, C3'-H e C5'-H), 8,21 (AA'BB', 2H, C2'-H e C6'-H), 4,36 (*t*, $J=6$ e 9 Hz, 2H, C1-H), 1,73-1,86 (*m*, 2H, C2-H), 1,32-1,49 (*m*, 4H, C3-H e C4-H), 0,93 (*t*, $J=6$ e 9 Hz, 3H, C5-H).



$^{13}\text{C RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 164,90 (C7'), 150,60 (C1'), 136,02 (C4'), 130,80 (C2' e C6'), 123,66 (C3' e C5'), 66,25 (C1), 28,44 (C2), 28,25 (C3), 22,47 (C4), 14,10 (C5).

4. 4-nitrobenzoato de hexilo (1d)

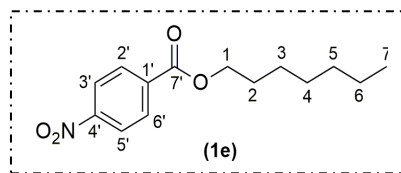
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8,29 (AA'BB', 2H, C3'-H e C5'-H), 8,21 (AA'BB', 2H, C2'-H e C6'-H), 4,37 (*t*, $J=9$ e 6 Hz, 2H, C1-H), 1,75-1,85 (*m*, 2H, C2-H), 1,27-1,51 (*m*, 6H, C3-H a C5-H), 0,90 (*t*, $J=6$ e 9 Hz, 3H, C6-H).



$^{13}\text{C RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 164,78 (C7'), 150,47 (C4'), 135,89 (C1'), 130,67 (C2'/C6'), 123,54 (C3'/C5'), 66,26 (C1), 28,69 (C2), 25,78 (C3), 31,55 (C4), 22,67 (C5), 14,14 (C6).

5. 4-nitrobenzoato de heptilo (1e)

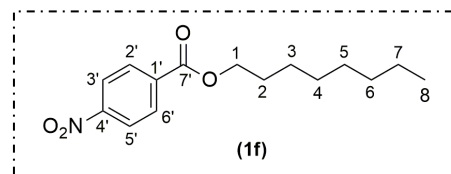
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8,29 (AA'BB', 2H, C3'-H e C5'-H), 8,21 (AA'BB', 2H, C2'-H e C6'-H), 4,36 (*t*, $J=6$ Hz, 2H, C1-H), 1,73-1,84 (*m*, 2H, C2-H), 1,24-1,50 (*m*, 8H, C3-H a C6-H), 0,89 (*t*, $J=6$ e 9 Hz, 3H, C7-H).



$^{13}\text{C RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 164,90 (C7'), 150,57 (C4'), 136,00 (C1'), 130,79 (C2' e C6'), 123,66 (C3' e C5'), 66,26 (C1), 28,72 (C2), 26,07 (C3), 29,05 (C4), 31,84 (C5), 22,72 (C6), 14,21 (C7).

6. 4-nitrobenzoato de octilo (1f)

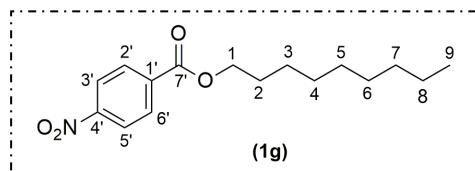
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8,29 (AA'BB', 2H, C3'-H e C5'-H), 8,21 (AA'BB', 2H, C2'-H e C6'-H), 4,37 (*t*, $J=6$ e 9 Hz, 2H, C1-H), 1,23-1,50 (*m*, 2H, C2-H), 1,23-1,50 (*m*, 10H, C3-H a C7-H), 0,89 (*t*, $J=6$ e 9 Hz, 3H, C8-H).



$^{13}\text{C RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 164,90 (C7'), 150,65 (C4'), 136,06 (C1'), 130,80 (C2' e C6'), 123,66 (C3' e C5'), 66,27 (C1), 28,75 (C2), 26,12 (C3), 29,35 (C4), 29,30 (C5), 31,91 (C6), 22,77 (C7), 14,21 (C8).

7. 4-nitrobenzoato de nonilo (1g)

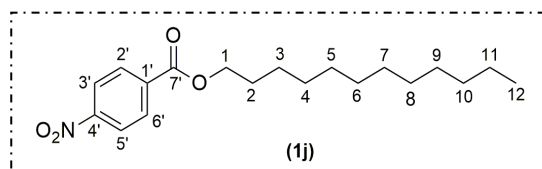
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8,29 (AA'BB', 2H, C3'-H e C5'-H), 8,21 (AA'BB', 2H, C2'-H e C6'-H), 4,37 (*t*, $J=6$ e 9 Hz, 2H, C1-H), 1,73-1,86 (*m*, 2H, C2-H), 1,21-1,51 (*m*, 12H, C3-H a C8-H), 0,88 (*t*, $J=6$ Hz, 3H, C9-H).



$^{13}\text{C RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 164,90 (C7'), 150,65 (C4'), 135,06 (C1'), 130,80 (C2'/C6'), 123,66 (C3'/C5'), 66,27 (C1), 28,75 (C2), 26,12 (C3), 29,36 (C4), 29,38 (C5), 29,60 (C6), 31,98 (C7), 22,79 (C8), 14,22 (C9).

8. 4-nitrobenzoato de dodecilo (1j)

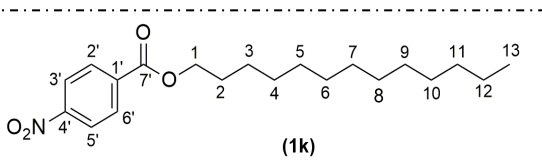
^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8,29 (AA'BB', 2H, C3'-H e C5'-H), 8,20 (AA'BB', 2H, C2'-H e C6'-H), 4,37 (*t*, $J=6$ e 9 Hz, 2H, C1-H), 1,73-1,86 (*m*, 2H, C2-H), 1,21-1,50 (*m*, 18H, C3-H a C11-H), 0,88 (*t*, $J=6$ e 9 Hz, 3H, C12-H).



^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 164,90 (C7'), 150,65 (C4'), 136,06 (C1'), 123,66 (C2' e C6'), 130,80 (C3' e C5'), 66,27 (C1), 28,76 (C2), 26,12 (C3), 29,39 (C4), 29,48 (C5), 32,05 (C10), 22,82 (C11), 14,24 (C12).

9. 4-nitrobenzoato de tridecilo (1k)

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8,29 (AA'BB', 2H, C3'-H e C5'-H), 8,21 (AA'BB', C2'-H e C6'-H), 4,37 (*t*, $J=6$ Hz, 2H, C1-H), 1,73-1,85 (*m*, 2H, C2-H), 1,22-1,50 (*m*, 20H, C3-H a C12-H), 0,88 (*t*, $J=6$ e 9 Hz, 3H, C13-H).



^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 164,90 (C7'), 150,65 (C4'), 136,06 (C1'), 130,80 (C2' e C6'), 123,65 (C3' e C5'), 66,27 (C1), 28,75 (C2), 26,12 (C3), 29,38 (C4), 29,49 (C5), 32,06 (C11), 22,82 (C12), 14,24 (C13).

Os espectros de RMN encontram-se no Anexo 1.3 e os compostos **1a** a **1g**, **1j** e **1k** estavam puros.

O sumário das características e rendimentos dos 4-nitrobenzoatos de alquila encontra-se na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Sumário das características e rendimentos obtidos dos 4-nitrobenzoatos de alquila.

Composto	R	Estado Físico	Ponto de fusão / °C	Rendimento / η (%)
1a	C_3H_7	Sólido Amarelo	29-31	15
1b	C_4H_9	Sólido Branco	32-34	89
1c	C_5H_{11}	Óleo Amarelo	-	80
1d	C_6H_{13}	Óleo Amarelo	-	25
1e	C_7H_{15}	Óleo Amarelo	-	80
1f	C_8H_{17}	Óleo Amarelo	-	6
1g	C_9H_{19}	Óleo Amarelo	-	24
1j	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}$	Sólido Amarelo	38-39	57
1k	$\text{C}_{13}\text{H}_{27}$	Sólido Branco	37-38	86

• 3,5-dinitrobenzoatos de alquila

De seguida, dissolveram-se 2,5 mmol de álcool (**6**) em 10 mL de tetrahidrofurano (THF) seco. O solvente THF foi seco previamente com fio de sódio. A reação ocorreu em refluxo e formou-se o éster pretendido¹²⁶ (**2a** para o caso da esterificação com o álcool $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ – Figura 4.3). A mistura foi aquecida sob refluxo e acompanhada por TLC com uma mistura de hexano e acetato de etilo (9:1) até a reação estar completa. Para a revelação da placa utilizou-se radiação ultravioleta (UV) e os reveladores químicos de iodo e 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP).

Terminada a reação até a reação procedeu-se à evaporação do solvente THF e à purificação do produto por cromatografia em coluna *flash* usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (9,5:0,5).

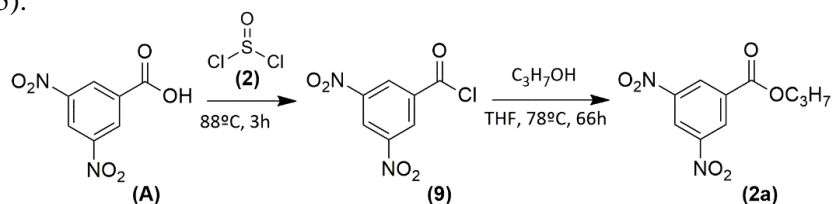


Figura 4.3. Síntese exemplo de um derivado de ácido 3,5-dinitrobenzóico pelo método A - Éster 3,5-dinitrobenzoato de propilo (2a).

Na Tabela 4.3. são apresentadas as condições experimentais da síntese dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo pelo método A1:

Tabela 4.3. Condições experimentais da síntese de 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo pelo método A1.

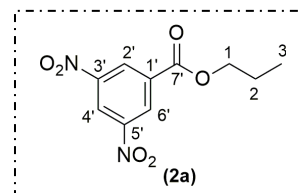
Composto	R	T ₁ ^{°refluxo / °C + agitação}	t ₂ ^{°refluxo / h}	T ₂ ^{°refluxo / °C + agitação}	t ₂ ^{°refluxo / h}	Rendimento/ %
2a	C ₃ H ₇	88	3	78	65	60
2d	C ₆ H ₁₃	88	3	78	65	39
2f	C ₈ H ₁₇	88	3	78	65	18

Por este método foram obtidos 3 compostos (**2a**, **2d** e **2f**) em que **2a** apresentou um bom rendimento (Tabela 4.3) e efetuada a sua caracterização estrutural por RMN.

Caracterização Estrutural por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo

1. 3,5-dinitrobenzoato de propilo (2a)

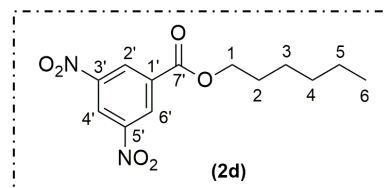
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 9,22 (*t*, *J* = 3 Hz, 1H, C4'-H), 9,16 (*d*, *J* = 3 Hz, 2H, C2'-H e C6'-H), 4,42 (*t*, *J* = 6 Hz, 2H, C1-H), 1,80-1,93 (*m*, 2H, C2-H), 1,06 (*t*, *J* = 6 e 9 Hz, 3H, C3-H).



¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 162,70 (C7'), 148,84 (C3' e C5'), 134,33 (C1'), 129,45 (C2' e C6'), 122,44 (C4'), 68,63 (C1), 22,12 (C2), 10,52 (C3).

2. 3,5-dinitrobenzoato de hexilo (2d)

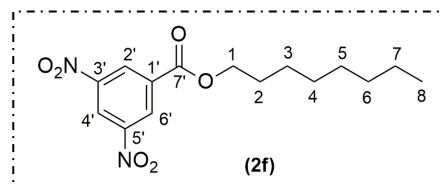
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 9,22 (*t*, *J* = 3 Hz, 1H, C4'-H), 9,16 (*d*, *J* = 3 Hz, 2H, C2'-H e C6'-H), 4,45 (*t*, *J* = 6 Hz, 2H, C1-H), 1,77-1,89 (*m*, 2H, C2-H), 1,29-1,50 (*m*, 6H, C3-H e C5-H), 0,92 (*t*, *J* = 6 Hz, 3H, C6-H).



¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 162,71 (C7'), 148,85 (C3' e C5'), 134,35 (C1'), 129,54 (C2' e C6'), 122,42 (C4'), 67,30 (C1), 28,66 (C2), 25,70 (C3), 31,52 (C4), 22,65 (C5), 14,10 (C6).

3. 3,5-dinitrobenzoato de octilo (2f)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 9,22 (*t*, *J* = 2,1 Hz, 1H, C4'-H), 9,16 (*d*, *J* = 3 Hz, 2H, C2'-H e C6'-H), 4,45 (*t*, *J* = 6 Hz, 2H, C1-H), 1,78-1,89 (*m*, 2H, C2-H), 1,25-1,50 (*m*, 10H, C3-H a C7-H), 0,89 (*t*, *J* = 6 Hz, 3H, C8-H).



^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 162,56 ($\text{C}7'$), 148,69 ($\text{C}3'$ e $\text{C}5'$), 134,20 ($\text{C}1'$), 129,39 ($\text{C}2'$ e $\text{C}6'$), 122,27 ($\text{C}4'$), 67,15 ($\text{C}1$), 28,54 ($\text{C}2$), 25,88 ($\text{C}3$), 29,16 ($\text{C}4$), 29,12 ($\text{C}5$), 31,91 ($\text{C}6$), 22,61 ($\text{C}7$), 14,05 ($\text{C}8$).

Os espectros de RMN encontram-se no Anexo 1.3 e os compostos **2a**, **2d** e **2f** estavam puros.

O sumário das características e rendimentos dos 4-nitrobenzoatos de alquilo encontram-se na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Sumário das características e rendimentos obtidos dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo.

Composto	R	Estado Físico	Ponto de fusão / °C	Rendimento / η (%)
2a	C_3H_7	Sólido Amarelo	70-72	60
2d	C_6H_{13}	Sólido Branco	58-59	44
2f	C_8H_{17}	Sólido Branco	61-63	18

4.3.2. Procedimento geral dos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo e dos 3,5-di(trifluorometil)benzoatos de alquilo - Método A2

No método A2 tal como no método A1 é feita a conversão do ácido carboxílico no respetivo cloreto de acilo (**4**)¹²⁷. Este método difere de A1 na parte final do procedimento, pois aqui fez-se uma prévia ativação do álcool com uma base forte, hidreto de sódio (NaH), para se formar o ião alcóxido. A reação de adição do ião alcóxido (forte nucleófilo) ao cloreto de acilo ocorreu na presença de piridina (mecanismo 2 em Anexo 1.2).

Pelo método A2 foram sintetizados os 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo e os 3,5-di(trifluorometil)benzoatos de alquilo (Figura 4.4).

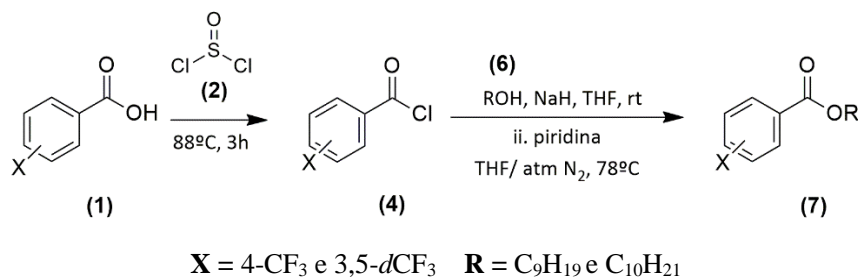


Figura 4.4. Síntese dos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo e dos 3,5-di(trifluorometil)benzoatos de alquilo pelo método A2.

Adicionaram-se 3,43 mL (47,25 mmol) de cloreto de tionilo (**2**) a 0,2 g (1,05 mmol) de ácido 4-(trifluorometil)benzóico ou (0,75 mmol) de ácido 3,5-di(trifluorometil)benzóico e colocou-se a reação em refluxo durante 3h a 88°C para se formar o respetivo cloreto de acilo (**4**)¹²⁷. Durante a reação ocorreu a libertação de dióxido de enxofre até se formar o éster pretendido. O reagente cloreto de tionilo foi também o solvente da reação. Após o término da reação, evaporou-se o solvente em excesso.

- **4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo**

Dissolveram-se 0,875 mmol de álcool a 0,875 mmol de hidreto de sódio (NaH) dissolvidos em 2 mL de tetrahydrofurano seco para ativar o álcool (**6**) e formar-se o respetivo alcóxido. O alcóxido foi adicionado ao cloreto de acilo (**4**) dissolvido em 5 mL de THF seco e, por último, adicionam-

se 0,085 mL (1,05 mmol) de piridina¹²⁸. A reação ocorreu em refluxo a 78 °C até se formar o éster pretendido (**3b** para o caso da esterificação com o álcool C₁₀H₂₁OH – Figura 4.5).

Na síntese de 4-(trifluorometil)benzoato de nonilo **não se adicionou** piridina.

A reação foi acompanhada por TLC usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (9,7:0,3) até a reação estar completa. Para a revelação dos compostos orgânicos utilizou-se radiação ultravioleta (UV) e os reveladores químicos de iodo e permanganato de potássio.

Por fim, procedeu-se à evaporação do solvente THF e à purificação do produto por cromatografia de coluna *flash*. O eluente utilizado na purificação foi hexano.

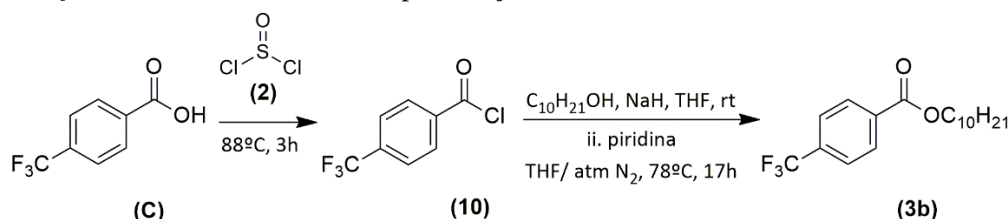


Figura 4.5. Síntese de um derivado de ácido 4-trifluorometilbenzóico pelo método A2 - Éster 4-(trifluorometil)benzoato de decilo (**3b**).

A Tabela 4.5. apresenta as condições experimentais da síntese dos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo pelo método A2:

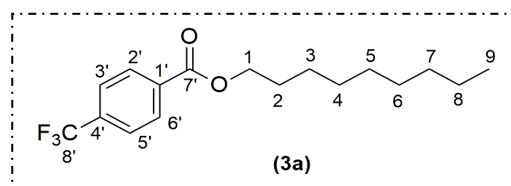
Tabela 4.5. Sumário das condições experimentais utilizadas na síntese dos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo pelo método A2.

Composto	R	T ₁ ^{refluxo} / °C + agitação	t ₂ ^{refluxo} / h	T ₂ ^{refluxo} / °C + agitação	t ₂ ^{refluxo} / h	Rendimento/ %
3a	C ₉ H ₁₉	88	3	77	216	12
3b	C ₁₀ H ₂₁	88	3	78	17	89

Caracterização Estrutural por Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear dos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo

1. 4-(trifluorometil)benzoato de nonilo (**3a**)

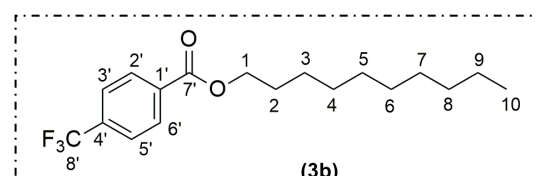
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,16 (*d*, *J* = 6 Hz, 2H, C2'-H e C6'-H), 7,70 (*d*, *J* = 6 Hz, 2H, C3'-H e C5'-H), 4,35 (*t*, *J* = 6 Hz, 2H, C1-H), 1,71-1,83 (*m*, 2H, C2-H), 1,21-1,50 (*m*, 12H, C3-H a C8-H), 0,88 (*t*, *J* = 6 Hz, 3H, C9-H).



¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 165,60 (C7'), 135,14 (C4'), 133,93 (C1'), 130,09 (C2' e C6'), 125,54 (C3' e C5'), 124,61 (*J*_{C-F}=270 Hz, C8'), 65,87 (C1), 28,80 (C2), 26,15 (C3), 29,37 (C4), 29,41 (C5), 29,62 (C6), 31,99 (C7), 22,80 (C8), 14,21 (C9).

2. 4-(trifluorometil)benzoato de decilo (**3b**)

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,15 (*d*, *J* = 9 Hz, 2H, C2'-H e C6'-H), 7,70 (*d*, *J* = 9 Hz, 2H, C3'-H e C5'-H), 4,34 (*t*, *J* = 6 e 9 Hz, 2H, C1-H), 1,71-1,84 (*m*, 2H, C2-H), 1,20-1,49 (*m*, 14H, C3-H a C9-H), 0,87 (*t*, *J* = 6 Hz, 3H, C10-H).



^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 165,62 ($\text{C}7'$), 135,09 ($\text{C}4'$), 133,83 ($\text{C}1'$), 130,08 ($\text{C}2'$ e $\text{C}6'$), 125,54 ($\text{C}3'$ e $\text{C}5'$), 124,61 ($J_{\text{C-F}}=270$ Hz, $\text{C}8'$), 65,88 ($\text{C}1$), 28,77 ($\text{C}2$), 26,14 ($\text{C}3$), 29,40 ($\text{C}4$), 29,45 ($\text{C}5$), 29,67 ($\text{C}6$ e $\text{C}7$), 32,03 ($\text{C}8$), 22,83 ($\text{C}9$), 14,26 ($\text{C}10$).

Os espectros de RMN encontram-se no Anexo 1.3 e o composto **3a** estava puro.

O sumário das características e rendimentos dos 4-nitrobenzoatos de alquilo encontram-se na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Sumário das características dos 4-(trifluorometil)benzoatos de alquilo.

Composto	R	Estado Físico	Rendimento / η (%)
3a	C_9H_{19}	Óleo Amarelo Claro	12
3b	$\text{C}_{10}\text{H}_{21}$	Óleo Amarelo Claro	89

• 3,5-di(trifluorometil)benzoatos de alquilo

Adicionaram-se 0,157 mL (0,625 mmol) de decanol em 0,015 g (0,625 mmol) de NaH dissolvidos previamente em 2 mL de tetrahidrofurano seco para ativar o álcool (**6**) e formar-se o respetivo alcóxido. O alcóxido foi adicionado ao cloreto de acilo dissolvido em 5 mL de THF seco e, por último, adicionaram-se 0,060 mL (0,75 mmol) de piridina¹²⁸. A reação iniciou-se em refluxo a 78°C para se formar o éster pretendido (**7**) e ocorre durante 24h.

A reação foi acompanhada por TLC com uma mistura de hexano e acetato de etilo (9,7:0,3) até a reação estar completa. Para a revelação dos compostos orgânicos utilizou-se radiação ultravioleta (UV) e os reveladores químicos de iodo e permanganato de potássio.

Por fim, procedeu-se à evaporação do solvente THF e à purificação do produto por cromatografia em coluna *flash*. O eluente utilizado na purificação foi hexano.

Na Figura 4.6 é apresentado o método de síntese A2 para obtenção do éster 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo (**4a**).

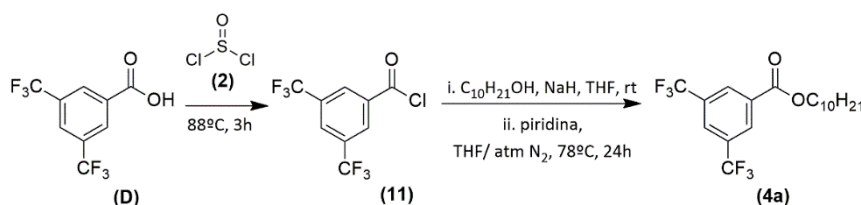


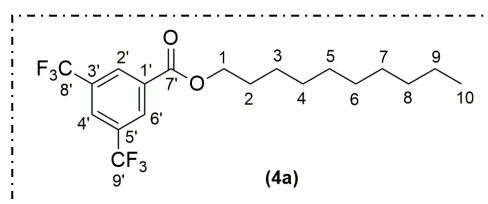
Figura 4.6. Síntese exemplo de um derivado de ácido 3,5-di(trifluorometil)benzóico pelo método A2 - Éster 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo (**4a**).

Produto puro – Óleo incolor; η = 35%

Caracterização por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear dos 3,5-di(trifluorometil)benzoatos de alquilo

3. 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo (**4a**)

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8,48 (*sa*, 2H, $\text{C}2'$ -H e $\text{C}6'$ -H), 8,06 (*sa*, **1h**, $\text{C}4'$ -H), 4,39 (*t*, $J=6$ Hz, 2H, $\text{C}1$ -H), 1,74-1,80 (*m*, 2H, $\text{C}2$ -H), 1,20-1,50 (*m*, 14H, $\text{C}3$ -H a $\text{C}9$ -H), 0,87 (*t*, $J=6$ Hz, 3H, $\text{C}10$ -H).



^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 164,01 ($\text{C}7'$), 132,34 ($\text{C}3'$ e $5'$), 131,89 ($\text{C}1'$), 129,69 ($\text{C}2'$ e $\text{C}6'$), 126,25 ($\text{C}4'$), 124,25 ($^1J_{\text{C-F}}=270$ Hz), 65,44 ($\text{C}1$), 28,57 ($\text{C}2$), 25,92 ($\text{C}3$), 29,24 ($\text{C}4$), 29,31 ($\text{C}5$), 31,88 ($\text{C}8$), 22,68 ($\text{C}9$), 14,12 ($\text{C}10$).

Os espectros de RMN encontram-se no Anexo 1.3 e os compostos **4a** estava puro.

4.3.3. Procedimento geral do 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de alquilo - Método A3

Pelo método A3 sintetizou-se unicamente o derivado 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo (**5a**). Na Figura 4.7 é esquematizado o procedimento para a sua obtenção.

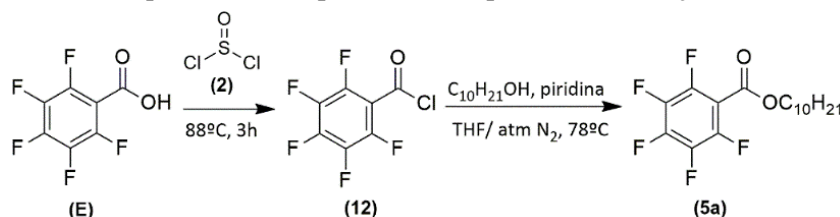


Figura 4.7. Síntese de 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo (**5a**) pelo método A3.

Adicionaram-se 3,43 mL (47,25 mmol) de cloreto de tionilo (**2**) a 0,2 g (1 mmol) de ácido 2,3,4,5,6-pentafluorobenzóico (**E**) e colocou-se a reação em refluxo durante 3h a 88°C para se formar o cloreto de acilo (**12**). Durante a reação ocorreu a liberação de dióxido de enxofre até se formar o cloreto de 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoílo. O reagente cloreto de tionilo é o solvente da reação. Após o término da reação, evaporou-se o solvente em excesso.

Adicionaram-se 0,16 mL (0,83 mmol) de decanol e 0,081 mL (1 mmol) de piridina¹²⁸ ao cloreto de acilo sintetizado (**12**) dissolvido em 5 mL de THF seco. A reação ocorreu em refluxo a 78 °C éster pretendido (**5a**) durante dois dias.

A reação foi acompanhada por TLC com uma mistura de hexano e acetato de etilo (9,7:0,3) até a reação estar completa. Para a revelação dos compostos orgânicos utilizou-se radiação ultravioleta (UV) e os reveladores químicos de iodo e permanganato de potássio.

Por fim, procedeu-se à evaporação do solvente THF e à purificação do produto por cromatografia em coluna *flash*. O eluente utilizado na purificação foi hexano.

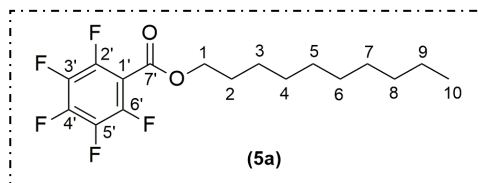
Produto puro – Óleo Amarelo Claro; η = 9%

Caracterização por Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

1. 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo (**5a**)

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 4,38 (*t*, $J=6$ e 9 Hz, 2H, $\text{C}1\text{-H}$), 1,69-1,82 (*m*, 2H, $\text{C}2\text{-H}$), 1,20-1,48 (*m*, 14H, $\text{C}3\text{-H}$ a $\text{C}9\text{-H}$), 0,88 (*t*, $J=6$ Hz, 3H, $\text{C}10\text{-H}$).

^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 165,83 ($\text{C}7'$), 154,72, 145,44, 139,87, 109,88 ($\text{C}1'$ a $\text{C}6'$), 65,33 ($\text{C}1$), 28,78 ($\text{C}2$), 26,04 ($\text{C}3$), 29,38 ($\text{C}4$), 29,59 ($\text{C}5$), 29,67 ($\text{C}6$), 29,67 ($\text{C}7$), 31,95 ($\text{C}8$), 22,72 ($\text{C}9$), 14,12 ($\text{C}10$).



A atribuição dos sinais de próton e carbono do composto **5a** foi realizada por comparação aos sinais de próton e carbono de outros compostos com o grupo decilo na sua estrutura química, uma vez que os sinais nos espectros obtidos eram pouco visíveis.

Os espectros de RMN encontram-se no Anexo 1.3 e o composto **5a** estava puro.

4.3.4. Método B

Neste método, ocorre uma reação de esterificação entre o ácido carboxílico e um agente de acoplamento, o reagente 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) (**3**), para ocorrer a formação de um derivado de imidazol (**5**) e, conseqüentemente, ocorre a libertação de dióxido de carbono (CO_2)¹²⁹. com libertação de dióxido de carbono (CO_2). Por último, adiciona-se o álcool (**6**) sem ativação prévia para formar o éster (**7**) (Figura 4.8). O intermediário imidazol não é tão reativo como o cloreto de acilo utilizado no método A.

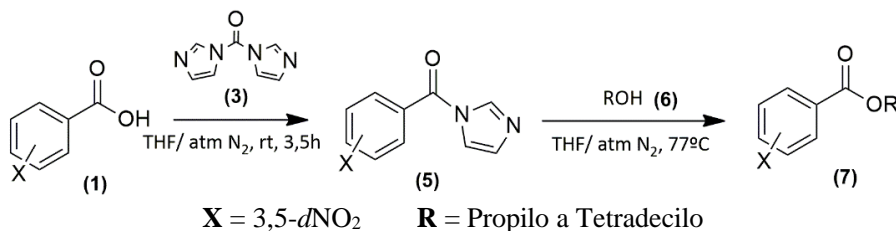


Figura 4. 8. Síntese dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo pelo método B.

Pelo método B foram sintetizados os 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo.

4.3.4.1. Procedimento geral dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo – Método B

Adicionaram-se quantidades equimolares (1mmol) de CDI e de ácido 3,5-dinitrobenzóico (**B**) dissolvidos em 10 mL de tetrahydrofurano (THF) seco com fio de sódio previamente. A reação ocorreu à temperatura ambiente e sob a agitação durante 3,5h.

Na Figura 4.9 é apresentado o método B para obtenção de ésteres do ácido 3,5-dinitrobenzóico aplicado ao caso particular da síntese do éster 3,5-dinitrobenzoato de tetradecilo (**21**).

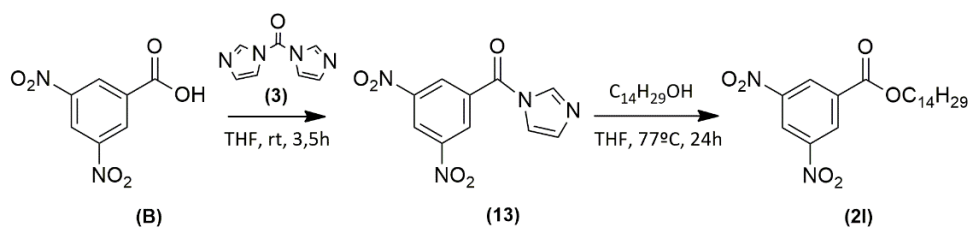


Figura 4.9. Síntese exemplo de um dos derivados do ácido 3,5-dinitrobenzóico - Éster 3,5-dinitrobenzoato de tetradecilo (**21**).

Após a formação do derivado de imidazol (**13**), juntaram-se 0,83 mmol de tetradecanol e reação ocorreu em refluxo a 77°C e sob agitação até formar-se o éster (**21**). A reação foi acompanhada por TLC com uma mistura de hexano e acetato de etilo (9:1) até a reação estar completa. Para a revelação dos compostos orgânicos utilizou-se radiação ultravioleta (UV) e os reveladores químicos de iodo e 2,4-dinitrofenilhidrazina.

Por último, procedeu-se à evaporação do solvente e purificação do composto por cromatografia em coluna *flash*. Na purificação, obteve-se o produto final com o eluente hexano e acetato de etilo 9,6:0,4.

A Tabela 4.7. apresenta as condições experimentais da síntese dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo pelo método B:

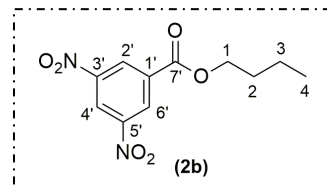
Tabela 4.7. Sumário das condições experimentais na síntese de 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo pelo método B.

Composto	R	Tambiente + agitação/ h	Trefluxo / °C + agitação	trefluxo / h	Rendimento/ %
2b	C ₄ H ₉	3	77	24	57
2c	C ₅ H ₁₁	3,5	77	48	39
2e	C ₇ H ₁₉	3,5	77	168	49
2k	C ₁₃ H ₂₇	3,5	77	120	55
2l	C ₁₄ H ₂₉	3,5	77	24	78

Caracterização Estrutural por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo

1. 3,5-dinitrobenzoato de butilo (2b)

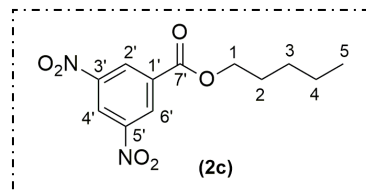
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 9,23 (*t*, *J*= 2,1 Hz, 1H, C4'-H), 9,15 (*d*, *J*= 3 Hz, 2H, C2'-H e C6'-H), 4,46 (*t*, *J*= 6 Hz, 2H, C1-H), 1,77-1,88 (*m*, 2H, C2-H), 1,43-1,55 (*m*, 2H, C3-H), 1,01 (*t*, *J*= 6 Hz, 3H, C4-H).



¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 162,71 (C7'), 148,64 (C3' e C5'), 134,16 (C1'), 129,54 (C2' e C6'), 122,42 (C4'), 66,99 (C1), 30,71 (C2), 19,30 (C3), 13,82 (C4).

2. 3,5-dinitrobenzoato de pentilo (2c)

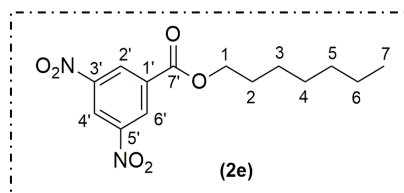
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 9,22 (*t*, *J*= 3 Hz, 1H, C4'-H), 9,16 (*d*, *J*= 3 Hz, 2H, C2'-H e C6'-H), 4,45 (*t*, *J*= 6 e 9 Hz, 2H, C1-H), 1,78-1,90 (*m*, 2H, C2-H), 1,36-1,49 (*m*, 4H, C3-H e C4-H), 0,95 (*t*, *J*= 6 Hz, 3H, C5-H).



¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 162,71 (C7'), 148,85 (C3' e C5'), 134,35 (C1'), 129,55 (C2' e C6'), 122,43 (C4'), 67,29 (C1), 28,39 (C2), 28,16 (C3), 22,44 (C4), 14,06 (C5).

3. 3,5-dinitrobenzoato de heptilo (2e)

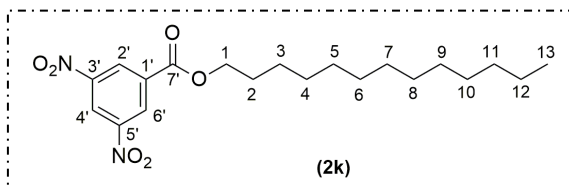
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 9,23 (*t*, *J*= 2,1 Hz, 1H, C4'-H), 9,16 (*d*, *J*= 3 Hz, 2H, C2'-H e C6'-H), 4,45 (*t*, *J*= 6 Hz, 2H, C1-H), 1,78-1,89 (*m*, 2H, C2-H), 1,28-1,49 (*m*, 8H, C3-H a C6-H), 0,90 (*t*, *J*= 6 Hz, 3H, C7-H).



¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 162,75 (C7'), 148,84 (C3' e C5'), 134,5 (C1'), 129,45 (C2' e C6'), 122,43 (C4'), 67,30 (C1), 28,70 (C2), 26,00 (C3), 29,02 (C4), 31,81 (C5), 22,70 (C6), 14,17 (C7).

4. 3,5-dinitrobenzoato de tridecilo (2k)

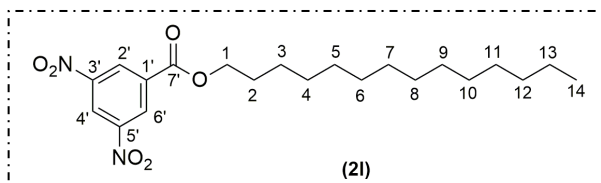
^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 9,22 (*t*, $J=3$ Hz, 1H, C4'-H), 9,16 (*d*, $J=3$ Hz, 2H, C2'-H e C6'-H), 4,45 (*t*, $J=6$ Hz, 2H, C4-H), 1,78-1,89 (*m*, 2H, C2-H), 1,23-1,49 (*m*, 20H, C3-H a C12-H), 0,88 (*t*, $J=9$ Hz, 3H, C13-H).



^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 162,71 (C7'), 148,85 (C3' e C5'), 134,36 (C1'), 129,45 (C2' e C6'), 122,42 (C4'), 67,31 (C1), 28,70 (C2), 26,04 (C3), 29,36 (C4), 29,49 (C5), 32,06 (C11), 22,83 (C12), 14,25 (C13).

5. 3,5-dinitrobenzoato de tetradecilo (2l)

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 9,23 (*t*, $J=2,1$ e $2,4$ Hz, 1H, C4'-H), 9,16 (*d*, $J=3$ Hz, 2H, C2'-H e C6'-H), 4,44 (*t*, $J=6$ Hz, 2H, C4-H), 1,77-1,88 (*m*, 2H, C2-H), 1,21-1,49 (*m*, 22H, C3-H a C13-H), 0,87 (*t*, $J=6$ Hz, 3H, C14-H).



^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 162,70 (C7'), 148,76 (C3' e C5'), 134,28 (C1'), 129,57 (C2' e C6'), 122,44 (C4'), 67,30 (C1), 28,67 (C2), 26,02 (C3), 29,36 (C4), 29,50 (C5), 32,05 (C12), 22,83 (C13), 14,27 (C14).

Os espectros de RMN encontram-se no Anexo 1.3 e os compostos **2b**, **2c**, **2e**, **2k** e **2l** estavam puros.

O sumário das características e rendimentos dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo encontram-se na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Sumário das características e rendimentos obtidos dos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo.

Composto	R	Estado Físico	Ponto de fusão / °C	Rendimento / η (%)
2b	C ₄ H ₉	Sólido Branco	63-64	57
2c	C ₅ H ₁₁	Sólido Amarelo	44-46	39
2e	C ₇ H ₁₅	Sólido Branco	45-46	49
2k	C ₁₃ H ₂₇	Sólido Branco	63-64	55
2l	C ₁₄ H ₂₉	Sólido Branco	65-66	78

4.4. Estudos de Estabilidade dos Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos

A estabilidade dos ésteres de ácidos benzóicos substituídos foi avaliada em tampão fosfato a pH fisiológico e em plasma humano. Os ésteres são hidrolisados no respetivo ácido, tanto por via química como por via enzimática. Nos estudos cinéticos de decomposição dos ésteres nos diferentes meios, as amostras foram analisadas pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), tendo-se observado a diminuição da concentração do éster (substrato) e o aumento da concentração do respetivo ácido (produto de hidrólise), ao longo do tempo.

As condições empregues em HPLC são apresentadas na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Sumário das condições utilizadas no método analítico de HPLC.

Condições de HPLC
Aparelho – VWR Hitachi - Elite Lachrom Ultra
Coluna – LiChroCART® 250-4 Cartridge RP-8 (5 µm)
Pré-coluna – Sim
Detetor – UV VWR Hitachi L-2400 - Elite Lachrom Ultra
Injetor – Automático
Eluentes – ACN:água 80:20 contendo dihidrogenofosfato de potássio (0,001 mol/dm ³ e 0,002% (v/v) de ácido fosfórico (85%)).
Tipo de Eluição – Isocrática
Fluxo – 1,0 mL/min
Volume de Injeção – 20 µL
Tempo de Corrida – 5 min a 30 min dependendo do éster analisado

Para a escolha do comprimento de onda do detetor ultravioleta do HPLC foi determinado o comprimento de onda máximo para cada um dos ésteres e correspondentes ácidos em análise. Por espectroscopia UV/Visível, os comprimentos de onda observados foram 230nm nos 3,5-dinitrobenzoatos de alquilo e respetivo ácido e 255nm nos 4-nitrobenzoatos de alquilo e respetivo ácido (Anexo 2.1). Os tempos de retenção dos ésteres analisados de acordo com o método analítico utilizado encontram-se na Tabela 2.11.

Depois do método analítico definido, determinaram-se as curvas de calibração (concentração da solução padrão vs área do pico do analito - Anexo 2.2) através da análise dos cromatogramas obtidos (Anexo 2.3). A partir das curvas de calibração quantificaram-se as concentrações de éster e de ácido das amostras obtidas nos estudos cinéticos de estabilidade.

Deste modo, com os resultados cromatográficos, determinou-se a percentagem de degradação de éster nos estudos de estabilidade (Equação 4.1) e as constantes de velocidade de reação de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) correspondem às constantes de velocidade da reação da hidrólise dos ésteres (Equação 4.2) e os tempos de semivida ($t_{1/2}$) (Equação 4.3)¹³⁰.

$$\text{degradação de éster (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ de moles de ácido inicial}}{n^{\circ} \text{ de moles de éster final}} \times 100 \quad (4.1)$$

$$\ln c_t = -k_{obs} t + \ln c_o \quad (4.2)$$

Sendo c_t , a concentração do pró-fármaco determinada ao longo do tempo e, c_o , a concentração inicial no tempo inicial ($t=0$). A constante de velocidade de reação de pseudo-primeira ordem

(k_{obs}) foi calculada a partir do declive da equação da reta (Equação 4.1) obtida para cada éster analisado.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \quad (4.3)$$

4.4.1. Estudos de Estabilidade Química

A estabilidade química dos ésteres de BA foi estudada em tampão fosfato a pH 7,4 com concentração de 0,01M e força iónica de 0,15 M à temperatura de 37°C (temperatura do corpo humano). Em cada ensaio existiram vários controlos: um controlo negativo (éster em acetonitrilo) e três controlos positivos. Cada controlo foi preparado em *eppendorfs* em que o volume total foi 2mL e colocado sob agitação. Os ensaios foram realizados em triplicado e acompanhados por um controlo negativo para se monitorizar a concentração de éster não hidrolisado na reação em simultâneo com a concentração de éster hidrolisado nos controlos positivos ao longo do tempo.

Preparação da solução de tampão de fosfato a pH 7,4: dissolução de uma pastilha de tampão fosfato 0,01M, com cloreto de potássio 0,0027M e cloreto de sódio 0,137M na sua constituição em 200mL de água desionizada (força iónica 0,15M).

Preparação do controlo negativo: 1960µL de ACN e 40µL de éster (solução mãe de éster dissolvido em acetonitrilo com concentração de $2,5 \times 10^{-2}$ M). A concentração inicial de cada controlo negativo foi de 5×10^{-4} M.

Preparação do controlo positivo (amostras): As amostras foram compostas por 40µL de éster (a partir de uma solução mãe de éster $2,5 \times 10^{-2}$ M), 1600µL de solução tampão fosfato pH 7,4 e 360 µL de ACN (correspondem a 20% de ACN para facilitar a dissolução do éster). A concentração inicial de cada amostra foi de 5×10^{-4} M.

Preparação das amostras injetadas em HPLC: Uma alíquota (50 µL) da mistura reacional foi retirada a intervalos regulares e diluída em 450µL de ACN (diluição da amostra 1:10, concentração final 5×10^{-5} M) e analisadas por HPLC. A primeira alíquota retirada corresponde ao tempo 0 horas e as restantes alíquotas foram retiradas em tempos regulares de 1, 5, 24, 30, 48, 54, 72, 78, 96, 102, 144, 150, 168, 174, 192, 198, 240, 246 e 336 horas.

O estudo de estabilidade química acompanhou a reação de hidrólise química pela decomposição de éster.

4.4.2. Estudos de Estabilidade Enzimática

A estabilidade enzimática dos ésteres de BA foi estudada numa solução constituída por 80% de plasma humano e 20% de tampão fosfato pH 7,4 com concentração de 0,01M e força iónica de 0,15M a 37°C (temperatura do corpo humano). Em cada ensaio existiram vários controlos: um controlo negativo e três controlos positivos. Cada controlo foi preparado em *eppendorfs* em que o seu volume total foi 800µL e colocado sob agitação. Os ensaios foram realizados em triplicado e acompanhados por um controlo negativo para se acompanhar a concentração de éster não hidrolisado na reação em simultâneo com a concentração de éster hidrolisado nos controlos positivos ao longo do tempo.

Preparação do plasma humano: Recolhido de doadores anónimos e foi devidamente tratado previamente com heparina de lítio e centrifugado para se obter o sobrenadante. Foi armazenado a -20°C em *vials* esterilizados de 3mL.

Preparação da solução de tampão de fosfato a pH 7,4: dissolução de uma pastilha de tampão fosfato 0,01M, com cloreto de potássio 0,0027M e cloreto de sódio 0,137M na sua constituição em 200mL de água desionizada (força iónica 0,15M).

Preparação do controlo negativo: 1984µL de ACN com 16µL de éster (a partir de uma solução mãe de éster dissolvido em acetonitrilo com concentração de $2,5 \times 10^{-2}$ M). A concentração inicial de cada controlo negativo foi de 5×10^{-4} M.

Preparação do controlo positivo (amostras): As amostras eram compostas por 16µL de éster (a partir de uma solução mãe de éster $2,5 \times 10^{-2}$ M) com 640 µL de plasma humano e 160 µL de solução tampão fosfato pH 7,4. A concentração inicial de éster foi de 5×10^{-4} M com 2% de ACN.

Preparação das amostras injetadas em HPLC: Uma alíquota (50 µL) da mistura reacional é retirada a intervalos regulares e diluída em 450µL de ACN (diluição da amostra 1:10, concentração final 5×10^{-5} M) em *ependorfs* para que as enzimas precipitem e percam a sua atividade, marcando assim também o término da reação de hidrólise do éster. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14 000rpm por 15 minutos de forma a permitir que se remova o sobrenadante sem impurezas para que seja analisado por HPLC.

A primeira alíquota retirada corresponde ao tempo 0 horas e nos ésteres de cadeia alquílica curta (C3 a C9) as restantes alíquotas foram retiradas em tempos regulares de 0,5, 1, 2, 4, 6 e 24 horas e nos ésteres de cadeia alquílica comprida (C10 a C14) de 1, 6, 24, 30, 48, 54, 72 e 78 horas.

O estudo de estabilidade em plasma humano acompanhou a hidrólise enzimática pela decomposição de éster e aparecimento de ácido.

4.5. Estudos de Atividade Antimicobacteriana de Ésteres de Ácidos Benzóicos Substituídos

Os estudos de atividade antimicobacteriana em *M. tuberculosis* foram realizados pelo Doutor David Pires do grupo de investigação *Host-Pathogen Interaction* – laboratório da doutora Elsa Anes da Faculdade de Farmácia Universidade de Lisboa.

Estes estudos foram realizados em *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) e através destes determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) para todos os ésteres sintetizados assim como a concentração bactericida mínima (CMB).

Estirpes bacterianas e condições de cultura. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) foram cultivadas 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.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). 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 7H9 suplementado com OADC. Os aglomerados de bactérias foram removidos por tratamento ultrassónico de suspensões de bactérias em banho-maria por 15 minutos, seguido de centrifugação em baixa velocidade (500 x g) por 2 minutos. A suspensão das células foi verificada por

microscopia. As bactérias foram testadas quanto à sua suscetibilidade a uma gama de concentrações de ésteres de 1,25 a 160 µg/ml em meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC que continham uma suspensão de micobactérias correspondente, aproximadamente, a 10⁵ unidades formadoras de colônias por ml. 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. Foram usadas bactérias tratadas e não tratadas com DMSO como controlo e não foi detetado nenhum efeito visível em todas as concentrações de DMSO testadas. A isoniazida foi usada como controlo positivo para a inibição do crescimento.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). Seguindo as experiências de determinação de CIM, as suspensões bacterianas com as várias concentrações de compostos foram aplicadas em meio sólido Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com OADC e incubadas a 37°C. Após 2 a 3 semanas de incubação, a CBM foi determinada como a menor concentração de composto que não resultou em crescimento bacteriano visível nas placas. As placas foram deixadas por mais 2 semanas para confirmar esses resultados. As bactérias não tratadas e tratadas com DMSO e tratadas com isoniazida foram mais uma vez usadas como controlo.

4.6. Citotoxicidade

Determinação da viabilidade de macrófagos após tratamento com compostos. 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 suplementado com soro bovino fetal a 10% (FBS), HEPES a 1%, piruvato de sódio a 1% e mantidas a 37°C com 5% de CO₂. A diferenciação de monócitos em macrófagos THP-1 foi induzida durante a noite com 20 nM de acetato de tetradecanoilforbol (PMA). Os macrófagos diferenciados em placas de 96 poços, 5x10⁴ células por poço, foram tratados com os compostos. Após três dias de tratamento, a viabilidade celular foi determinada usando AlamarBlue (Invitrogen), seguindo as indicações do fabricante. Resumidamente, as células foram lavadas com solução tampão de fosfato salino (PBS) e incubadas com AlamarBlue 10% (v/v) em meio de cultura de células. Após 4 h de incubação, a fluorescência de cada poço foi medida num espectrofotómetro 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 controlo.

Em cada concentração de composto aplicado e controlos procedeu-se à diluição de 1:2. As concentrações de DMSO aplicadas no meio de cultura foram 0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,31, 0,63, 1,25 e 2,5%. A Puromicina foi usada como controlo positivo para a morte celular, sendo as concentrações aplicadas 0,008, 0,016, 0,031, 0,063, 0,125, 0,25, 0,50, 1, 2, 4 e 8 µg/mL. As concentrações dos ésteres nitrados (séries 1 e 2), de 4-(trifluorometil)benzoato de nonilo, **3a**, e dos ácidos benzóicos substituídos aplicados no meio de cultura foram 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL e dos ésteres 4-(trifluorometil)benzoato de decilo, **3b**, 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo, **4a**, e 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo, **5a**, foram 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 e 512 µg/mL.

4.7. Log P, Constantes de Acidez e Atividade Biológica

Os valores de Log P foram calculados pelo programa ALOGPS 2.1¹¹⁶. As constantes de acidez (pK_a) dos ácidos (ácido 4-(trifluorometil)benzóico, ácido 3,5-di(trifluorometil)benzóico e ácido 2,3,4,5,6-pentafluorobenzóico) foram calculadas pelo programa de ChemAxon¹²¹ e as dos ácidos 4-nitrobenzóico e 3,5-dinitrobenzóico presentes na literatura¹²². A atividade biológica ($pCIM$) foi calculada pelo logaritmo do inverso da concentração inibitória mínima ($\log [1/CIM]$)⁴⁹ e para o cálculo de $pCIM$ utilizaram-se as CIM em μM . Os valores de Log P, pK_a e $pCIM$ encontram-se na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Valores de Log P de todos os compostos estudados e constantes de acidez dos ácidos BA substituídos.

Composto	X	R	Log P ALOGPS 2.1 ¹¹⁶	pK_a	$pCIM$
1a	4-NO ₂	C ₃ H ₇	2,58	-	-2,88
1b		C ₄ H ₉	2,83		-2,86
1c		C ₅ H ₁₁	3,25		-2,53
1d		C ₆ H ₁₃	3,73		-2,50
1e		C ₇ H ₁₅	4,20		-2,18
1f		C ₈ H ₁₇	4,69		-1,25
1g		C ₉ H ₁₉	5,22		-1,23
1h		C ₁₀ H ₂₁	5,63		-1,51
1i		C ₁₁ H ₂₃	6,09		-1,79
1j		C ₁₂ H ₂₅	6,61		-2,08
1k		C ₁₃ H ₂₇	7,07		-1,76
1l		C ₁₄ H ₂₉	7,59		-1,44
A		H	1,51	3,42 ¹²²	-2,68
2a	3,5-dNO ₂	C ₃ H ₇	2,40	-	-2,80
2b		C ₄ H ₉	2,77		-2,78
2c		C ₅ H ₁₁	3,06		-2,45
2d		C ₆ H ₁₃	3,57		-2,13
2e		C ₇ H ₁₅	4,05		-0,91
2f		C ₈ H ₁₇	4,41		-0,89
2g		C ₉ H ₁₉	4,74		-1,17
2h		C ₁₀ H ₂₁	5,18		-1,15
2i		C ₁₁ H ₂₃	5,73		-1,14
2j		C ₁₂ H ₂₅	6,08		-1,12
2k		C ₁₃ H ₂₇	6,33		-1,10
2l		C ₁₄ H ₂₉	6,62		-1,39
B		H	1,64	2,82 ¹²²	-2,58
3a	4-CF ₃	C ₉ H ₁₉	6,10	-	-2,08
3b		C ₁₀ H ₂₁	6,45		-2,59
C		H	2,56	4,05 ¹²¹	-2,38
4a	3,5-dCF ₃	C ₁₀ H ₂₁	6,20	-	> -2,51
D		H	3,27	3,81 ¹²¹	-2,49
5a	2,3,4,5,6-pF	C ₁₀ H ₂₁	5,42	-	-2,56
E		H	3,08	1,75 ¹²¹	-2,28
DMSO					> -3,31
INH					0,359

5. Bibliografia

1. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019.
2. Fogel, N. Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis* **95**, 527–531 (2015).
3. Lee, J. Y. Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. *Tuberc. Respir. Dis.* **78**, 47–55 (2015).
4. Seung, K. J., Keshavjee, S. & Rich, M. L. Multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, 1–19 (2015).
5. Smith, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 463–496 (2003).
6. Forbes, B. A. *et al.* Practice guidelines for clinical microbiology laboratories: Mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, 1–66 (2018).
7. Shinnick, T. M. & Diseases, M. Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**, 884–901 (1994).
8. Mi Wi, Y. Treatment of extrapulmonary nontuberculous mycobacterial diseases. *Infect Chemother.* **51**, 245–255 (2019).
9. Tortoli, E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 727–752 (2014).
10. Malhotra, S., Vedithi, S. C. & Blundell, T. L. Decoding the similarities and differences among mycobacterial species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, 1–18 (2017).
11. Stout, J. E., Koh, W. & Wai, W. Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. *Int. J. Infect. Dis.* **45**, 123–134 (2016).
12. Khare, N., Khare, P. & Singh, D. A. Review: history, structure, diagnosis and treatment of tuberculosis disease mycobacterial diseases. *Mycobact. Dis.* **8**, 8–11 (2018).
13. Bacteria. Microscopic view of bacterium *Mycobacterium tuberculosis*. Consultado online a 16/07/2019: <https://bit.ly/2HxVHc0>.
14. Bhat, Z. S. *et al.* Cell wall: a versatile fountain of drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomed. Pharmacother.* **95**, 1520–1534 (2017).
15. Ghazaei C. *Mycobacterium tuberculosis* and lipids: insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *J. Res. Med. Sci.* **23**, 1–10 (2018).
16. Hett, E. C., Rubin, E. J., Hett, E. C. & Rubin, E. J. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 126–156 (2008).
17. Ryan, K. J. *et al.* *Sherris Medical Microbiology* (Sixth Edition), McGraw-Hill (2014).
18. Favrot, L. & Ronning, D. R. Targeting the mycobacterial envelope for tuberculosis drug development. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **10**, 1023–1036 (2012).

19. Chiaradia, L. *et al.* Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
20. Singh, G., Singh, G., Jadeja, D. & Kaur, J. Lipid hydrolyzing enzymes in virulence: *Mycobacterium tuberculosis* as a model system. *Crit. Rev. Microbiol.* **36**, 259–269 (2010).
21. Forrellad, M. A. *et al.* Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* **4**, 1–64 (2013).
22. Lambert, P. A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 46–54 (2002).
23. Danilchanka, O., Pires, D., Anes, E. & Niederweis, M. The *Mycobacterium tuberculosis* outer membrane channel protein CpnT confers susceptibility to toxic molecules. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 2328–2336 (2015).
24. Tang, J., Yam, W. & Chen, Z. *Mycobacterium tuberculosis* infection and vaccine development. *Tuberculosis* **98**, 30–41 (2016).
25. Houben, E. N. G., Nguyen, L. & Pieters, J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 76–85 (2006).
26. Kumar, R. *et al.* Immunometabolism of phagocytes during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Front. Mol. Biosci.* **6**, 1–20 (2019).
27. Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A. B. & Netea, M. G. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Exp. Immunol.* **2011**, 1–12 (2011).
28. Huang, L., Nazarova, E. v. & Russell, D. G. *Mycobacterium tuberculosis*: bacterial fitness within the host macrophage. *Microbiol. Spectr.* **7**, 1–18 (2019).
29. Guirado, E. & Schlesinger, L. S. Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma – the critical battlefield in host immunity and disease. *Front. Microbiol.* **4**, 1–8 (2013).
30. Kiazzyk, S. & Ball, T. Latent tuberculosis infection: an overview. *Canada Commun. Dis. Rep.* **43**, 62–66 (2017).
31. Palmer, M. v & Thacker, T. C. Use of the human vaccine, *Mycobacterium bovis* *Bacillus Calmette Guérin* in deer. *Front. Vet. Sic.* **5**, 1–9 (2018).
32. Tenland, E. *et al.* Innate immune responses after airway epithelial stimulation with *Mycobacterium bovis* *Bacille-Calmette Guérin*. *Plos One* **11**, 1–15 (2016).
33. Matsuo, K. & Yasutomi, Y. *Mycobacterium bovis* *Bacille Calmette-Guérin* as a vaccine vector for global infectious disease control. *Tuberc. Res. Treat.* **2011**, 1–9 (2011).
34. Arbex, M. A., Varella, M. de C. L., de Siqueira, H. R. & de Mello, F. A. F. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: first line drugs. *J. Bras. Pneumol.* **36**, 626–640 (2010).
35. Gopal, P., Grüber, G., Dartois, V. & Dick, T. Pharmacological and molecular mechanisms behind the sterilizing activity of pyrazinamide. *Trends Pharmacol. Sci.* **40**, 930–940 (2019).

36. Zhang, Y., Shi, W., Zhang, W. & Mitchison, D. Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. *Microbiol. Spectr.* **2**, 1–12 (2014).
37. Zhang, Y., Wade, M. M., Scorpio, A., Zhang, H. & Sun, Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 790–795 (2003).
38. Stehr, M., Elamin, A. A. & Singh, M. Pyrazinamide: the importance of uncovering the mechanisms of action in mycobacteria. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* **13**, 593–603 (2015).
39. Zhang, Y. & Yew, W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* **19**, 1276–1289 (2015).
40. Somoskovi, A., Parsons, L. M. & Salfinger, M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir. Res.* **2**, 164–168 (2001).
41. Peterson, N. D., Rosen, B. C., Dillon, N. A. & Baughn, A. D. Uncoupling environmental pH and intrabacterial acidification from pyrazinamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 7320–7326 (2015).
42. Hertog, A. L. *et al.* Pyrazinamide is active against *Mycobacterium tuberculosis* cultures at neutral pH and low temperature. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 4956–4960 (2016).
43. Sun, Q. *et al.* The molecular basis of pyrazinamide activity on *Mycobacterium tuberculosis* PanD. *Nat. Commun.* **11**, 1–7 (2020).
44. Pires, D. *et al.* 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.* **59**, 7693–7699 (2015).
45. Nusrath, A., Subbian, S., Elizabeth, L. & Selvakumar, N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Genet. Evol.* **45**, 474–492 (2016).
46. Mitchison, D. & Davies, G. The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **16**, 724–732 (2012).
47. Janin, Y. L. Antituberculosis drugs: ten years of research. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 2479–2513 (2007).
48. Arbex, M. A., Varella, M. de C. L., Siqueira, H. R. de & Mello, F. A. F. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs. *J. Bras. Pneumol.* **36**, 641–56 (2010).
49. Patrick, E. J. *An Introduction to Medicinal Chemistry* (Third Edition), vol. 6 Oxford University Press Inc., United Kingdom (2013).
50. Karpagavalli, L. *et al.* A review on prodrugs. *IJNTPS* **6**, 1–5 (2016).
51. Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T. & Oliyai, R. Prodrugs: design and clinical applications. *Nat. Rev.* **7**, 255–270 (2008).
52. Shirke, S., Shewale, S. & Satpute, M. Design: an overview. *IJPRBS* **5**, 232–241 (2015).

53. Abet, V., Filace, F., Recio, J., Alvarez-builla, J. & Burgos, C. Prodrug approach: an overview of recent cases. *Eur. J. Med. Chem.* 1–18 (2016).
54. Liederer, B. M. & Borchardt, R. T. Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. *J. Pharm. Sci.* **95**, 1177–1195 (2006).
55. 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).
56. Silverman, R. B. & Holladay, M. W. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action* (Third Edition), Academic Press (2015).
57. Gareth, T. *Medicinal Chemistry: an Introduction* (Fifth Edition), John Wiley (2007).
58. Zhang, Y. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to weak acids. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 56–60 (2003).
59. Mukherjee, K., Tribedi, P., Mukhopadhyay, B. & Sil, A. K. Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **338**, 177–183 (2013).
60. March J. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanism, and Structure* (Second Edition), McGraw-Hill (1977).
61. Spencer M. S., Francis L. Hydrolysis of several substituted methyl benzoates in the aqueous solution, *Water Res.* **29**, 3, 965-969 (1995).
62. Lehninger A., Nelson D. L., C. M. M. *Lehninger - Principles of Biochemistry* (Fourth Edition), W.H. FREEMAN & Company (2005).
63. Lee, C. W. *et al.* Crystal structure and functional characterization of an esterase (EaEST) from *Exiguobacterium antarcticum*. *Plos One* **12**, 1–19 (2017).
64. 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).
65. Wheelock C. E., Nakagawa Y. Carboxylesterases – from function to the field: an overview of carboxylesterase biochemistry, structure – activity relationship, and use in environmental field monitoring. *J. Pestic. Sci.* **35**, 215–217 (2010).
66. Heikinheimo, P., Goldman, A., Jeffries, C. & Ollis, D. L. Of barn owls and bankers: a lush variety of α/β hydrolases. *Structure* **7**, 141–146 (1999).
67. Wang, D. *et al.* Human carboxylesterases: a comprehensive review. *Acta Pharm. Sin. B.* **8**, 699–712 (2018).
68. Fukami, T. & Yokoi, T. The emerging role of human esterases. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **27**, 466–477 (2012).
69. 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).
70. Bornscheuer, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 73–81 (2002).

71. Cao, J. *et al.* Identification and characterization of lipase activity and immunogenicity of LipL from *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* **10**, 1–20 (2015).
72. Pohanka, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap.* **155**, 219–230 (2011).
73. Albertí, J., Martinet, A., Sentellas, S. & Salvà, M. Identification of the human enzymes responsible for the enzymatic hydrolysis of acridinium bromide. *Drug Metab. Dispos.* **38**, 1202–1210 (2010).
74. Mackness, B., Quarck, R., Verreth, W., Mackness, M. & Holvoet, P. Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1545–1550 (2006).
75. Iglesia, R., Mansego, M. L., Sánchez-Muniz, F. J., Angeles Zulet, M. & Martinez, A. J. Arylesterase activity is associated with antioxidant intake and paraoxonase-1 (PON1) gene methylation in metabolic syndrome patients following an energy restricted diet. *EXCLI J.* **13**, 416–426 (2014).
76. Mohrman, D. E. & Heller, L. J. *Cardiovascular Physiology* (Ninth Edition), McGraw-Hill Education/LANGE (2018).
77. Ratnatilaka, B. P., Jithavech, P., Ongpipattanakul, B. & Rojsitthisak, P. Interspecies differences in stability kinetics and plasma esterases involved in hydrolytic activation of curcumin diethyl disuccinate, a prodrug of curcumin. *RSC Adv.* **9**, 4626–4634 (2019).
78. Fanali, G. *et al.* Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol. Aspects Med.* **33**, 209–290 (2012).
79. Goncharov, N. V. *et al.* Serum albumin binding and esterase activity: mechanistic interactions with organophosphates. *Molecules* **22**, 1–27 (2017).
80. Rudakova, E. V., Boltneva, N. P. & Makhaeva, G. F. Comparative analysis of esterase activities of human, mouse, and rat blood. *Bull. Exp. Biol. Med.* **152**, 73–75 (2011).
81. Li, B. *et al.* Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 1673–1684 (2005).
82. Masson, P. Froment, M.T., Gillon, E., Nachon, F., Lockridge, O., Schopfer, L.M. Hydrolysis of oxo- and thio-esters by human butyrylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1774**, 16–34 (2007).
83. Masson P, Carletti E, Nachon F. Structure, activities and biomedical applications of human butyrylcholinesterase. *Protein Pept Lett.* **16**, 1215–1224 (2009).
84. Cole, S. T. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537–544 (1998).
85. Larsen, E. M. & Johnson, R. J. Microbial esterases and ester prodrugs: an unlikely marriage for combating antibiotic resistance. *Drug Dev. Res.* **80**, 33–47 (2019).
86. Li, C. *et al.* Characterization and function of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv lipase Rv1076 (LipU). *Microbiol. Res.* **196**, 7–16 (2017).

87. Chen, L. *et al.* Characterization of a novel exported esterase Rv3036c from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr. Purif.* **104**, 50–56 (2014).
88. Guo, J. *et al.* Characterization of a novel esterase Rv0045c from *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* **5**, 4–10 (2010).
89. Shen, G. *et al.* LipC (rv0220) is an immunogenic cell surface esterase of mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.* **80**, 243–253 (2012).
90. Brust, B. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* lipolytic enzymes as potential biomarkers for the diagnosis of active tuberculosis. *PLoS ONE* **6**, 1–10 (2011).
91. Zhang, M. *et al.* Expression and characterization of the carboxyl esterase Rv3487c from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr. Purif.* **42**, 59–66 (2005).
92. Singh, K. H. *et al.* Characterization of a secretory hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis* sheds critical insight into host lipid utilization by *M. tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **292**, 11326–11335 (2017).
93. Santos P. P. *Química Orgânica - Volume 1*. (First Edition), IST Press (2011).
94. Harvey R. A., Clark M. A., Finkel R., Rey J. A., W. K. *Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology* (Fifth Edition), Lippincott Williams & Wilkins (2012).
95. Bernheim F. The Oxidation of benzoic acid and related substances by certain Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **143**, 383–389 (1942).
96. Saz., A. K. & Bernheim F. The effect of benzoic acid and related compounds on the growth of certain Mycobacteria. *J. Bacteriol.* **44**, 385–386 (1942).
97. Wade, M. M. & Zhang, Y. Effects of weak acids, UV and proton motive force inhibitors on pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 936–941 (2006).
98. Zhang, Y., Permar, S. & Sun, Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J. Med. Microbiol.* **51**, 42–49 (2002).
99. Basso, L. A., Blanchard, J. S., Santos, D. S., Souza, O. N. & Schroeder, E. K. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **3**, 197–225 (2002).
100. Gu, P., Constantino, L. & Zhang, Y. Enhancement of the antituberculosis activity of weak acids by inhibitors of energy metabolism but not by anaerobiosis suggests that weak acids act differently from the front-line tuberculosis drug pyrazinamide. *J. Med. Microbiol.* **57**, 1129–1134 (2008).
101. Choi, W. H. Evaluation of anti-tubercular activity of linolenic acid and conjugated-linoleic acid as effective inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **9**, 125–129 (2016).
102. Sharma, B., Pal, N., Malhotra, B. & Vyas, L. Evaluation of a rapid differentiation test for *Mycobacterium tuberculosis* from other mycobacteria by selective inhibition with p-nitrobenzoic acid using MGIT 960. *J. Lab. Physicians* **2**, 89 (2010).

103. Simões, M. F., Valente, E., Rodríguez, M. J., Anes, E. & Constantino, L. Lipophilic pyrazinoic acid amide and ester prodrugs Stability, activation and activity against *M. tuberculosis*. *J. Pharm. Sci.* **37**, 257–263 (2009).
104. 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 Pharm. J.* **22**, 376–380 (2014).
105. Rutkowska, E., Pająk, K. & Józwiak, K. Lipophilicity - Methods of determination and its role in medicinal chemistry. *Acta Pol. Pharm.* **70**, 3–18 (2013).
106. Miller M. J. *et al.* Design and syntheses of anti-tuberculosis agents inspired by BTZ043 using a scaffold simplification strategy. *ACS Med. Chem. Lett.* **5**, 587–591 (2014).
107. Valente E., Simões M. F., Testa B., & Constantino L. Development of a method to investigate the hydrolysis of xenobiotic esters by a *Mycobacterium smegmatis* homogenate. *J. Microbiol. Methods* **85**, 98–102 (2011).
108. Valente E. Beta lactamas como inibidores de proteases de serina e activação de pró-fármacos por esterases. Tese de Doutoramento Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.
109. Magalhães M. Estudo da atividade antimicobacteriana e ativação biológica de ésteres de ácidos orgânicos fracos. Tese de mestrado Faculdade de Ciências Universidade de Lisboa, 2012.
110. Kuhn, R. Notes. *Notes* **65**, 2253–2254 (1943).
111. Chin Chung, M., Longhin Bosquesi, P. & Leandro dos Santos, J. A Prodrug Approach to Improve the Physico-Chemical Properties and Decrease the Genotoxicity of Nitro Compounds. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 3515–3526 (2011).
112. Machado, D., Girardini, M., Viveiros, M. & Pieroni, M. Challenging the drug-likeness dogma for new drug discovery in Tuberculosis. *Front. Microbiol.* **9**, 1–23 (2018).
113. Patterson, S. & Wyllie, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends Parasitol.* **30**, 289–298 (2014).
114. Nepali, K., Lee, H. Y. & Liou, J. P. Nitro-Group-Containing Drugs. *J. Med. Chem.* **62**, 2851–2893 (2019).
115. Lourenço, M. C. S. *et al.* Evaluation of anti-tubercular activity of nicotinic and isoniazid analogues. *Arkivoc* **2007**, 181–191 (2007).
116. Virtual Computational Chemistry Laboratory. Alogps 2.1. Computer Program <http://146.107.217.178/lab/alogsps/start.html> (2016).
117. Jordan, M. & Geraldine, C. How an increase in the carbon chain length of the ester moiety affects the stability of a homologous series of oxprenolol esters in the presence of biological enzymes. *J. Pharm. Sci.* **87**, 880–885 (1998).
118. Lovewell R. R., Sasseti C. M., VanderVen B. C. Chewing the fat: lipid metabolism and homeostasis during *M. tuberculosis* infection. *Curr Opin Microbiol.* **29**, 30–36 (2016).
119. Santos, P. P. *Química Orgânica - Volume 2* (First Edition), IST Press (2013).

120. Perrin D. D., Dempsey B., Serjeant E.P. *pKa Prediction for Organic Acids and Bases. Analytica Chimica Acta*, vol. 152, Chapman and Hall (1981).
121. ChemAxon. Consultado online a 16/03/2020: <https://bit.ly/2IRZ8KM>.
122. Kortüm, G., Vogel, W. & Andrussow, K. *Dissociation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution. Pure and Applied Chemistry*, London Butterworths (1960).
123. Zhang, M. *et al.* Measuring cytotoxicity: a new perspective on LC50. *Anticancer Res.* **27**, 35–38 (2007).
124. Invivogen. Puromycin. Consultado online a 22/05/2020: <https://bityli.com/6tpK9>.
125. Liu, Y. *et al.* Delamanid: from discovery to its use for pulmonary multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). *Tuberculosis* **111**, 20–30 (2018).
126. Hosangadi, B. D. & Dave, R. H. An efficient general method for esterification of aromatic carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.* **37**, 6375–6378 (1996).
127. Hu, J. & Zhang, B. Mesomorphic properties of chiral three-arm liquid crystals containing. *J. Mol. Struct.* **1107**, 202–213 (2016).
128. Sano, T., Ohashi, K. & Oriyama, T. Remarkably fast acylation of alcohols with benzoyl chloride promoted by TMEDA. *Synthesis* **7**, 1141–1144 (1999).
129. Verma, S. K., Ghorpade, R., Pratap, A. & Kaushik, M. P. Solvent free, N',N' - carbonyldiimidazole (CDI) mediated amidation. *Tetrahedron Lett.* **53**, 2373–2376 (2012).
130. Garrett, E. R. Prediction of stability of drugs and pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Sci.* **51**, 811–833 (1962).
131. Solomons G., F. C. *Química Orgânica 2* (Seventh Edition), LTC (2002).

6. Anexos

Anexo 1. Síntese

Anexo 1.1 - Mecanismo da Formação de um Cloreto de Acilo utilizando o Reagente Cloreto de Tionilo

Neste método, o primeiro passo é fulcral e passa pela síntese do cloreto de acilo utilizando cloreto de tionilo (SOCl_2) através de reações de adição-eliminação^{119,131}.

No átomo de enxofre de cloreto de tionilo ocorre a adição do ácido carboxílico e consequente eliminação do ião cloreto (Cl^-), o que origina um clorossulfito de acilo (intermediário instável). Por sua vez, o ião cloreto (nucleófilo) ataca o átomo de carbono do grupo carbonilo do clorossulfito de acilo e formam-se os produtos cloreto de acilo, dióxido de enxofre (SO_2) e ácido clorídrico (HCl).

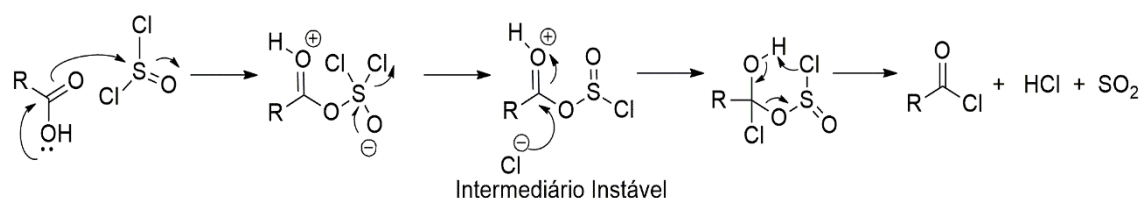


Figura 6.1. Mecanismo da formação do cloreto de acilo¹³¹.

Anexo 1.2 - Mecanismo de Formação do Alcóxido (álcool desprotonado por NaH)

Neste método, fez-se a ativação do álcool previamente com a base forte, hidreto de sódio (NaH) para se formar um ião alcóxido (A). De seguida, o ião alcóxido (nucleófilo) é adicionado ao meio reacional pelo que se liga ao átomo de carbono do grupo carbonilo do cloreto de acilo e, consequentemente, ocorre a eliminação do ião cloreto. A presença da base piridina no meio reacional serve para reagir com o ião cloreto eliminado (B)¹¹⁹.

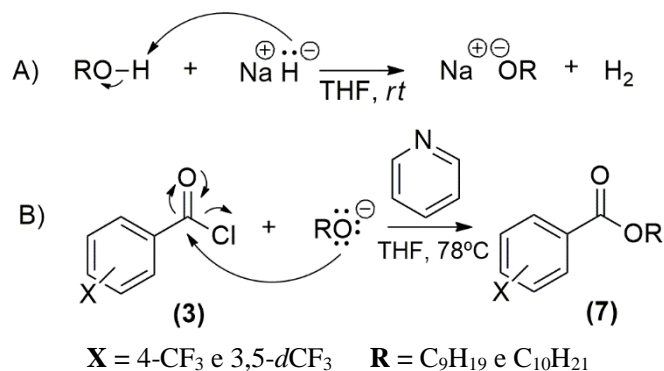


Figura 6.2. Esquema reacional do método A2. i) Ativação do álcool (formação do ião alcóxido) e ii) Formação do éster com a adição do ião alcóxido na presença de base piridina.

Anexo 1.3. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear

1. 4-nitrobenzoato de propilo (1a)

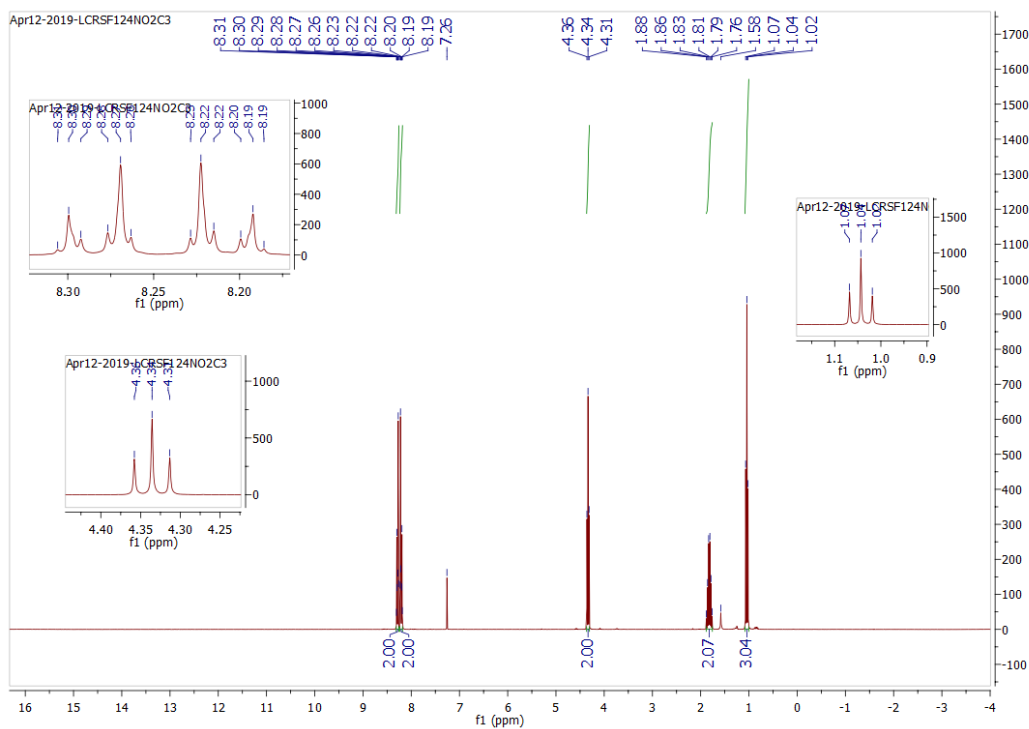
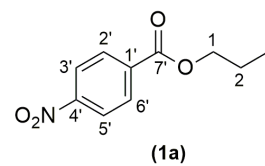


Figura 6.3. Espectro de ^1H RMN do composto 1a.

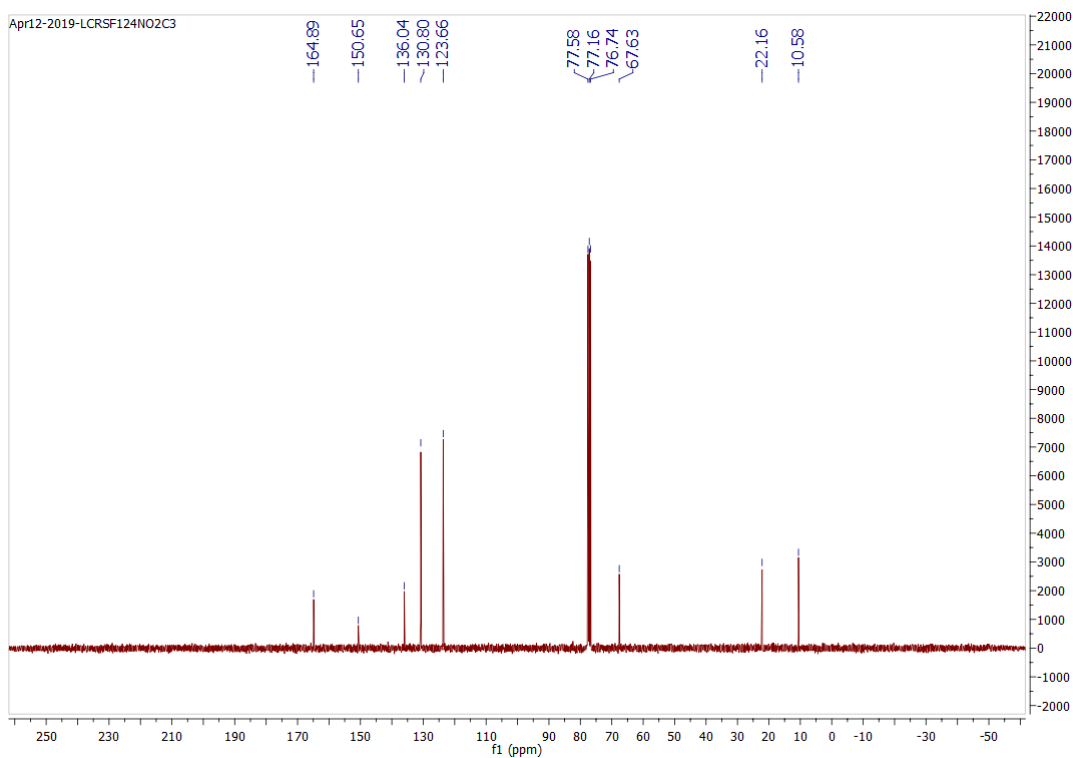


Figura 6.4. Espectro de ^{13}C RMN do composto 1a.

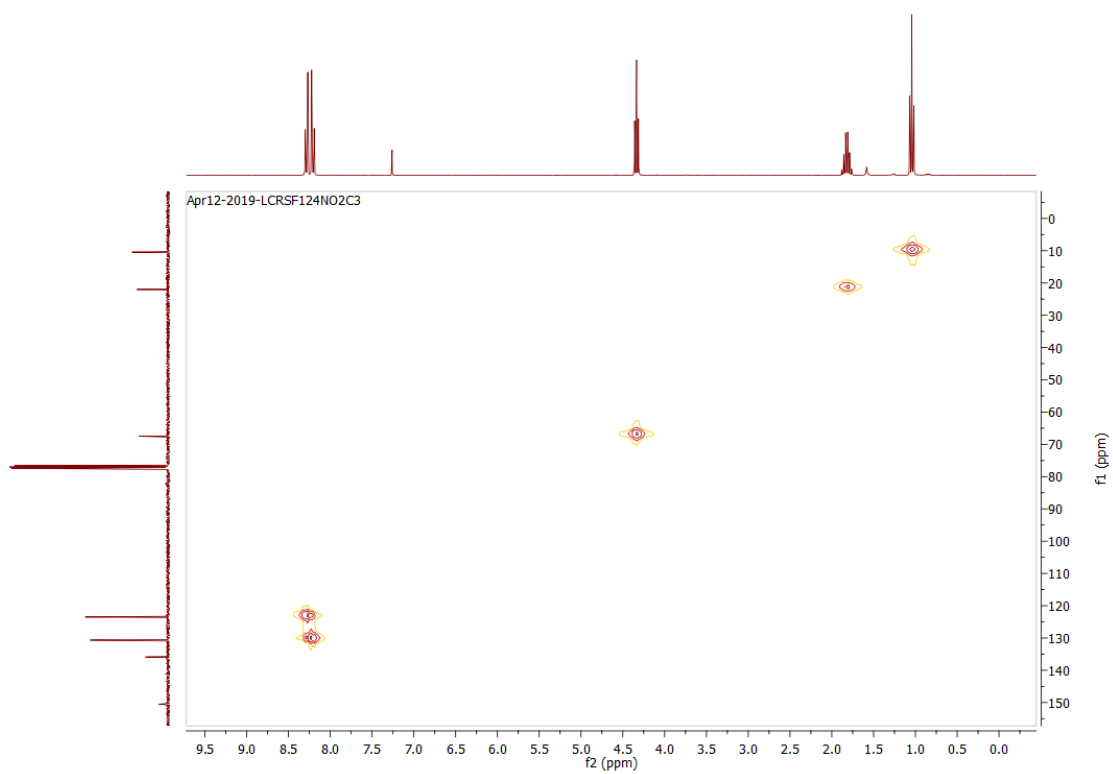


Figura 6.5. Espectro de HSQC do composto **1a**.

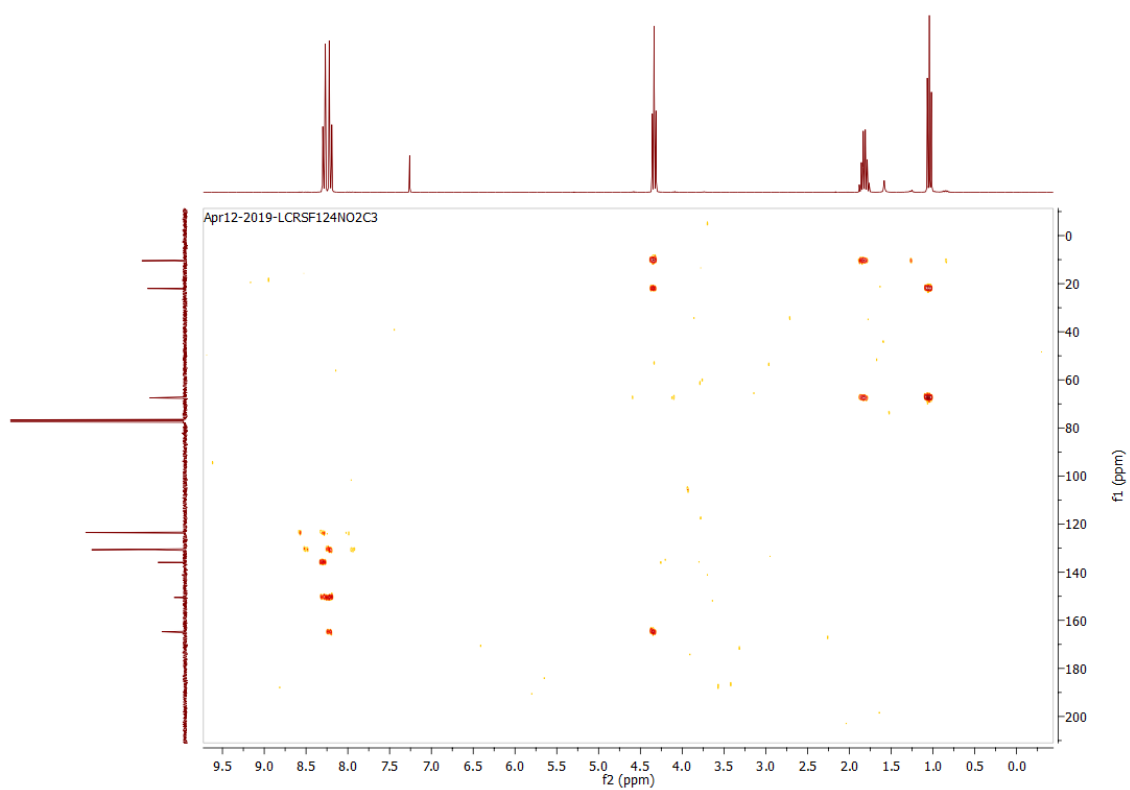


Figura 6.6. Espectro de HMBC do composto **1a**.

2. 4-nitrobenzoato de butilo (**1b**)

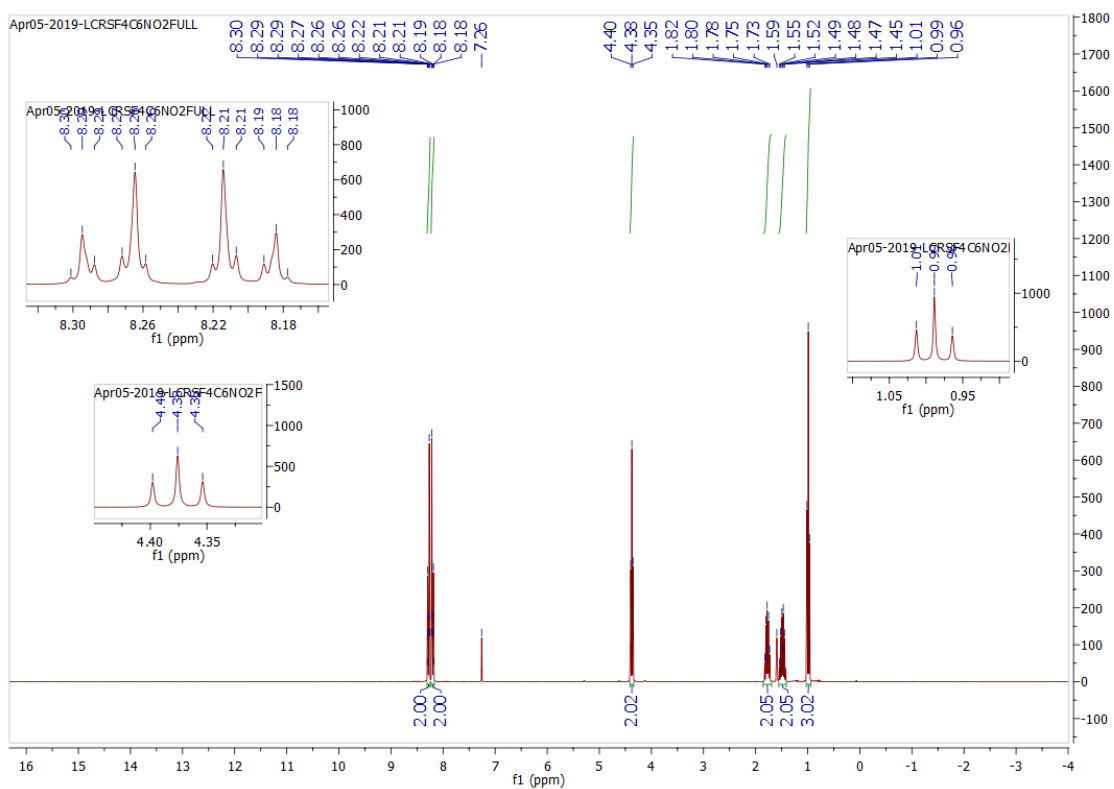
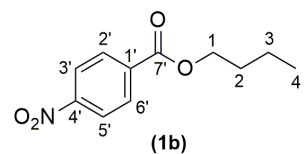


Figura 6.7. Espectro de ^1H RMN do composto **1b**.

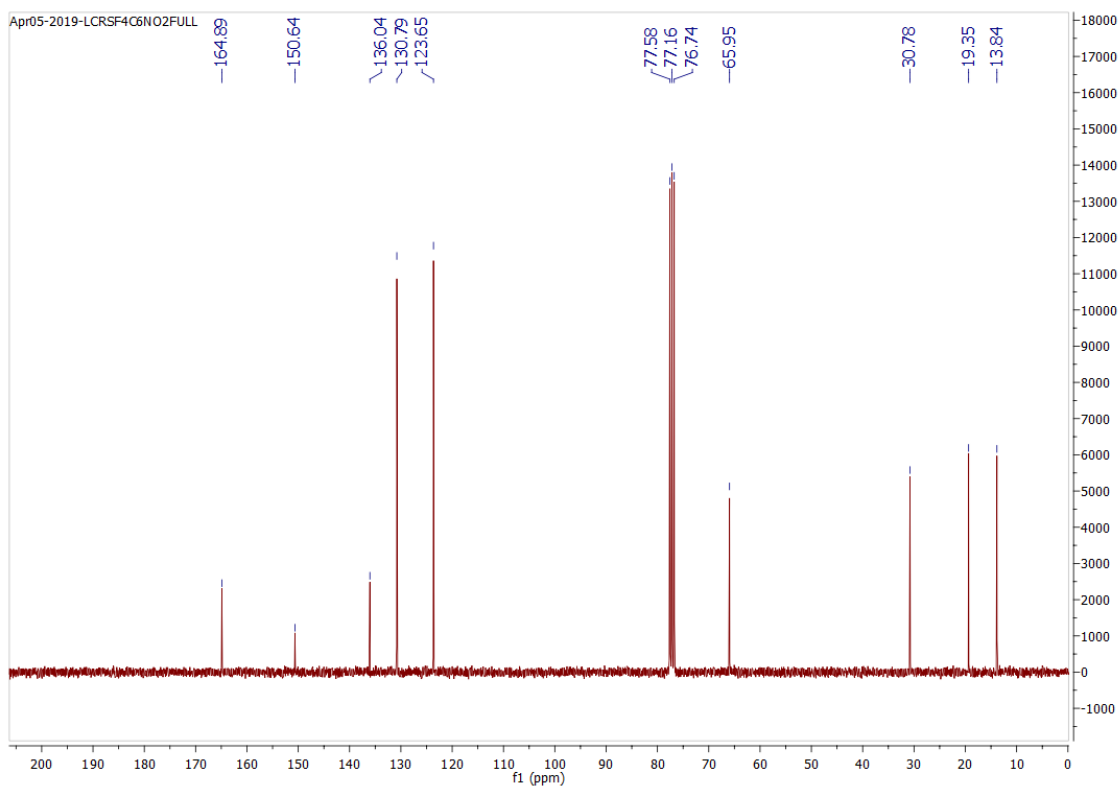


Figura 6.8. Espectro de ^{13}C RMN do composto **1b**.

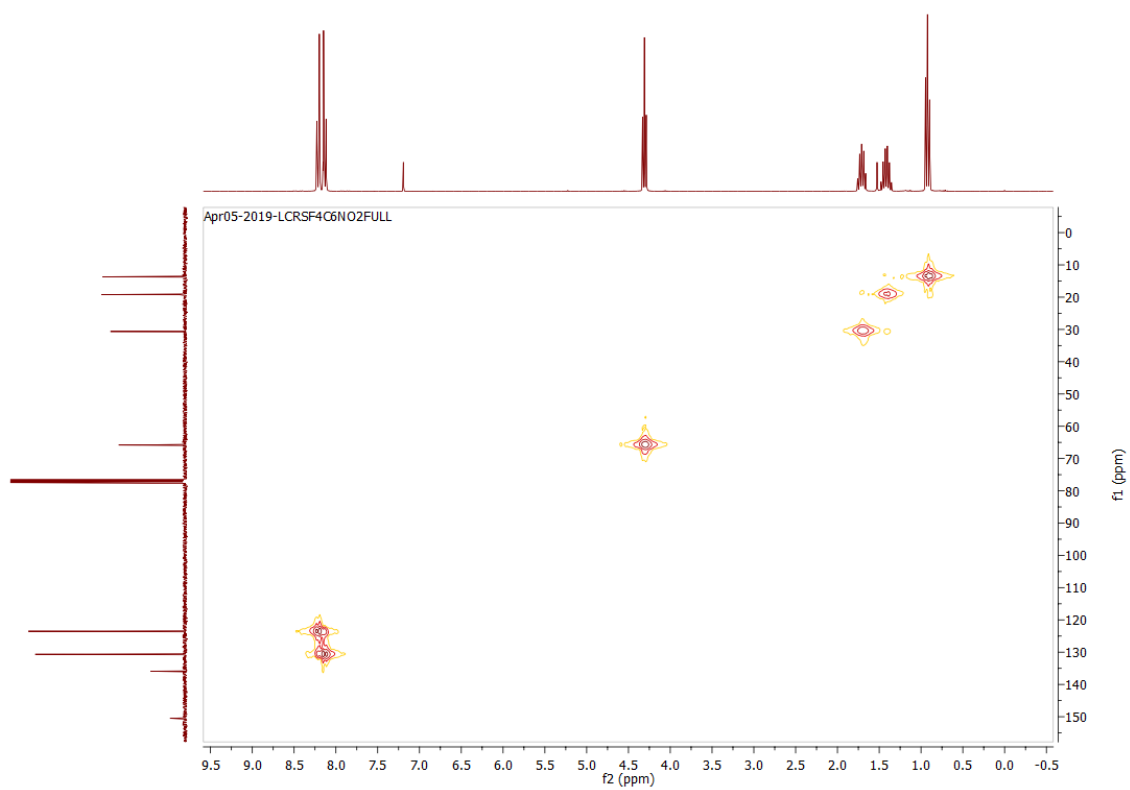


Figura 6.9. Espectro de HSQC do composto **1b**.

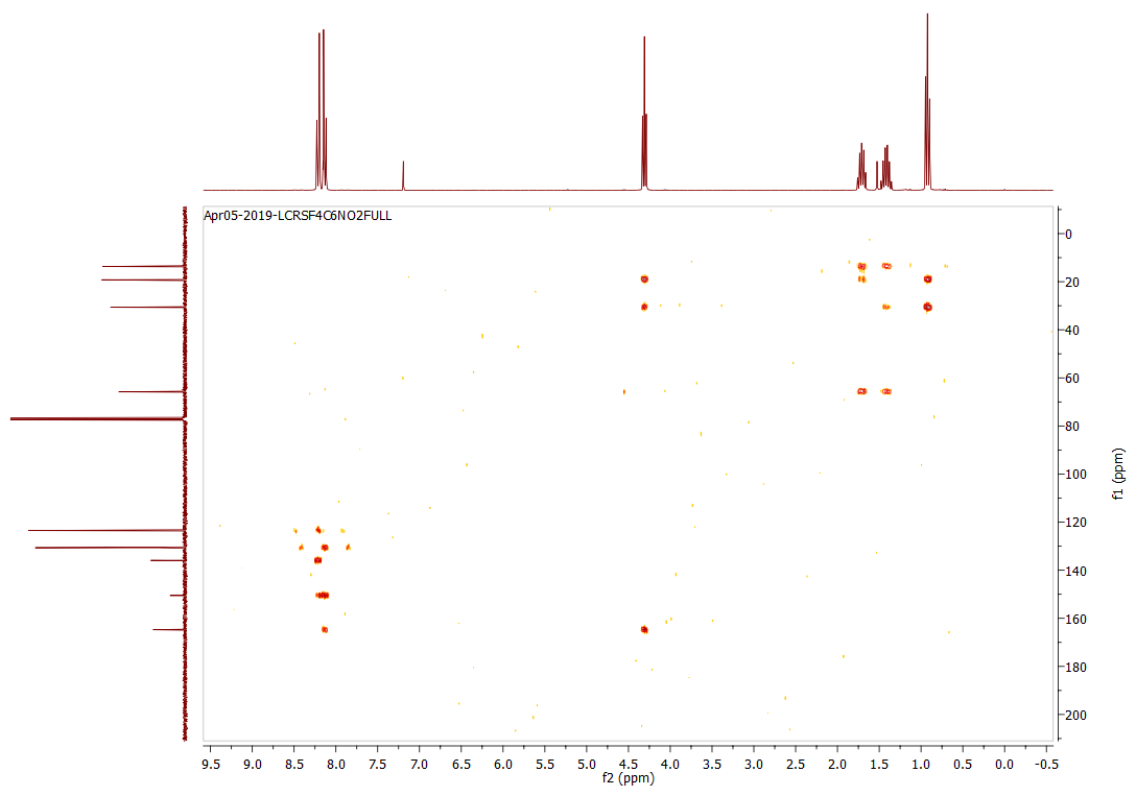


Figura 6.10. Espectro de HMBC do composto **1b**.

3. 4-nitrobenzoato de pentilo (**1c**)

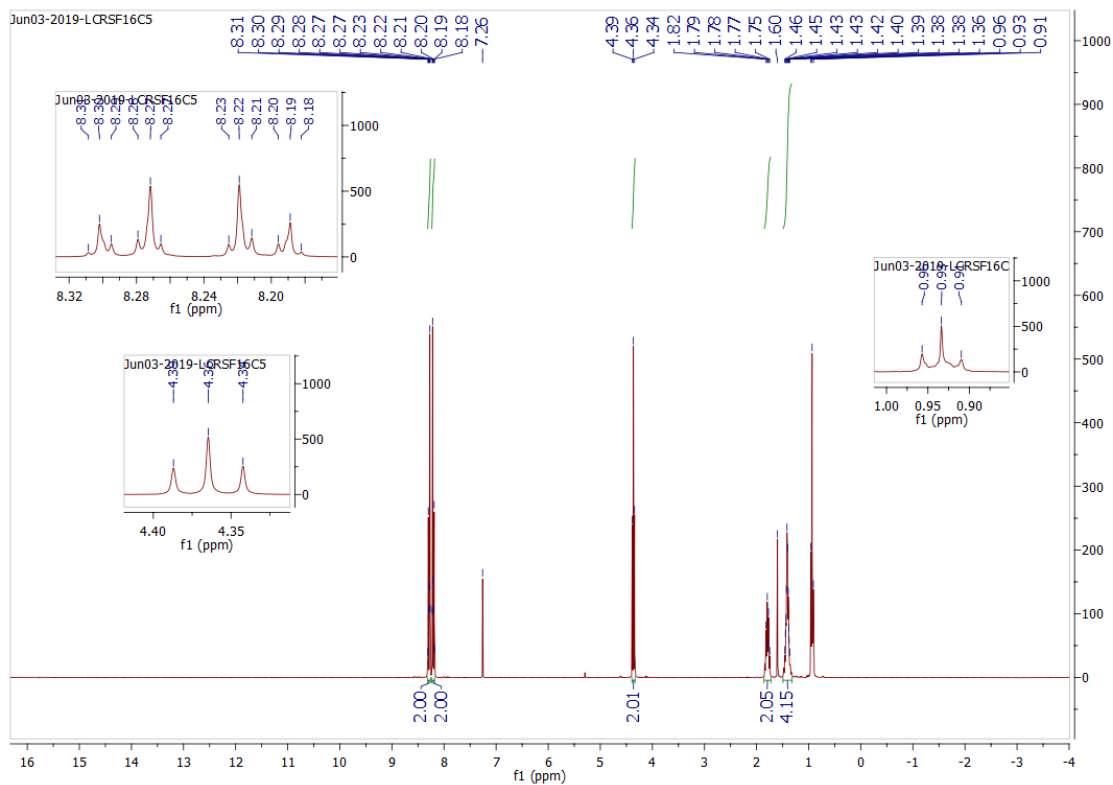
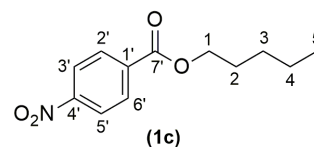


Figura 6.11. Espetro de ^1H RMN do composto **1c**.

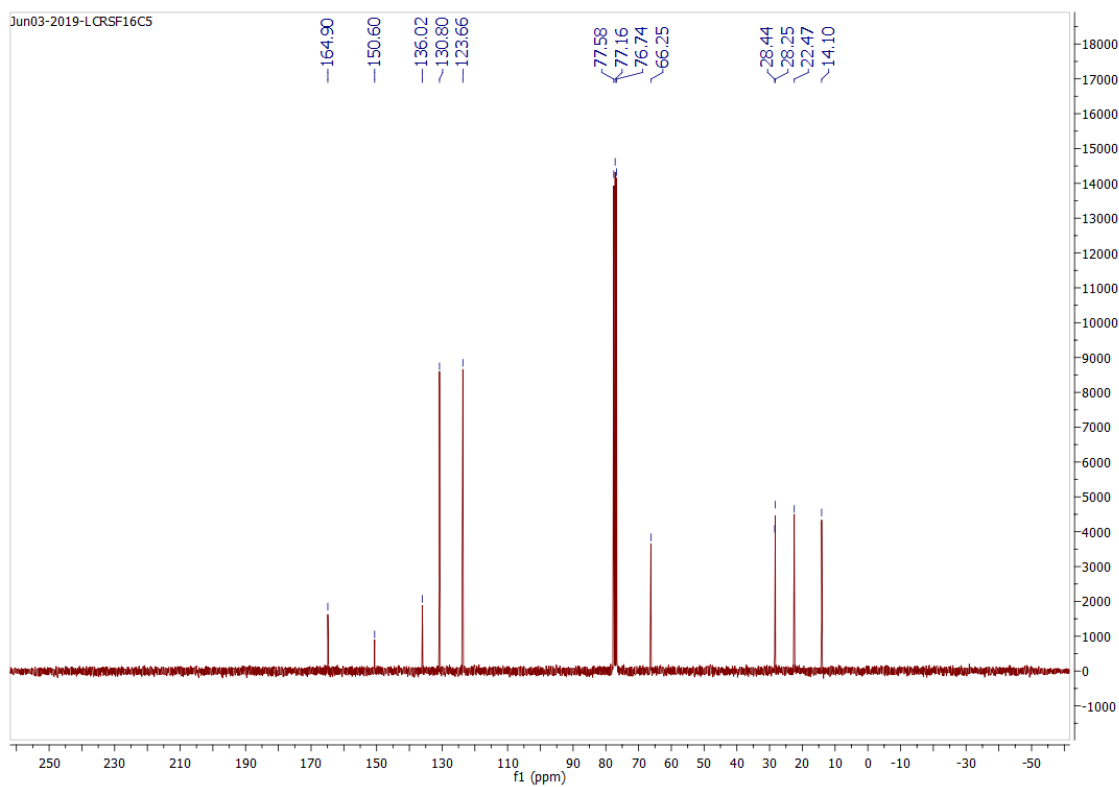


Figura 6.12. Espetro de ^{13}C RMN do composto **1c**.

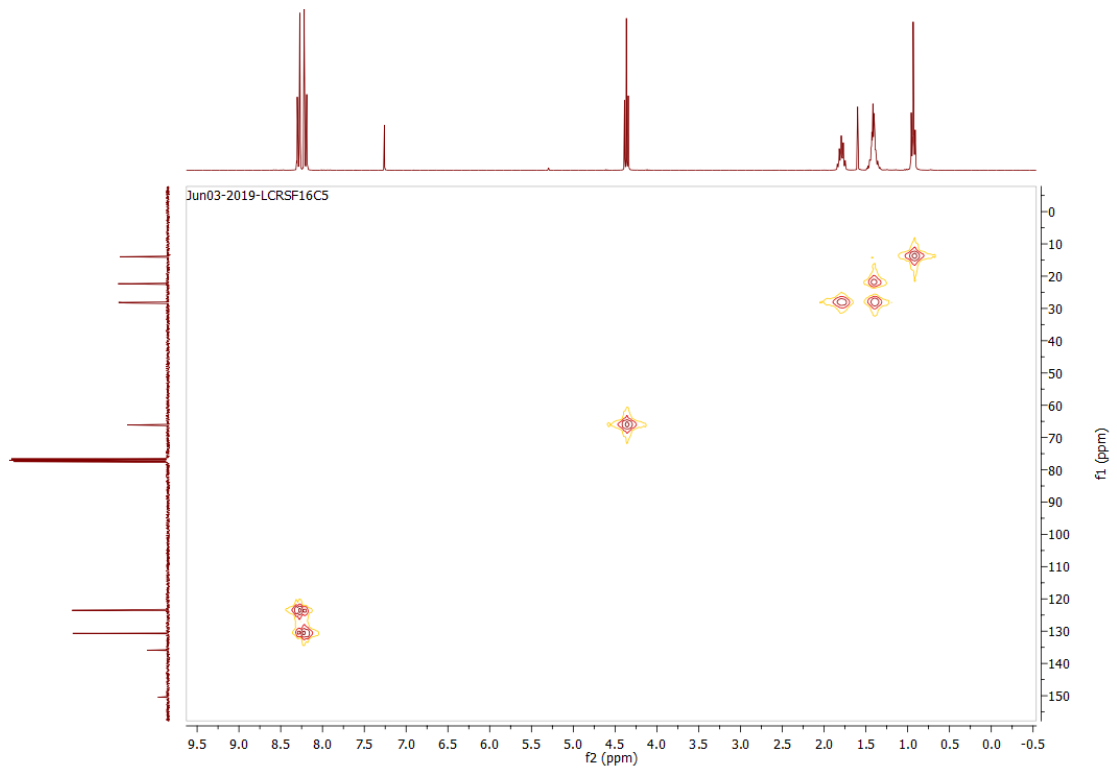


Figura 6.13. Espectro de HSQC do composto 1c.

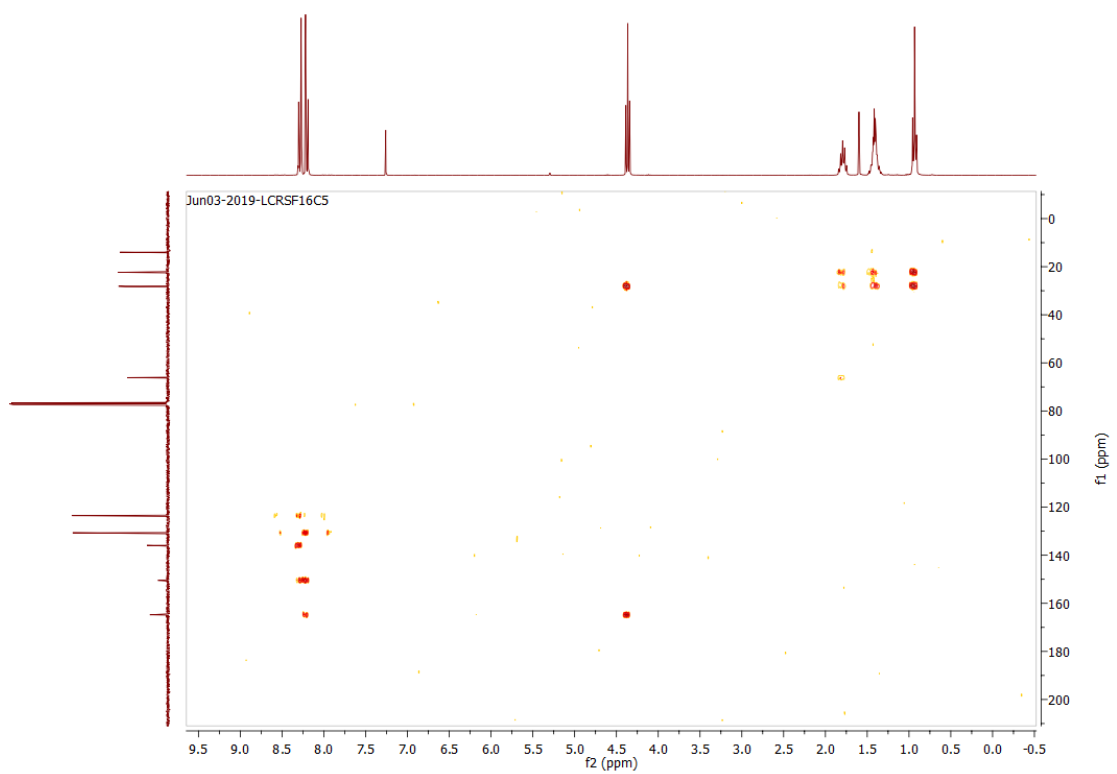


Figura 6.14. Espectro de HMBC do composto 1c.

4. 4-nitrobenzoato de hexilo (**1d**)

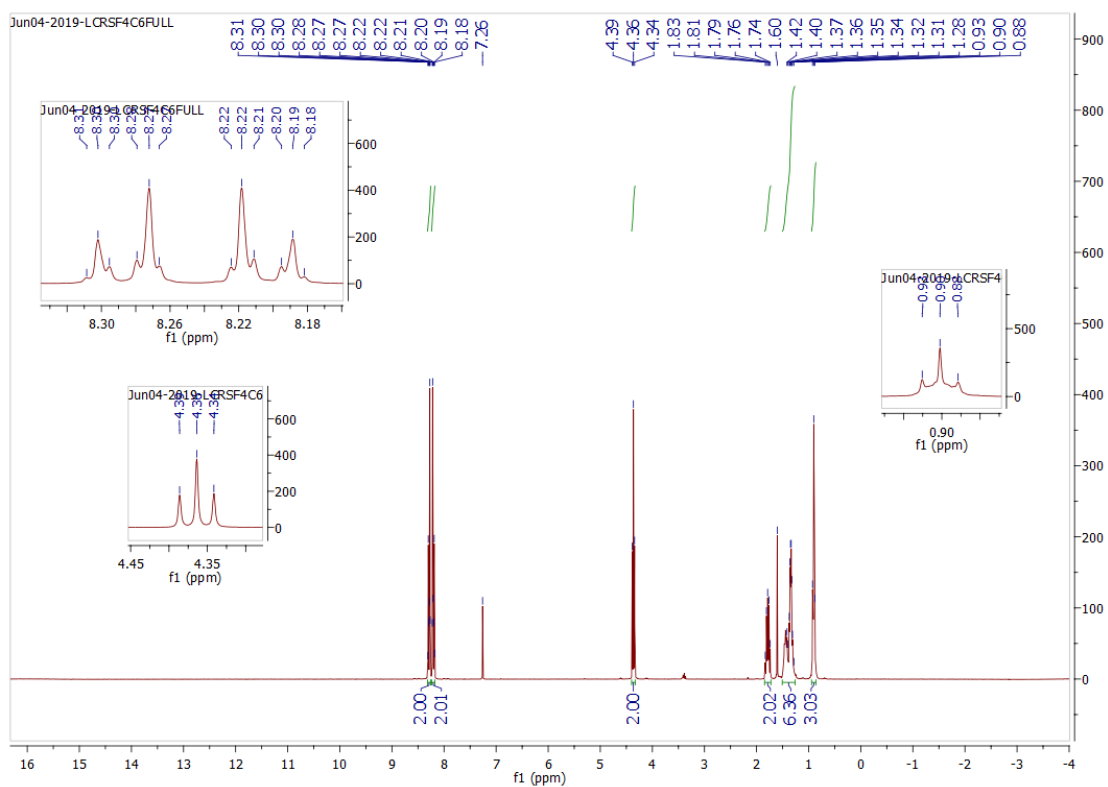
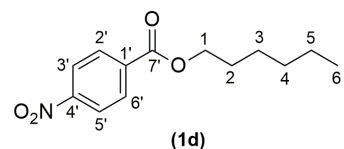


Figura 6.15. Espetro de ^1H RMN do composto **1d**.

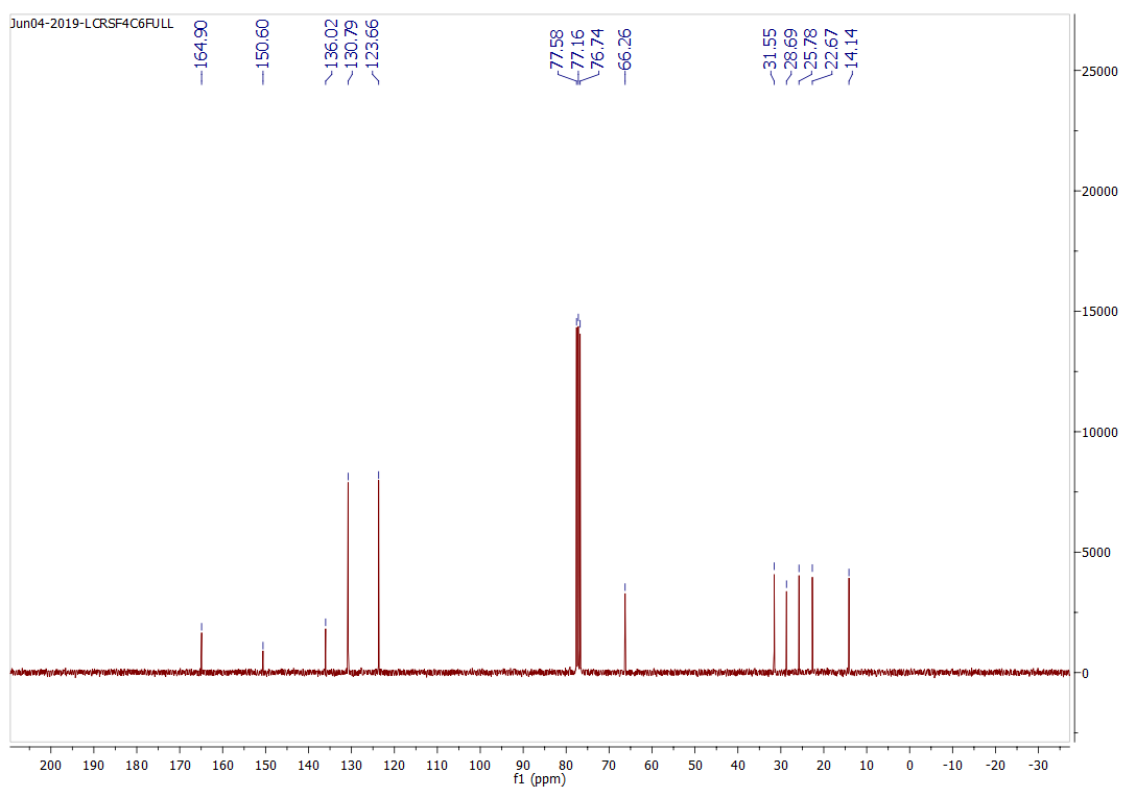


Figura 6.16. Espetro de ^{13}C RMN do composto **1d**.

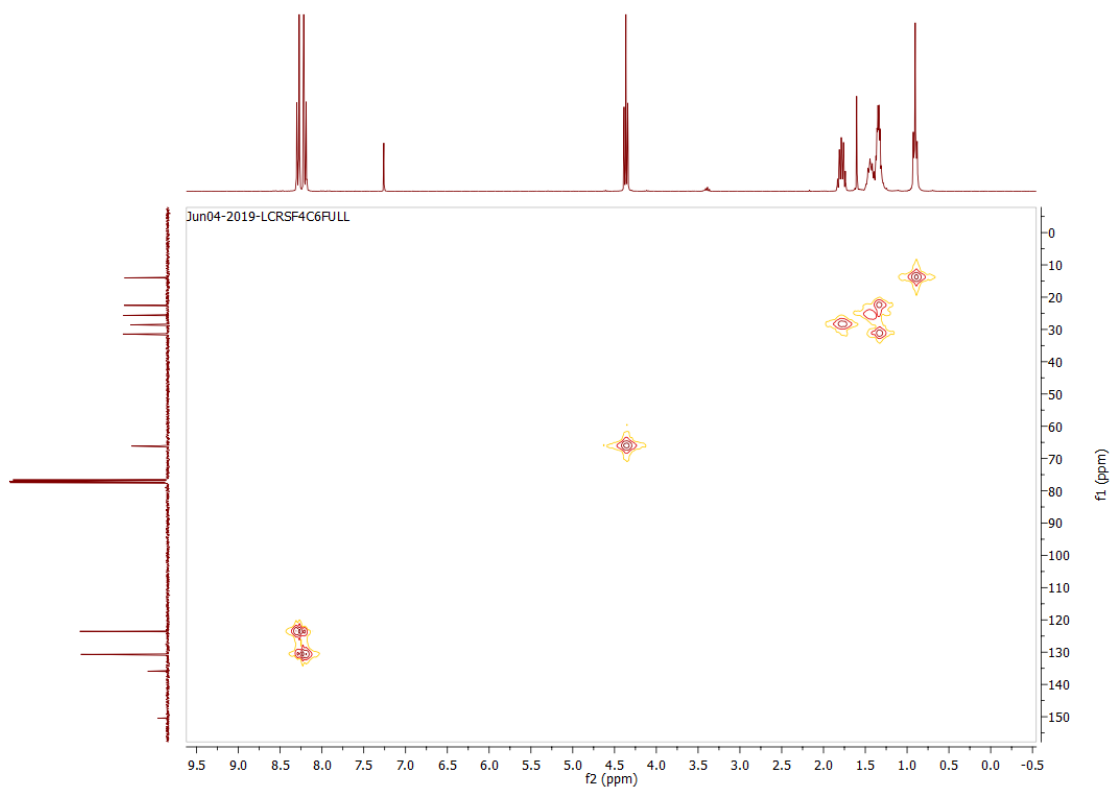


Figura 6.17. Espectro de HSQC do composto **1d**.

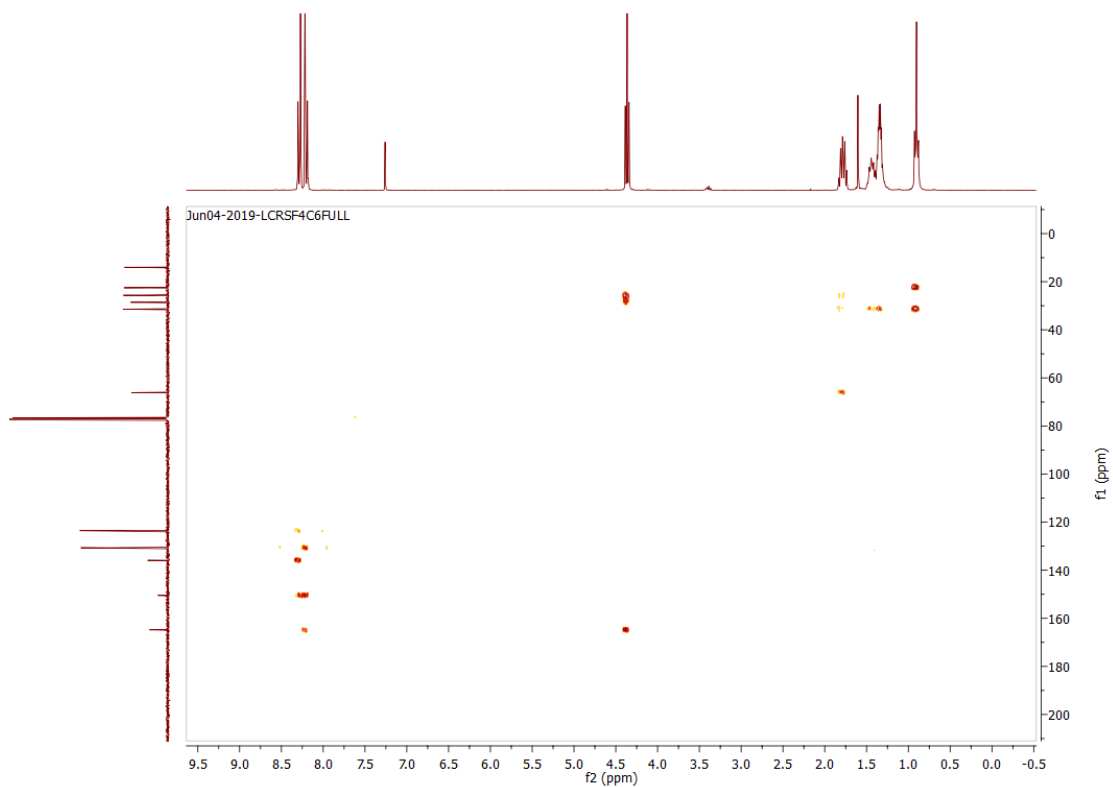


Figura 6.18. Espectro de HMBC do composto **1d**.

5. 4-nitrobenzoato de heptilo (**1e**)

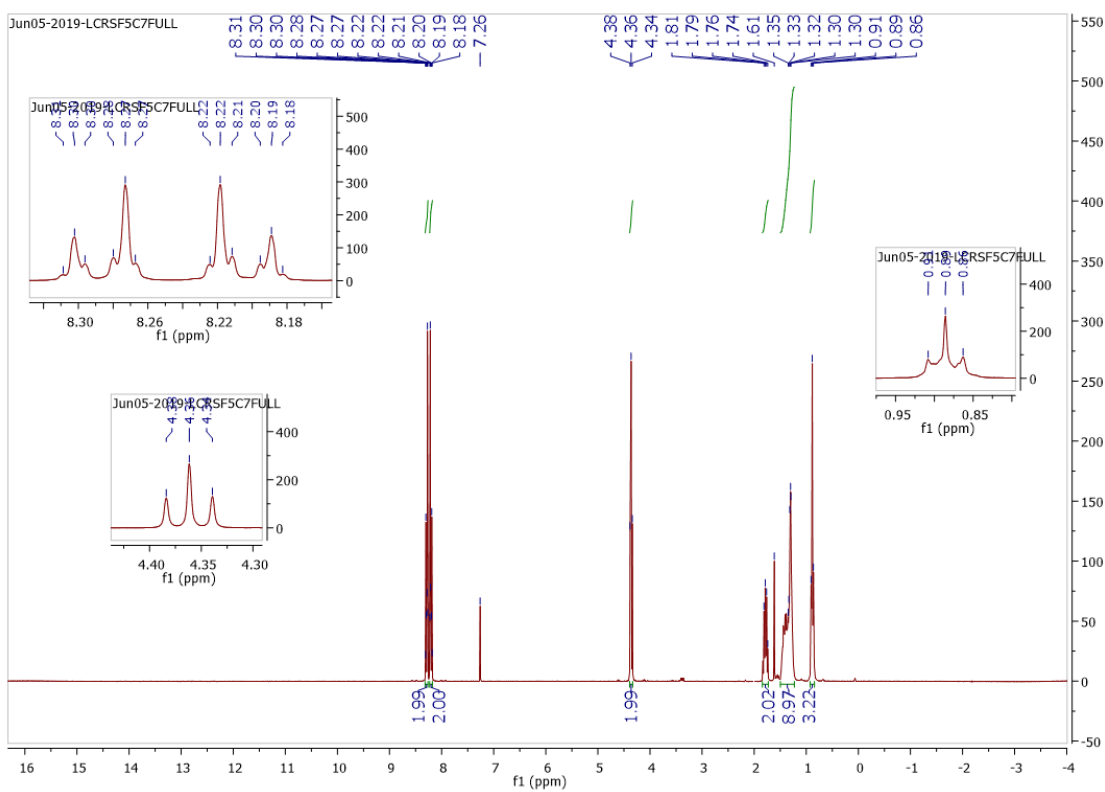
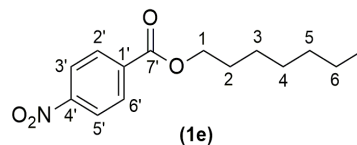


Figura 6.19. Espectro de ^1H RMN do composto **1e**.

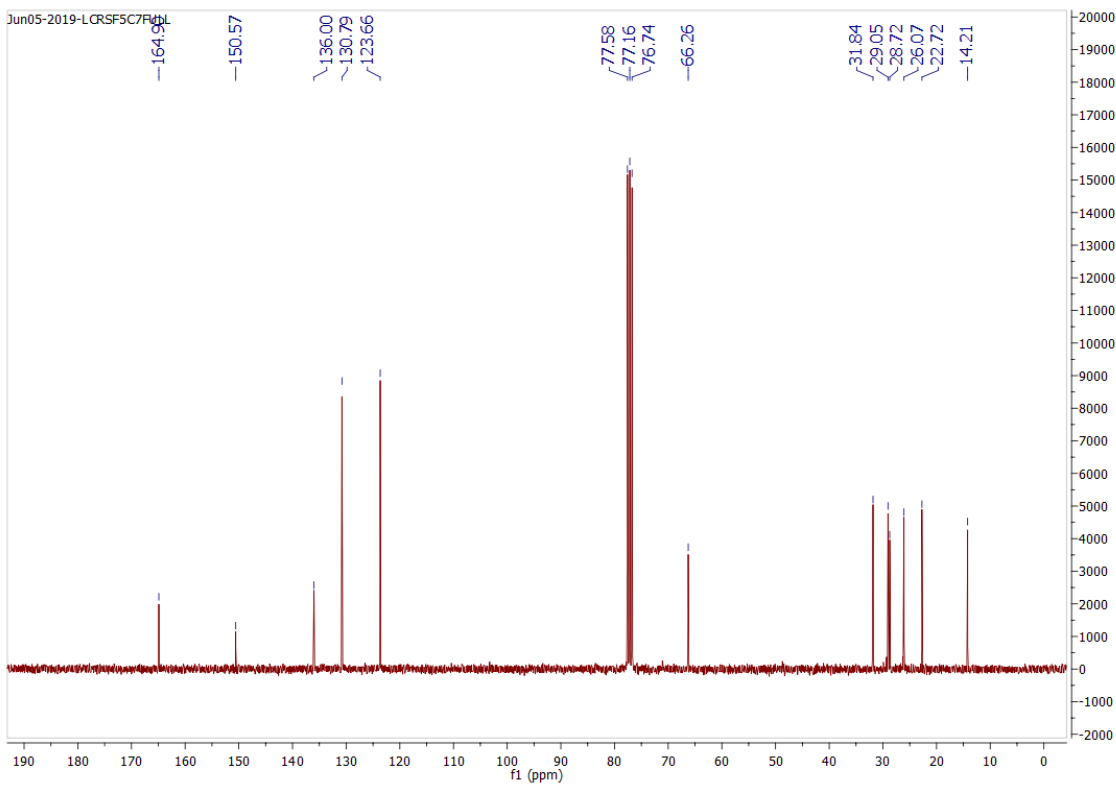


Figura 6.20. Espectro de ^{13}C RMN do composto **1e**.

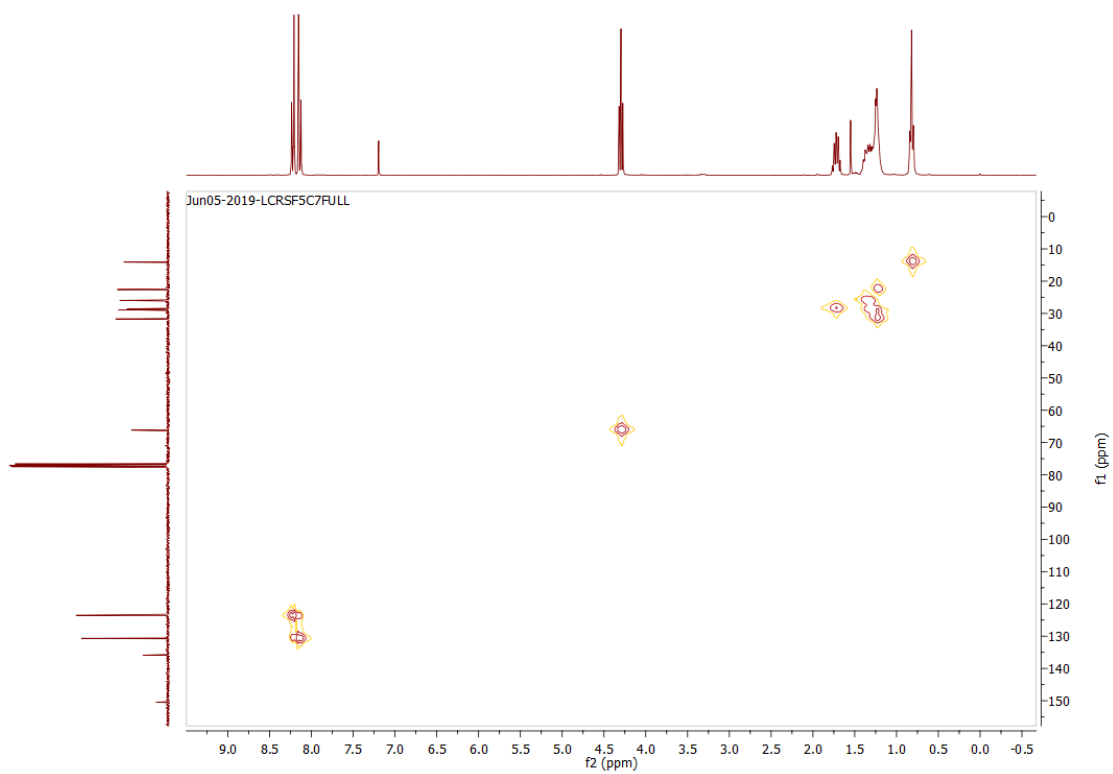


Figura 6.21. Espectro de HSQC do composto **1e**.

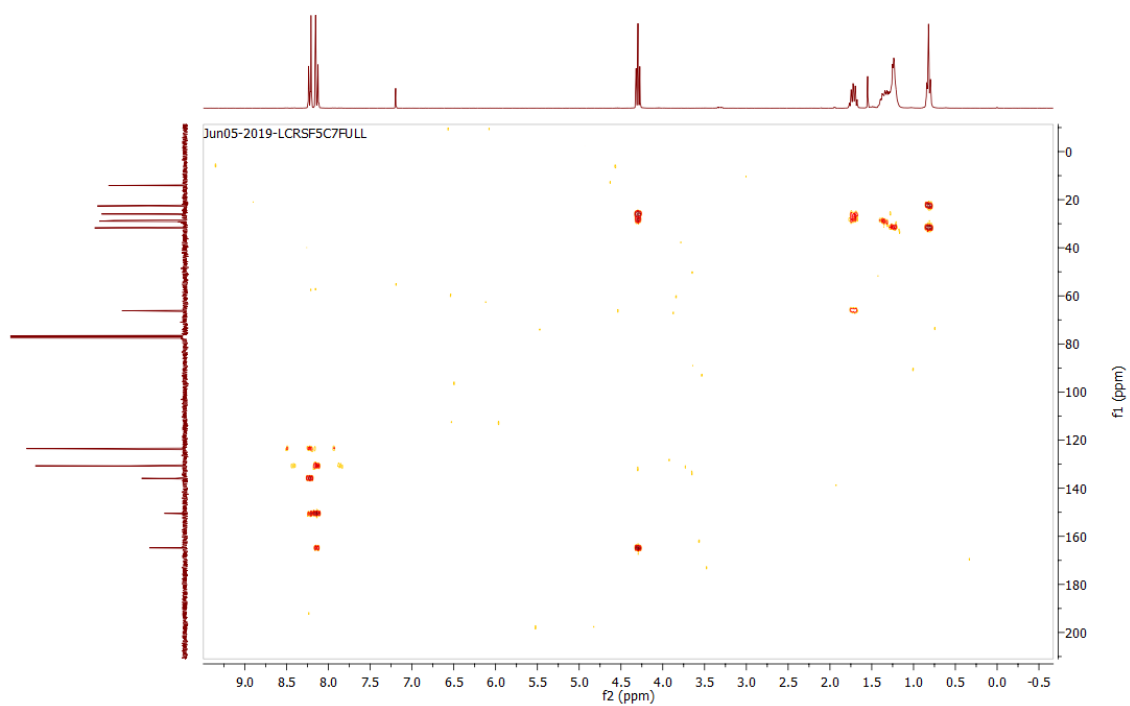


Figura 6.22. Espectro de HMBC do composto **1e**.

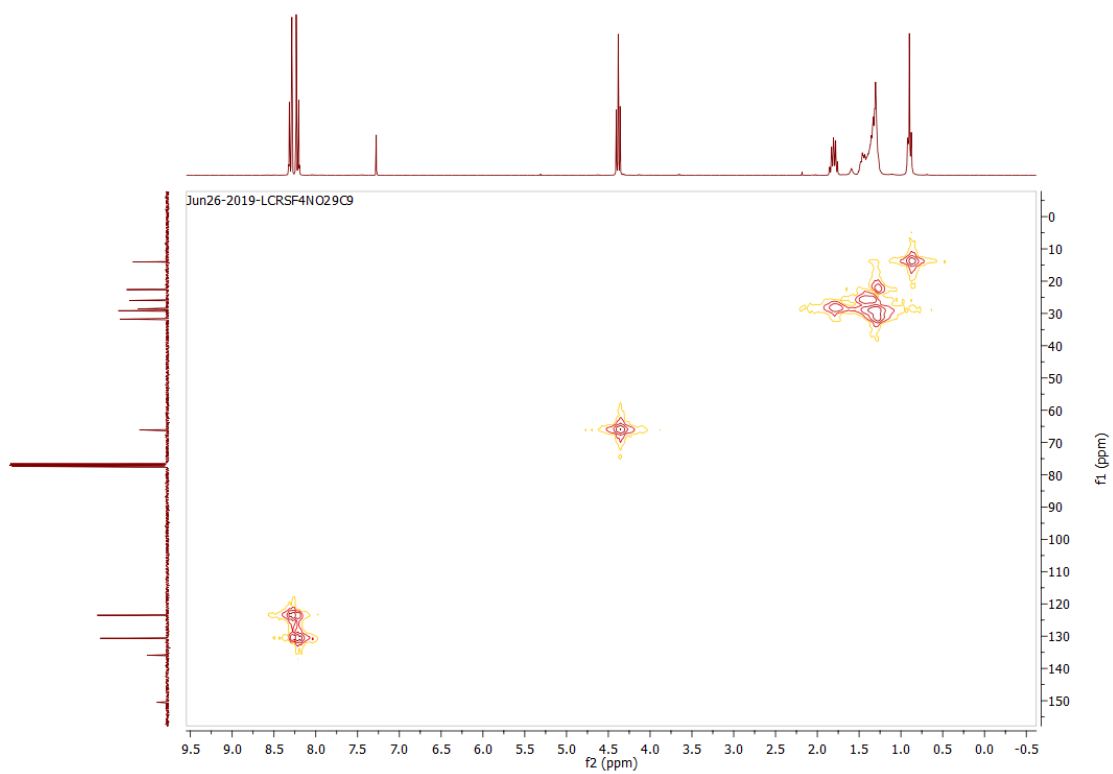


Figura 6.25. Espetro de HSQC do composto **1f**.

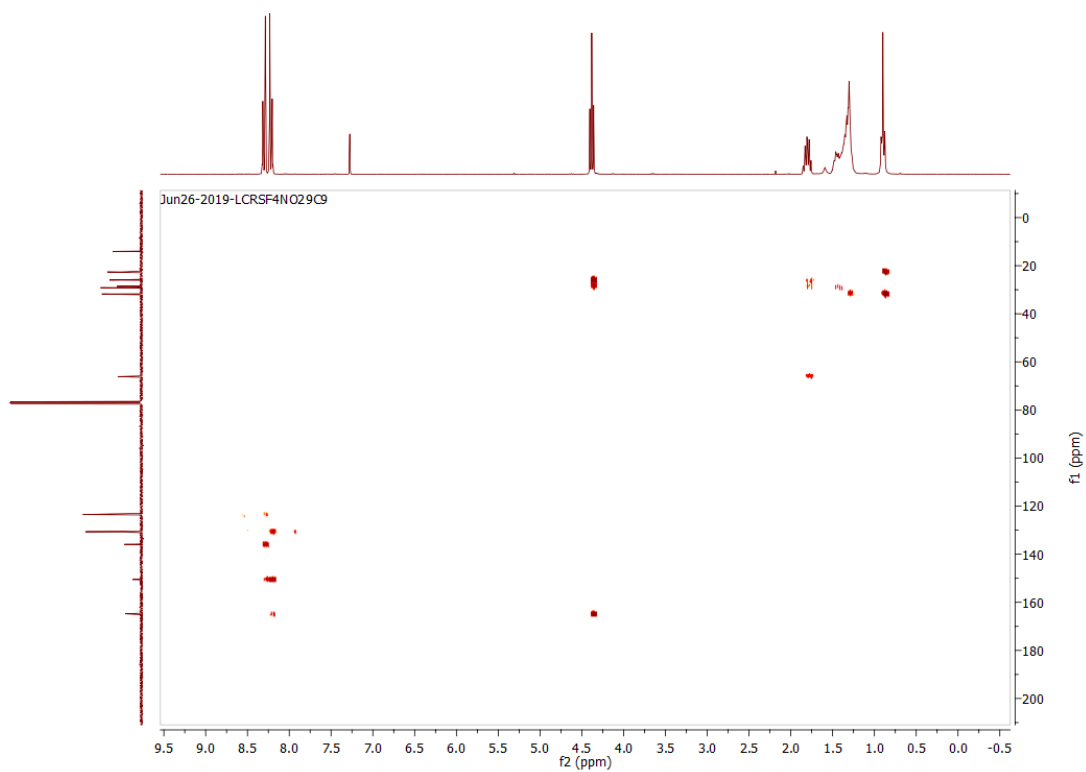


Figura 6.26. Espetro de HMBC do composto **1f**.

7. 4-nitrobenzoato de nonilo (**1g**)

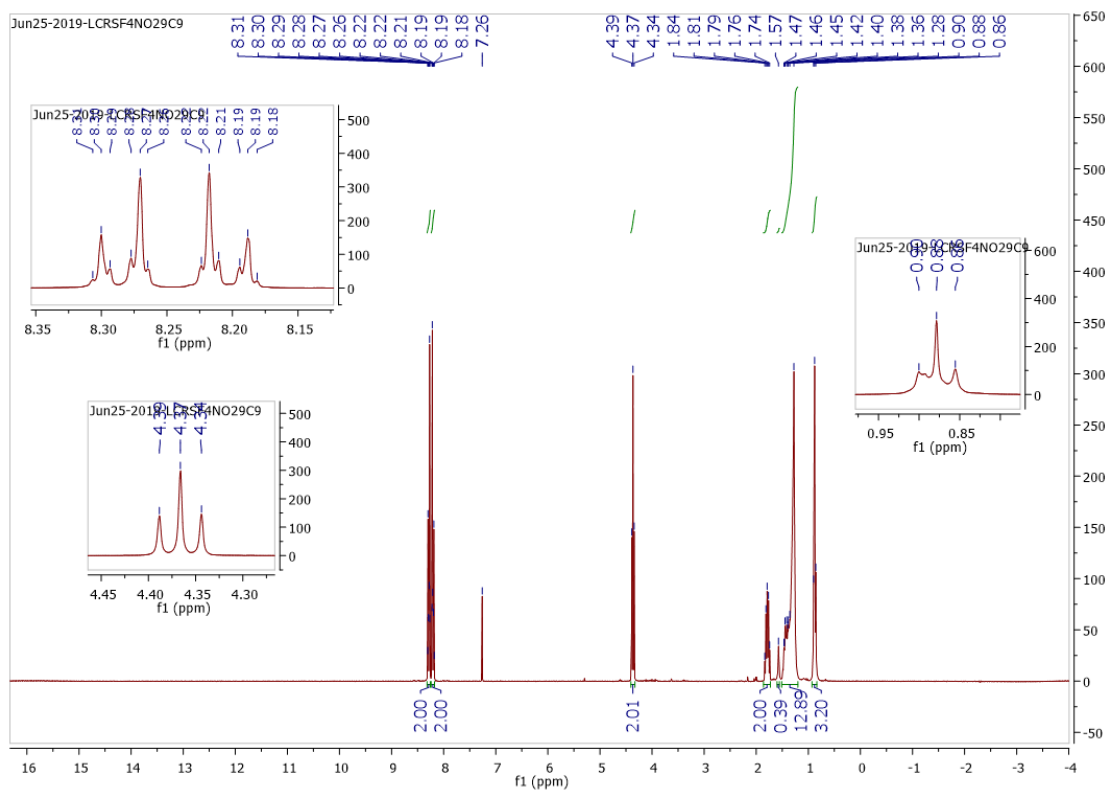
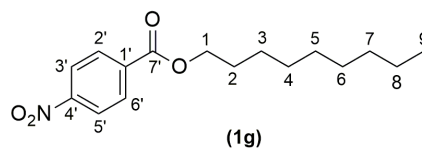


Figura 6.27. Espetro de ^1H RMN do composto **1g**.

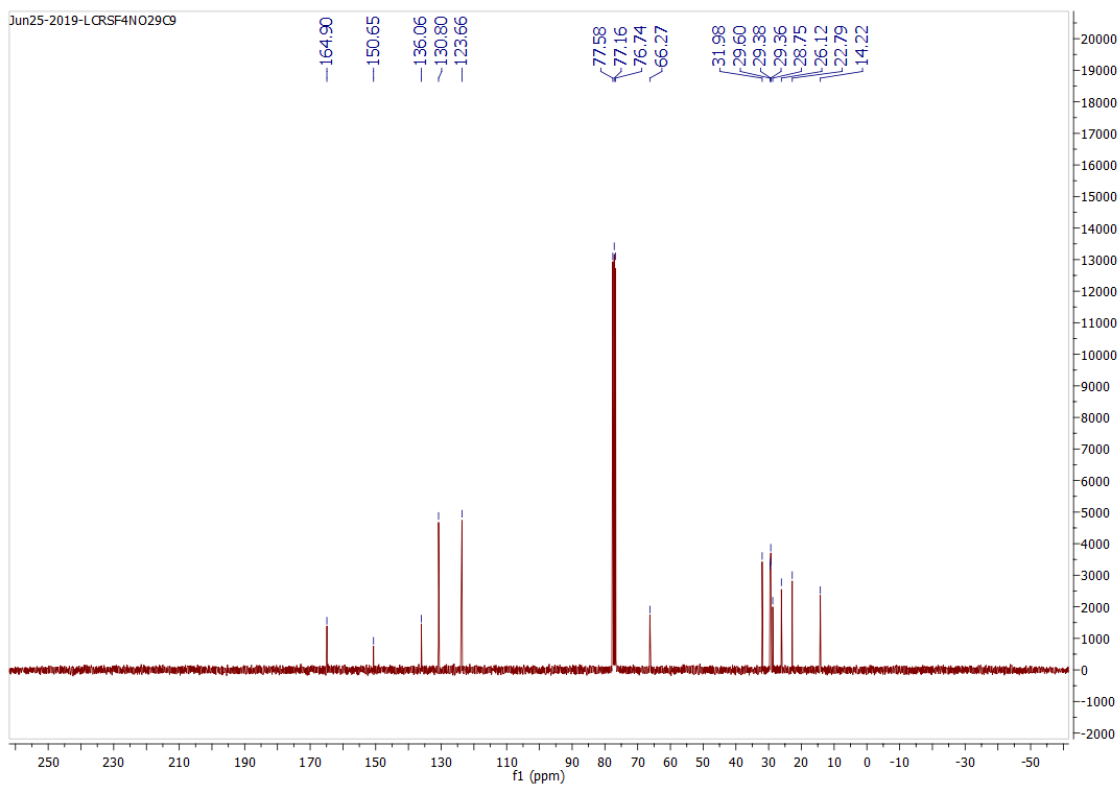


Figura 6.28. Espetro de ^{13}C RMN do composto **1g**.

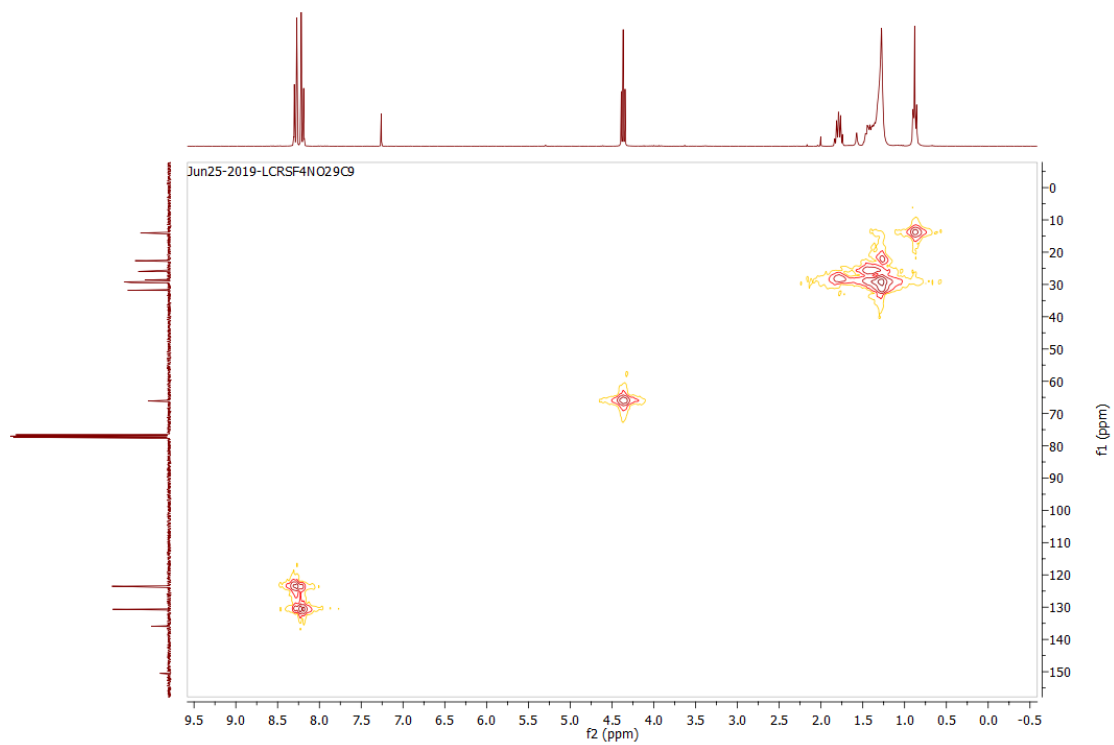


Figura 6.29. Espetro de HSQC do composto **1g**.

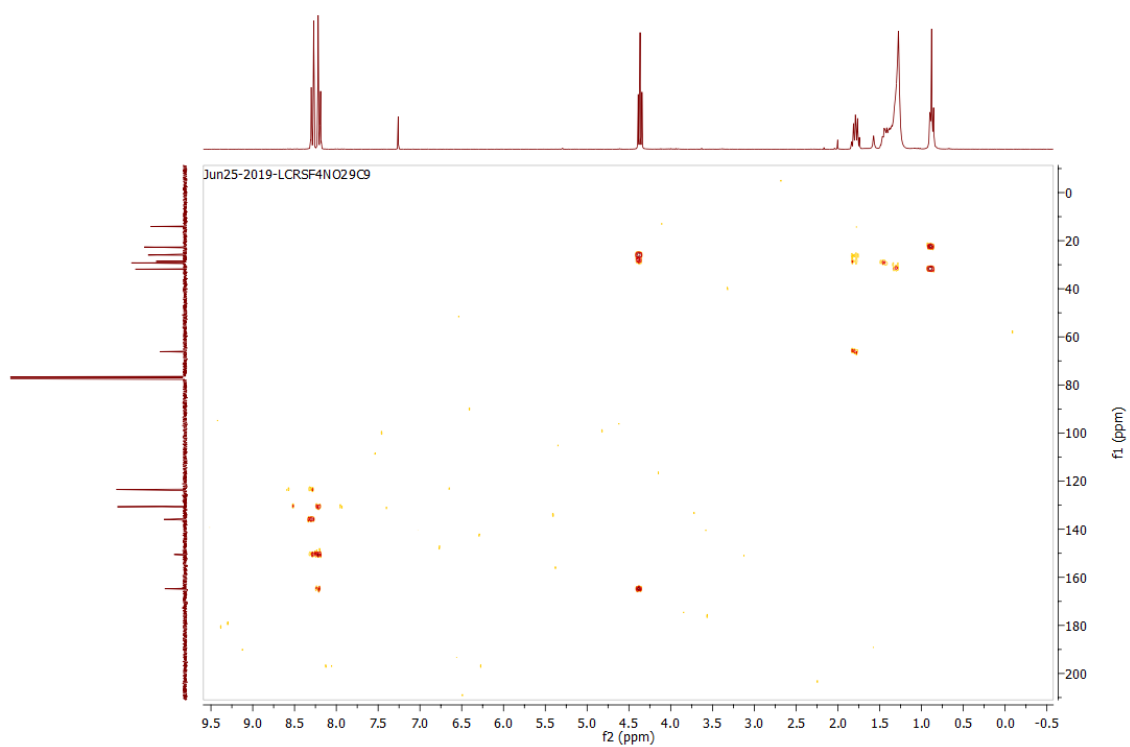


Figura 6.30. Espetro de HMBC do composto **1g**.

8. 4-nitrobenzoato de dodecilo (**1j**)

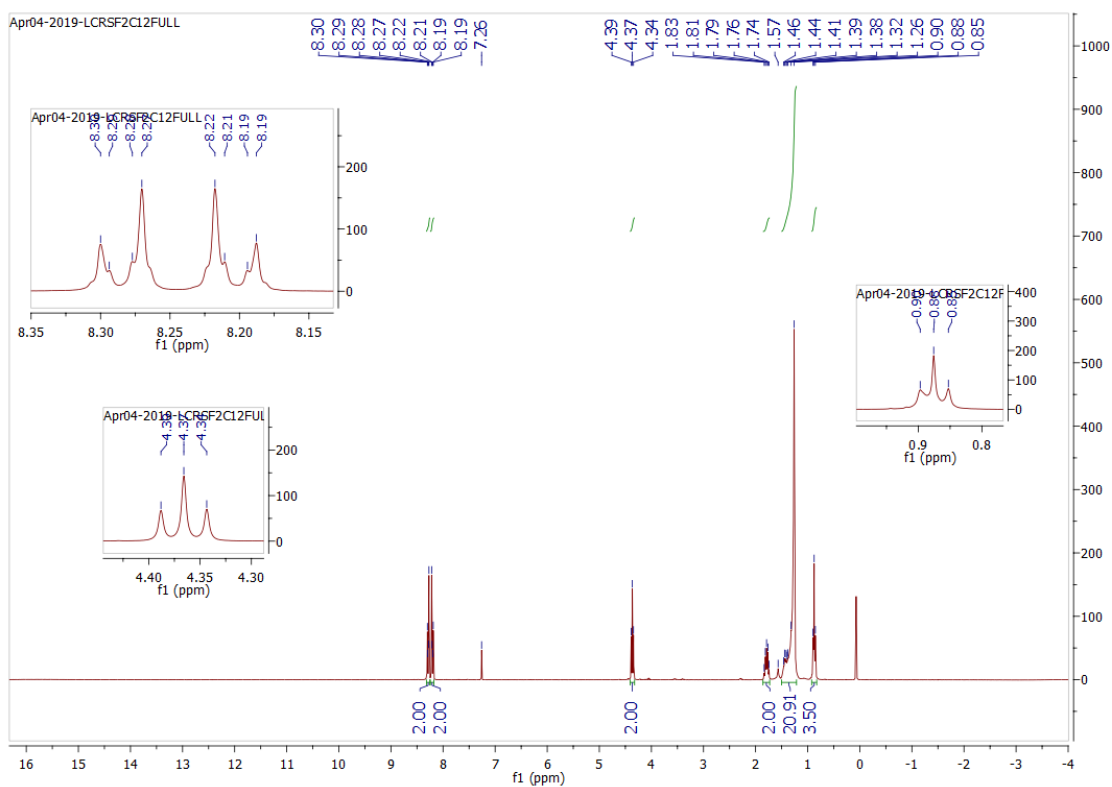
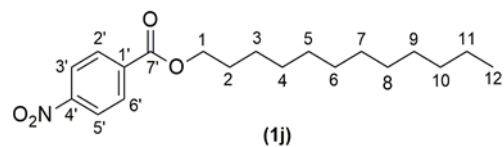


Figura 6.31. Espetro de ^1H RMN do composto **1j**.

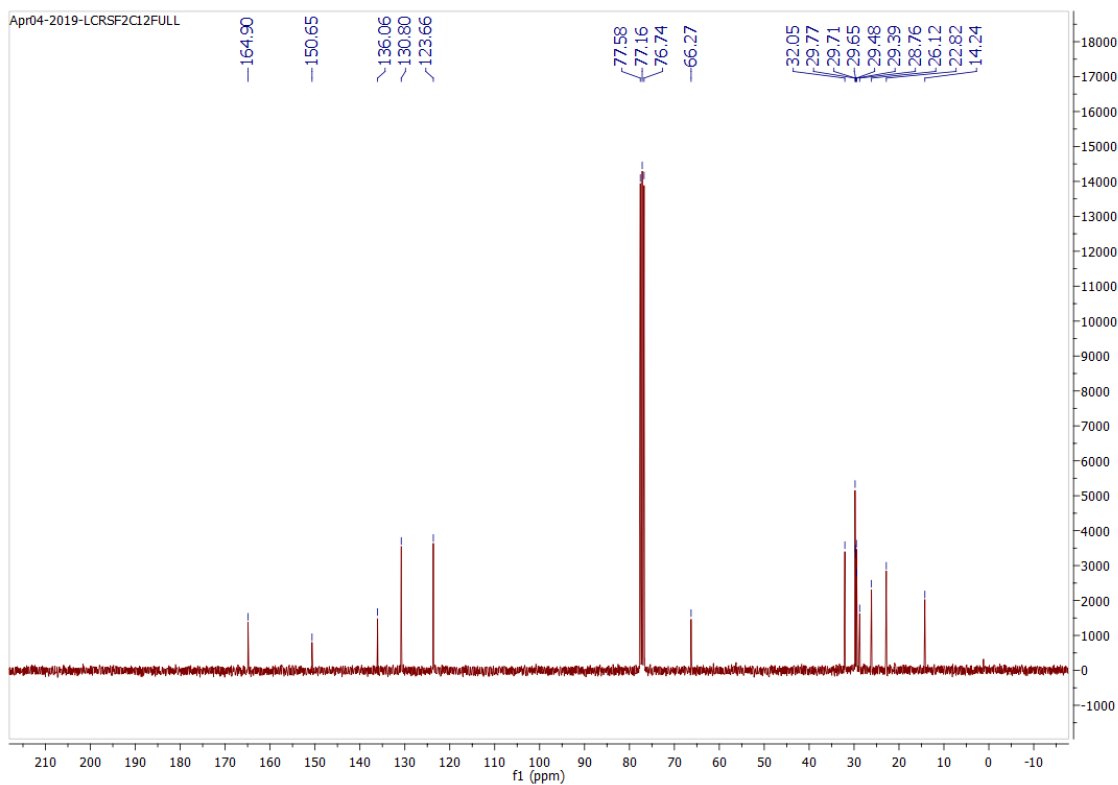


Figura 6.32. Espetro de ^{13}C RMN do composto **1j**.

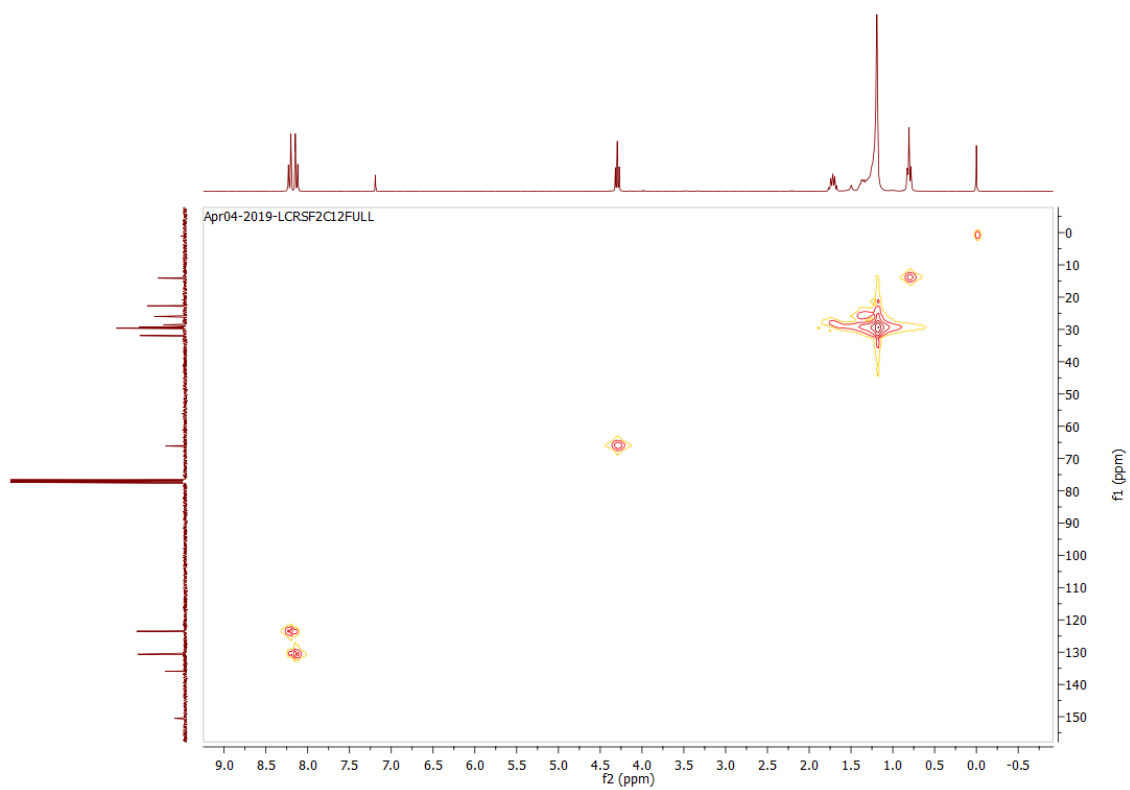


Figura 6.33. Espectro de HSQC do composto **1j**.

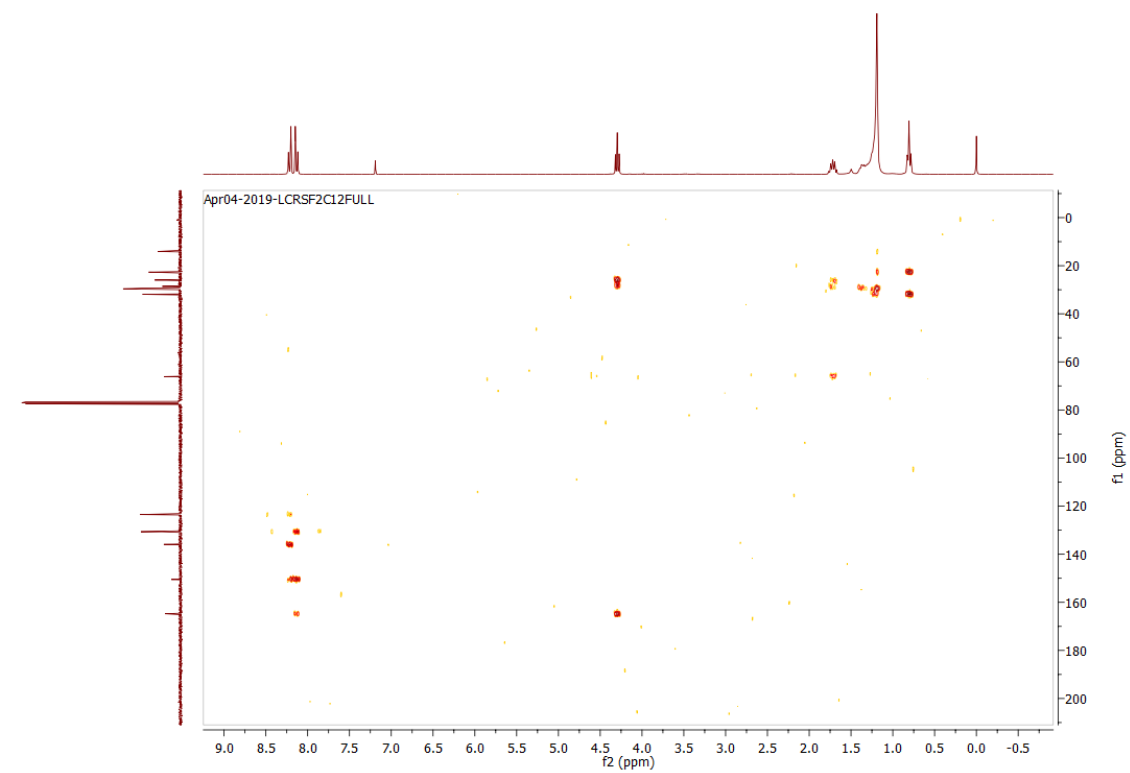


Figura 6.34. Espectro de HMBC do composto **1j**.

9. 4-nitrobenzoato de tridecilo (**1k**)

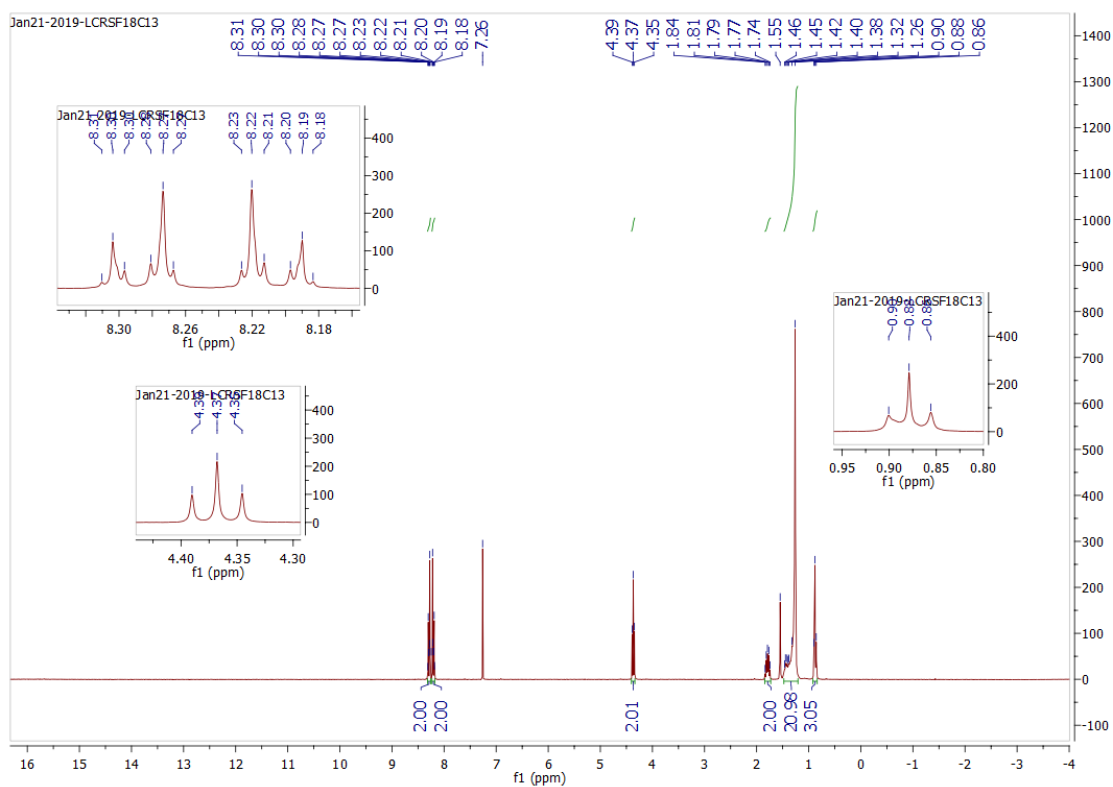
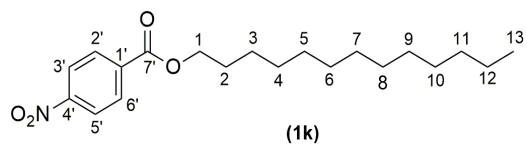


Figura 6.35. Espectro de ^1H RMN do composto **1k**.

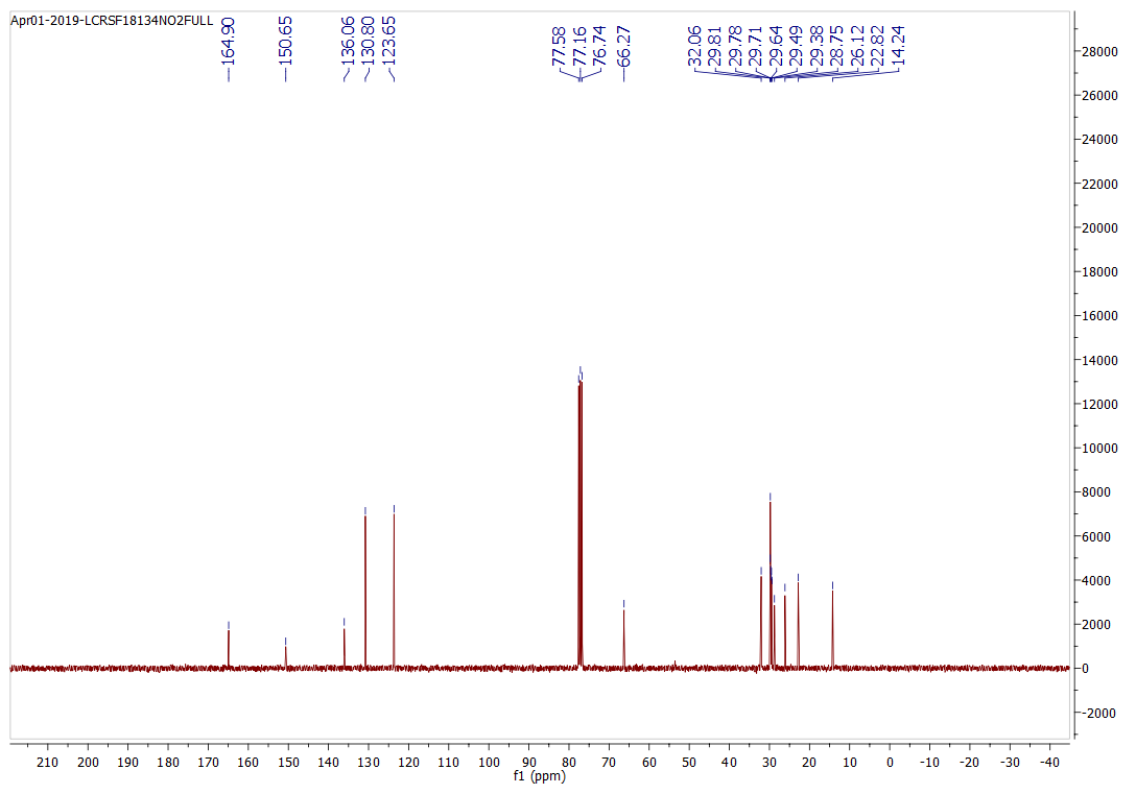


Figura 6.36. Espectro de ^{13}C RMN do composto **1k**.

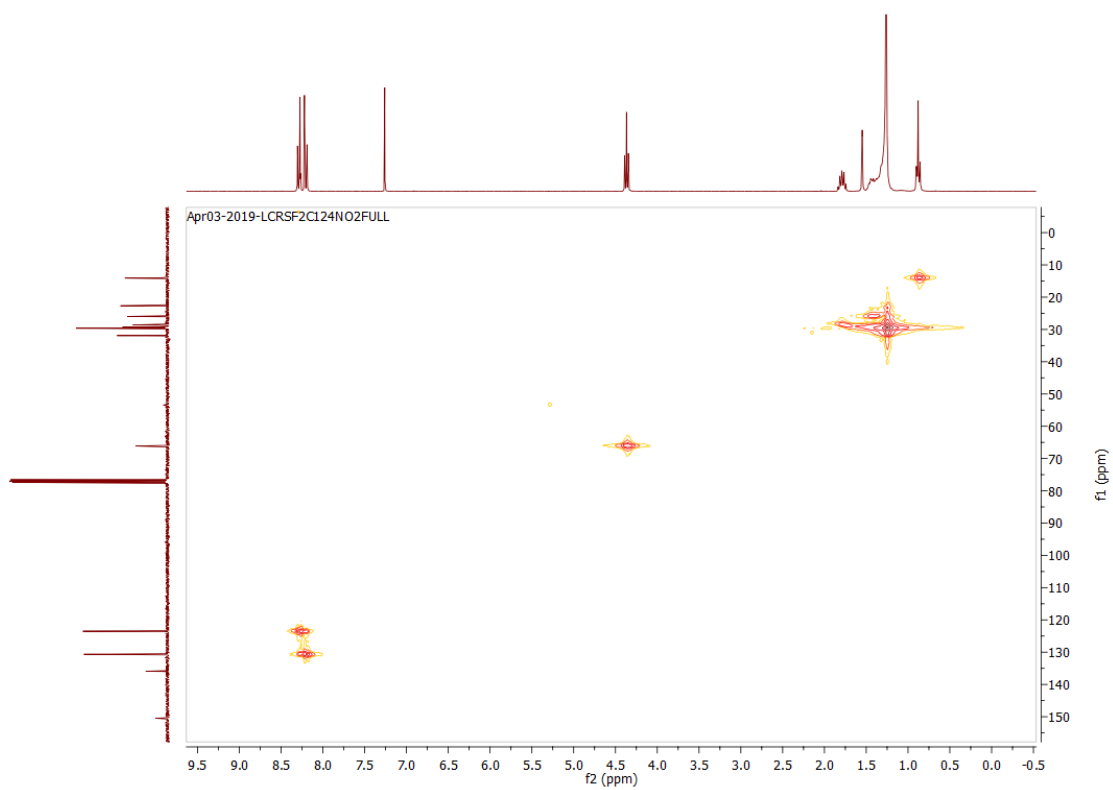


Figura 6.37. Espectro de HSQC do composto **1k**.

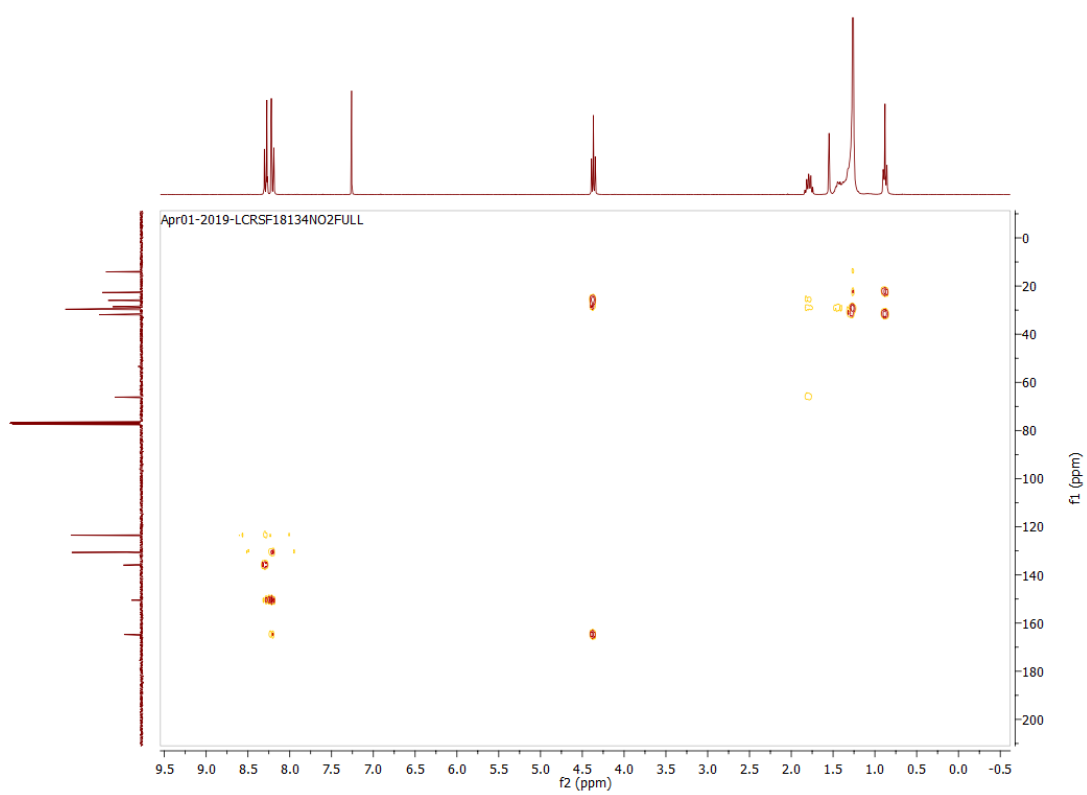


Figura 6.38. Espectro de HMBC do composto **1k**.

10. 3,5-dinitrobenzoato de propilo (2a)

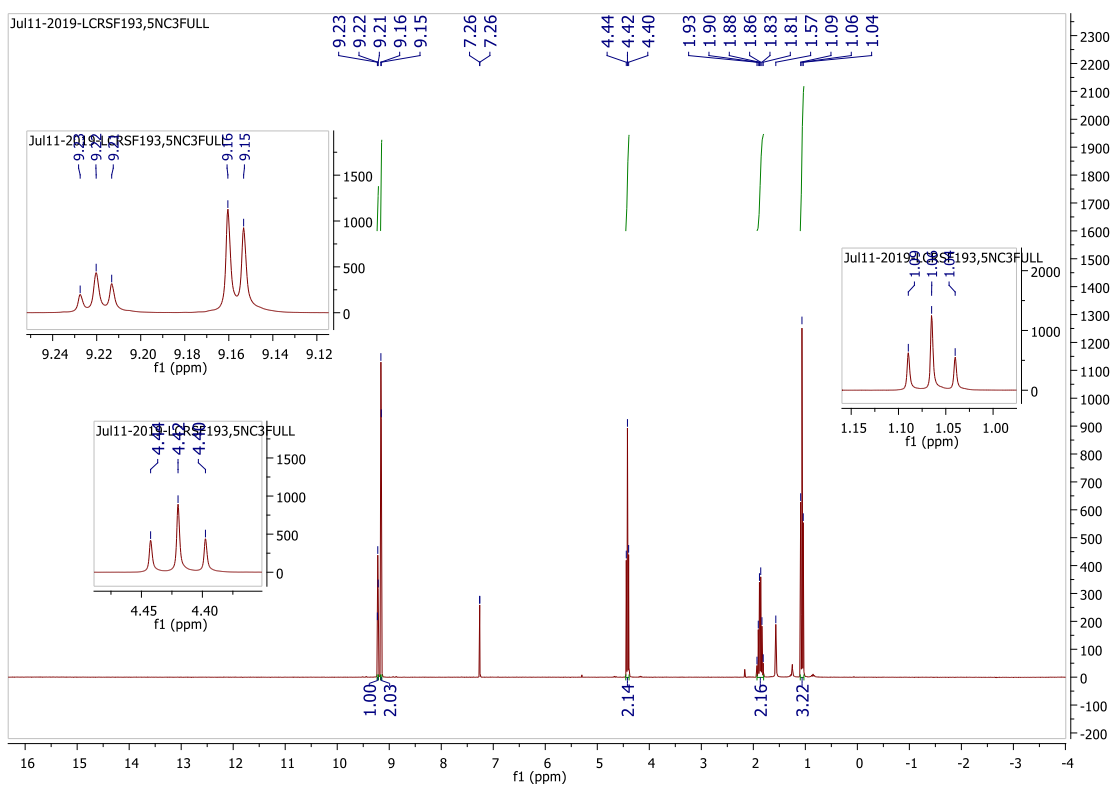
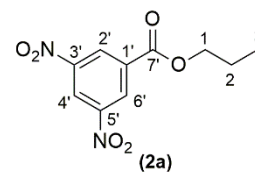


Figura 6.39. Espetro de ¹H RMN do composto 2a.

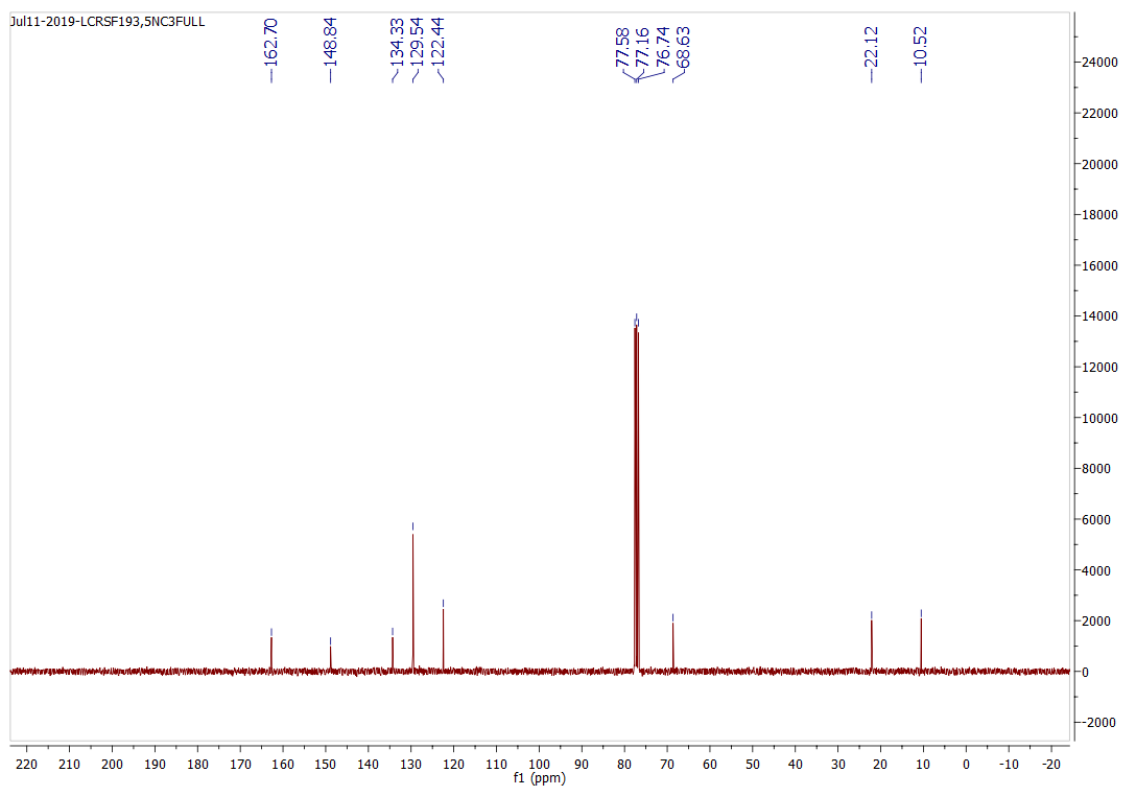


Figura 6.40. Espetro de ¹³C RMN do composto 2a.

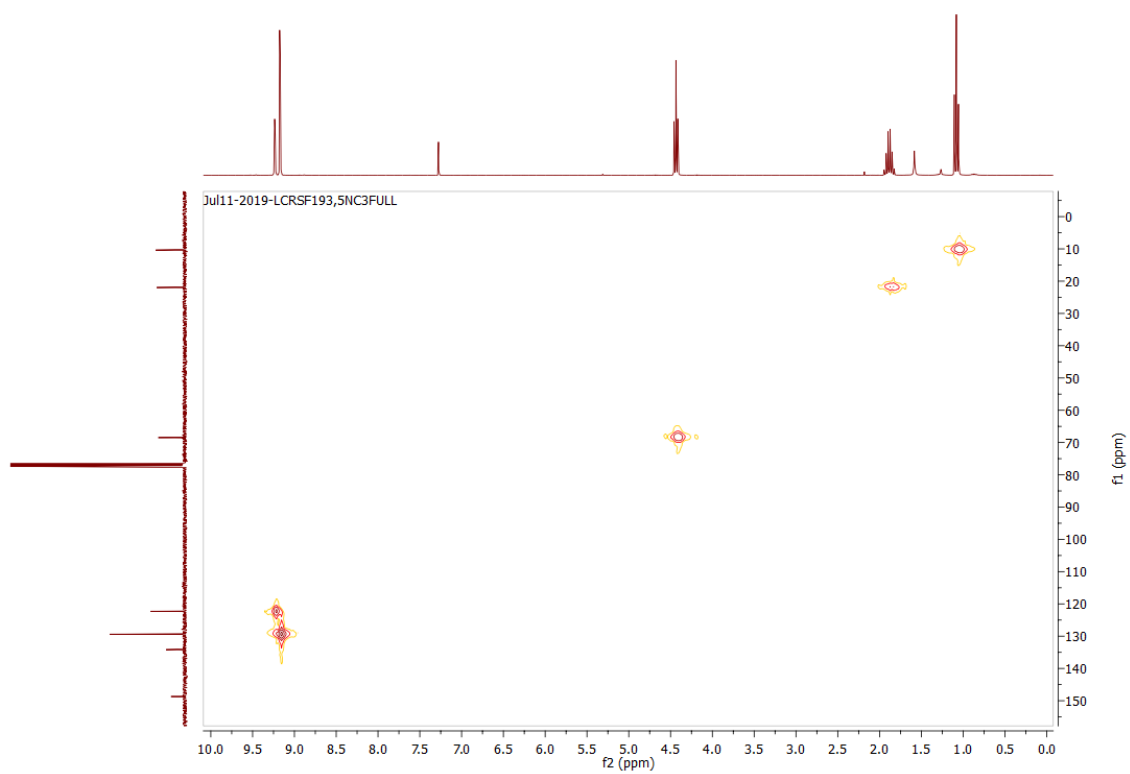


Figura 6.41. Espectro de HSQC do composto 2a.

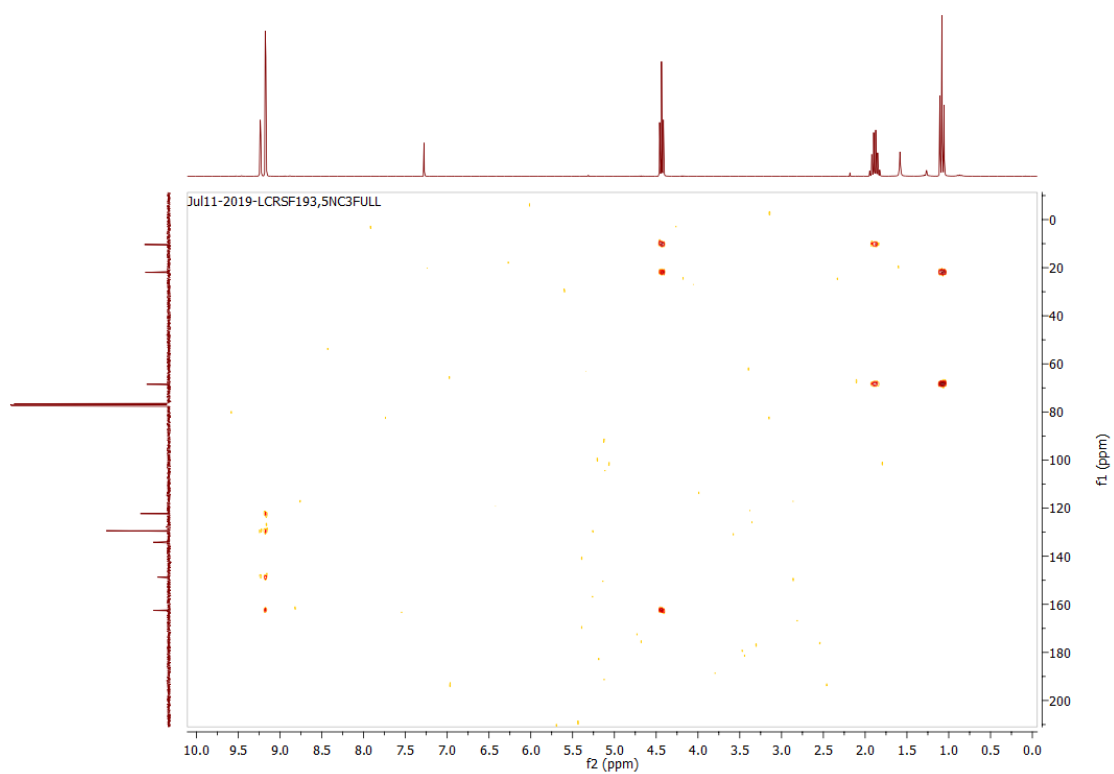


Figura 6.42. Espectro de HMBC do composto 2a.

11. 3,5-dinitrobenzoato de butilo (**2b**)

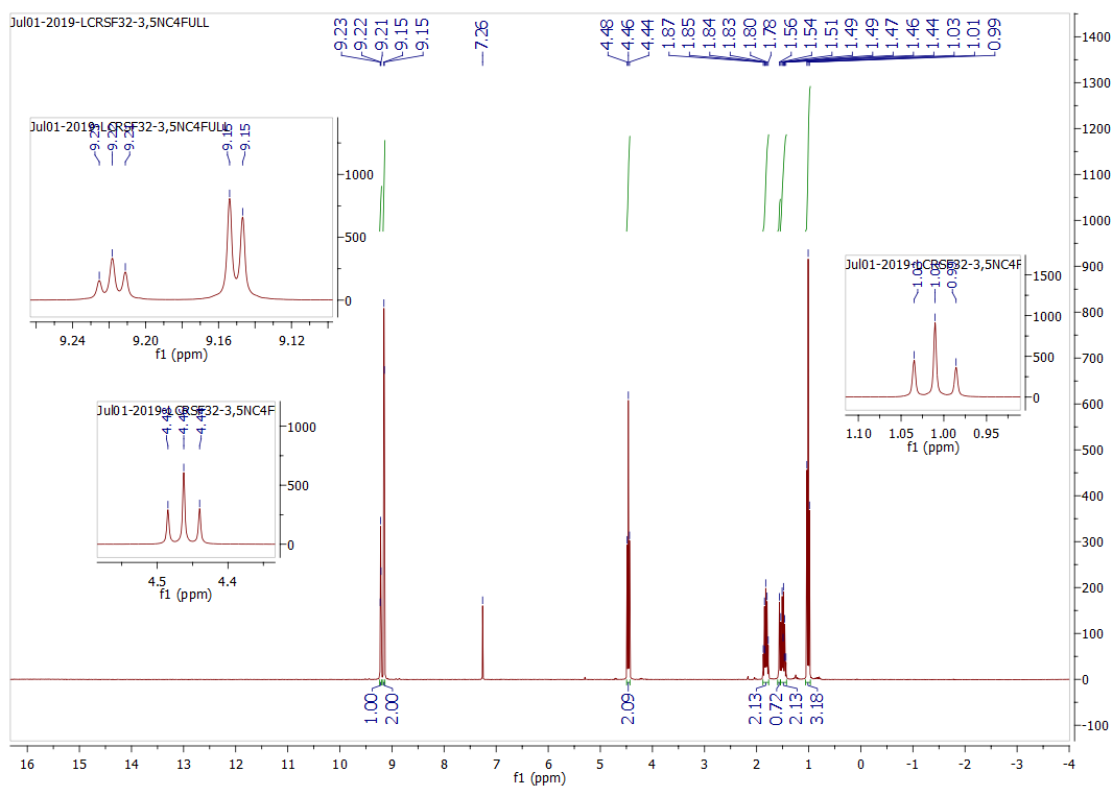
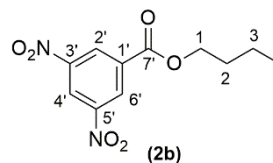


Figura 6.43. Espetro de ^1H RMN do composto **2b**.

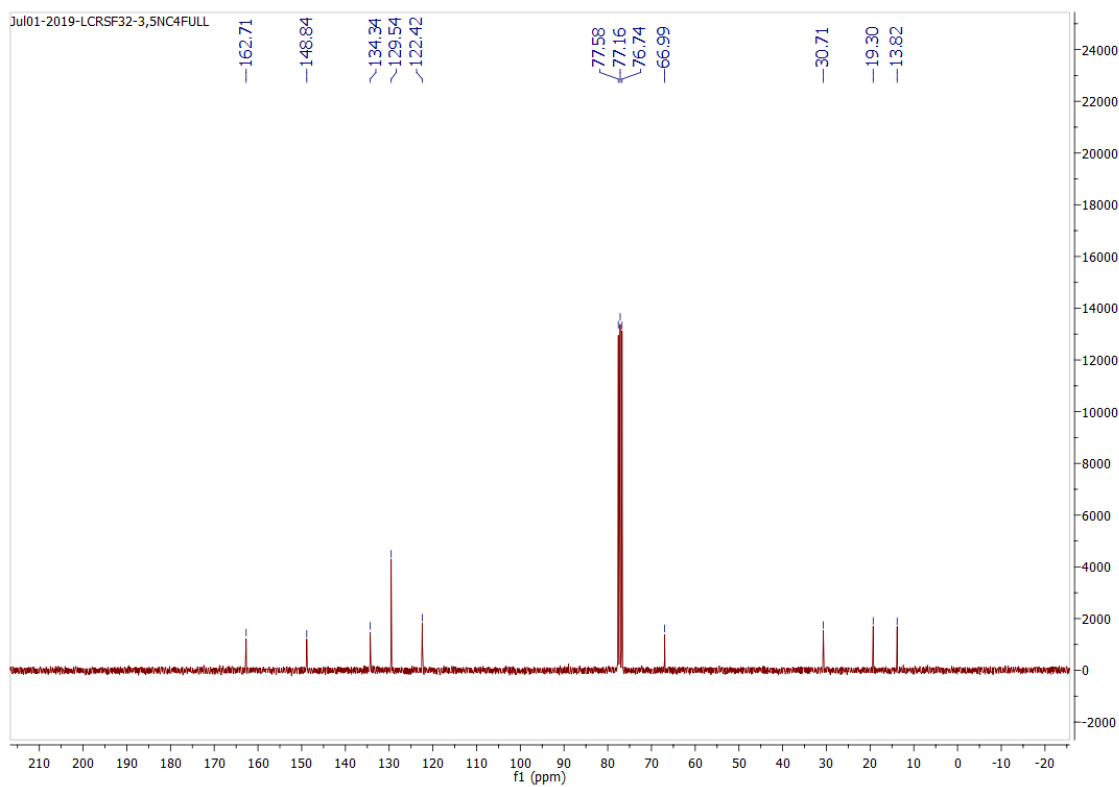


Figura 6.44. Espetro de ^{13}C RMN do composto **2b**.

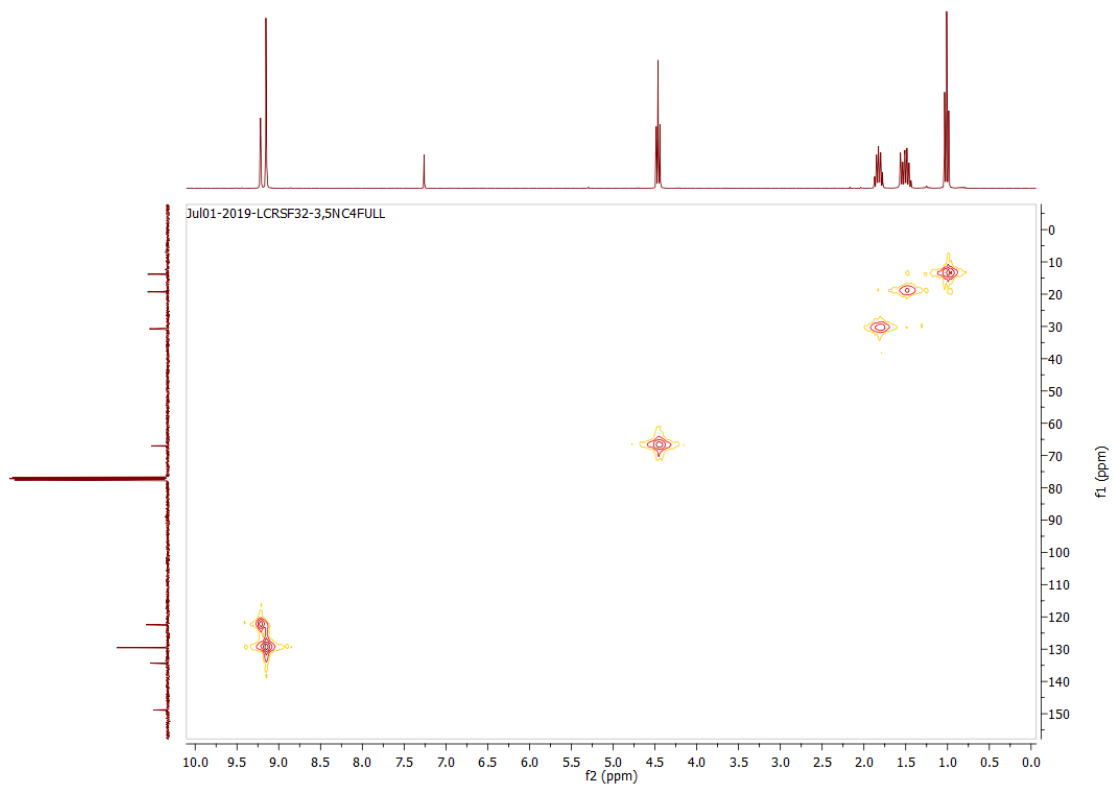


Figura 6.45. Espectro de HSQC do composto **2b**.

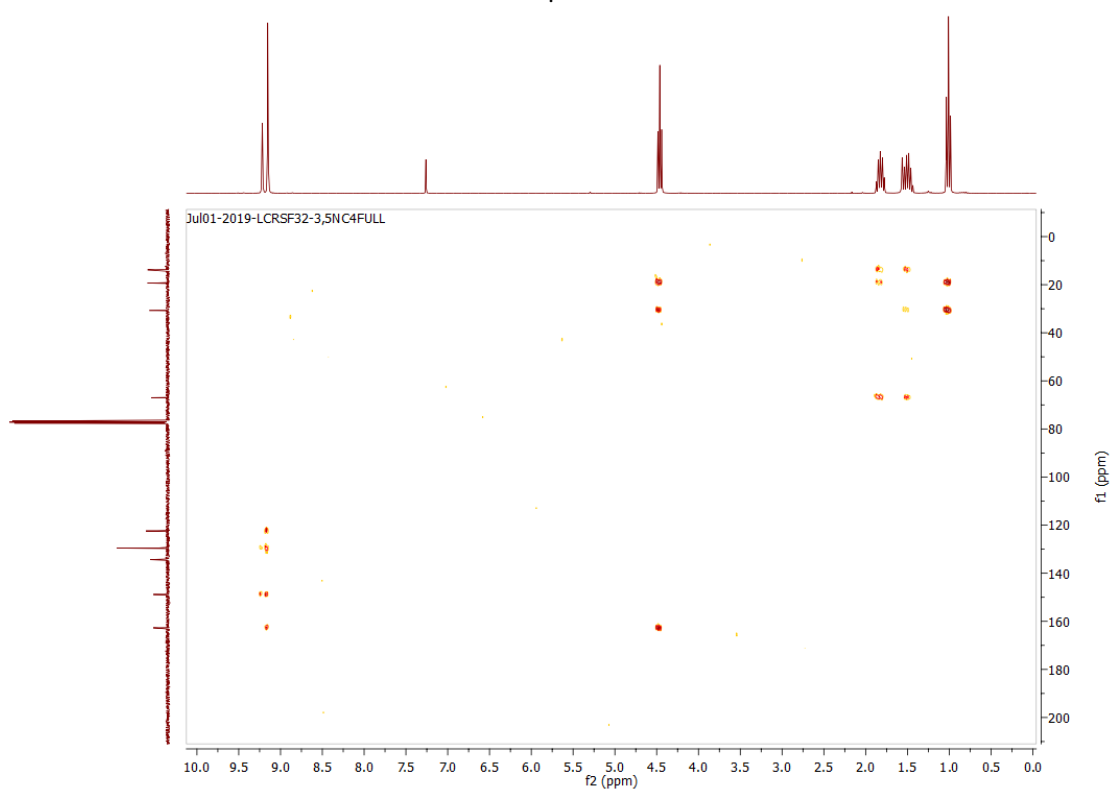


Figura 6.46. Espectro de HMBC do composto **2b**.

12. 3,5-dinitrobenzoato de pentilo (2c)

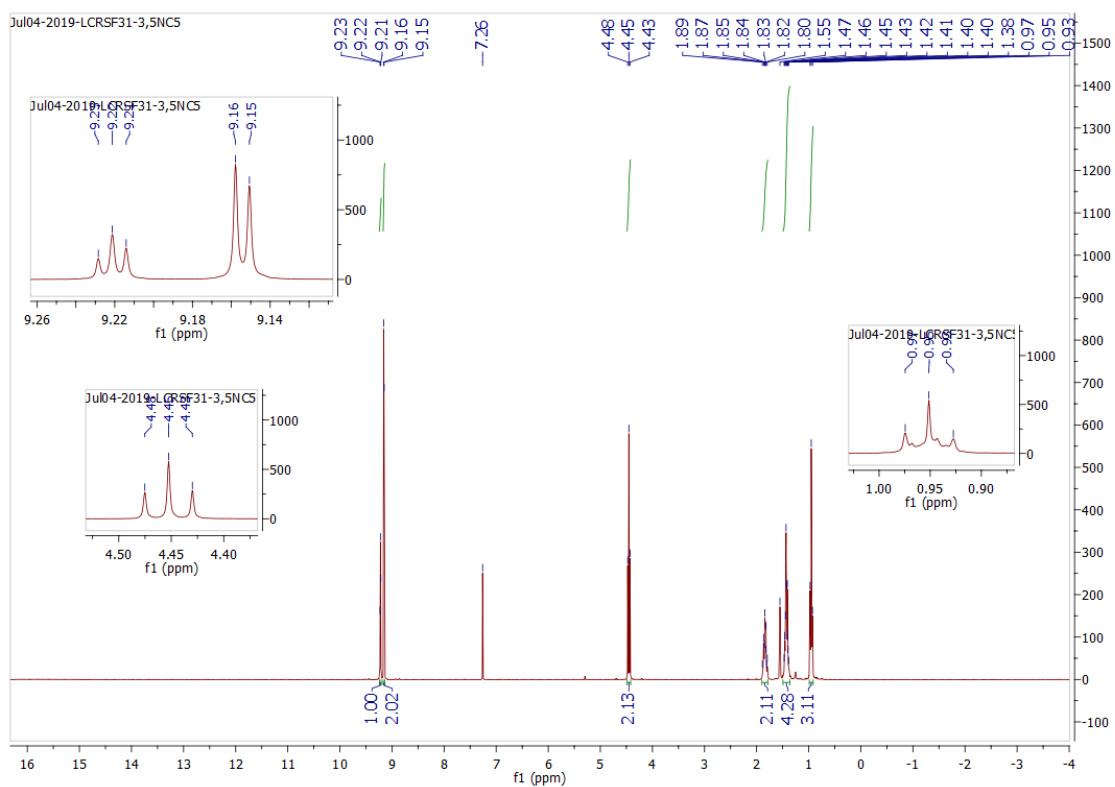
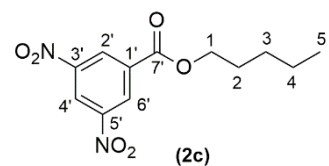


Figura 6.47. Espetro de ^1H RMN do composto 2c.

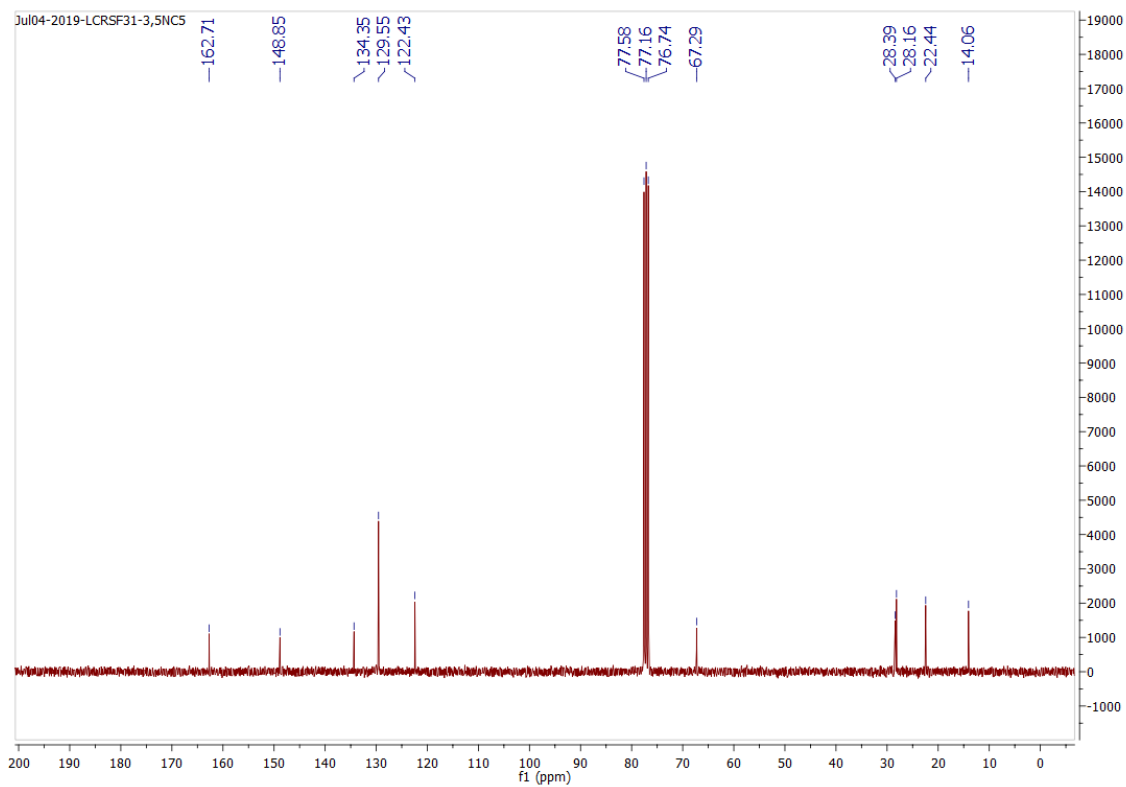


Figura 6.48. Espetro de ^{13}C RMN do composto 2c.

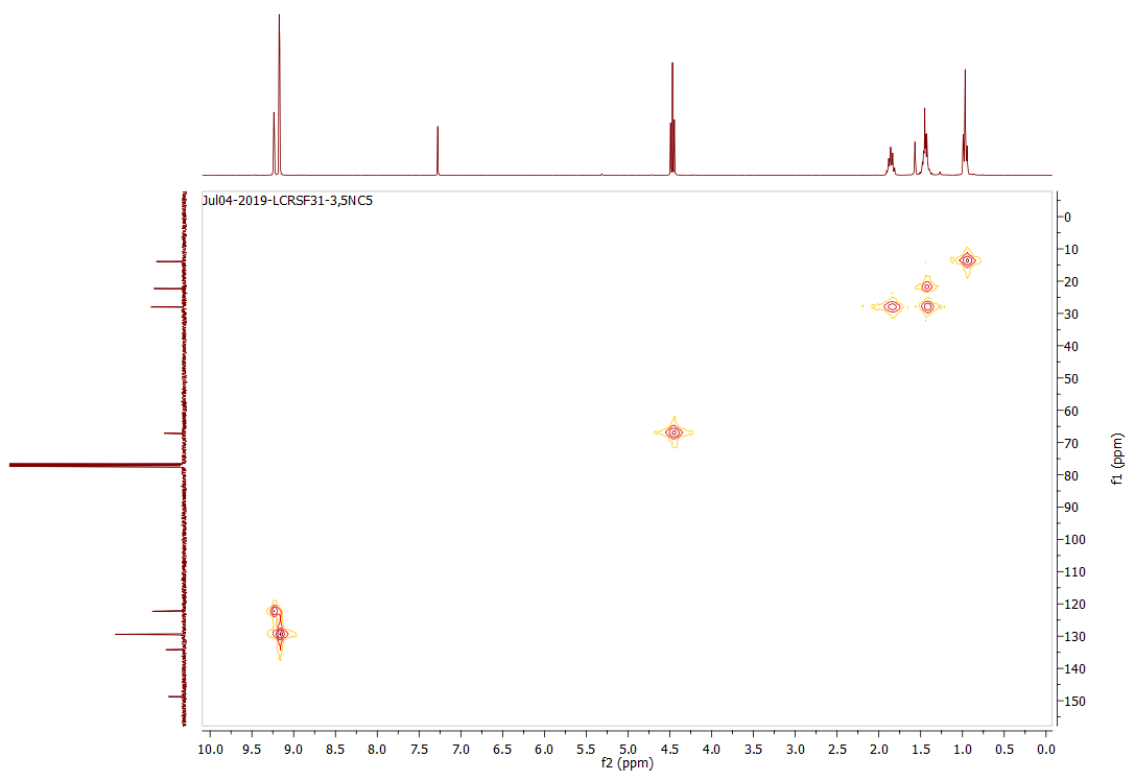


Figura 6.49. Espectro de HSQC do composto 2c.

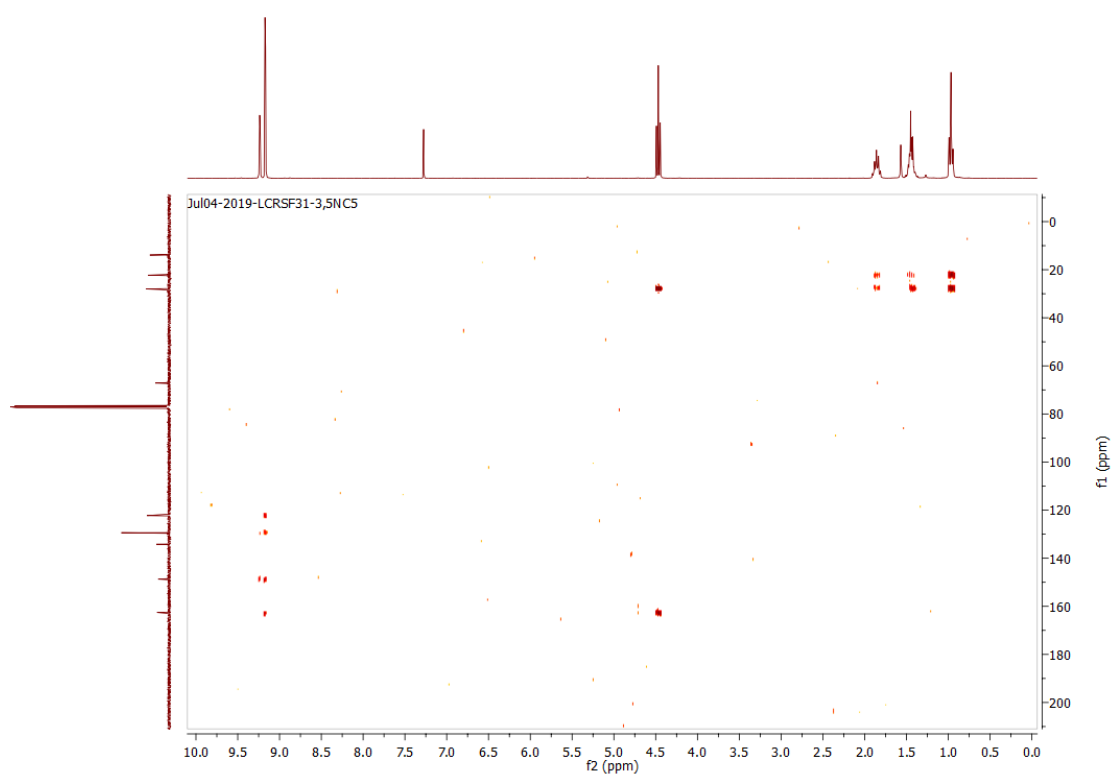


Figura 6.50. Espectro de HMBC do composto 2c.

13. 3,5-dinitrobenzoato de hexilo (2d)

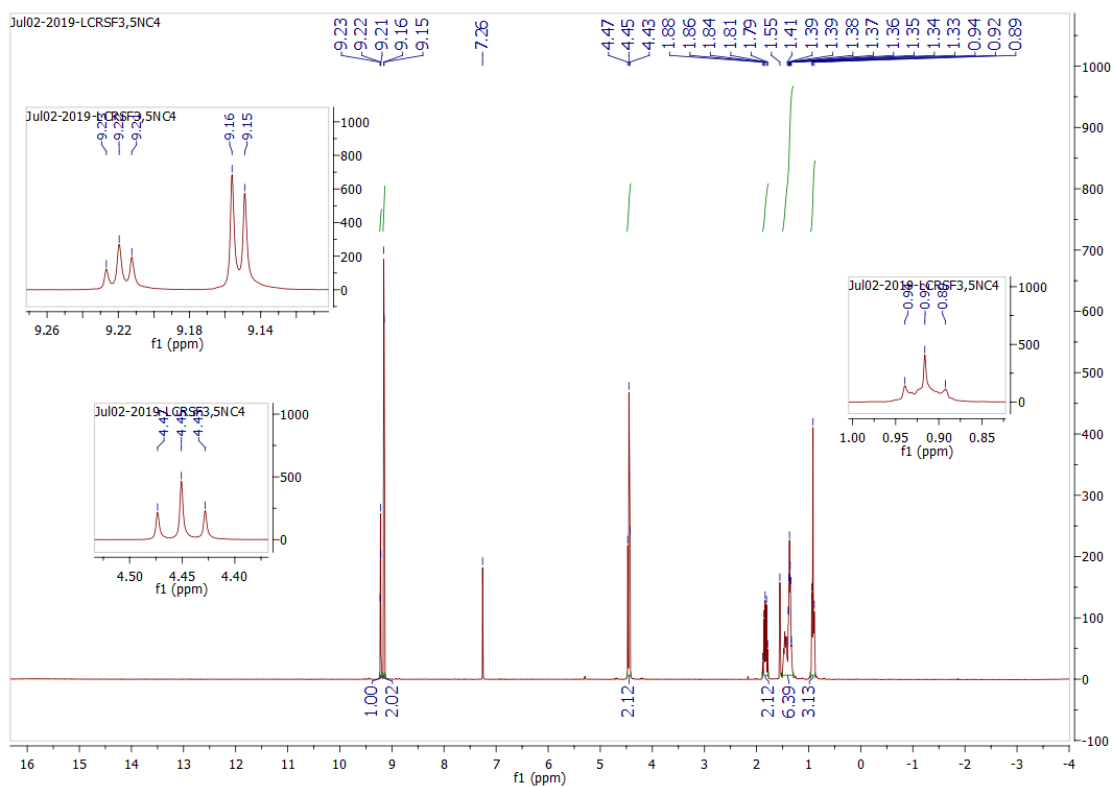
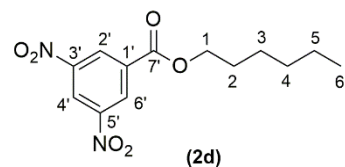


Figura 6.51. Espetro de ^1H RMN do composto 2d.

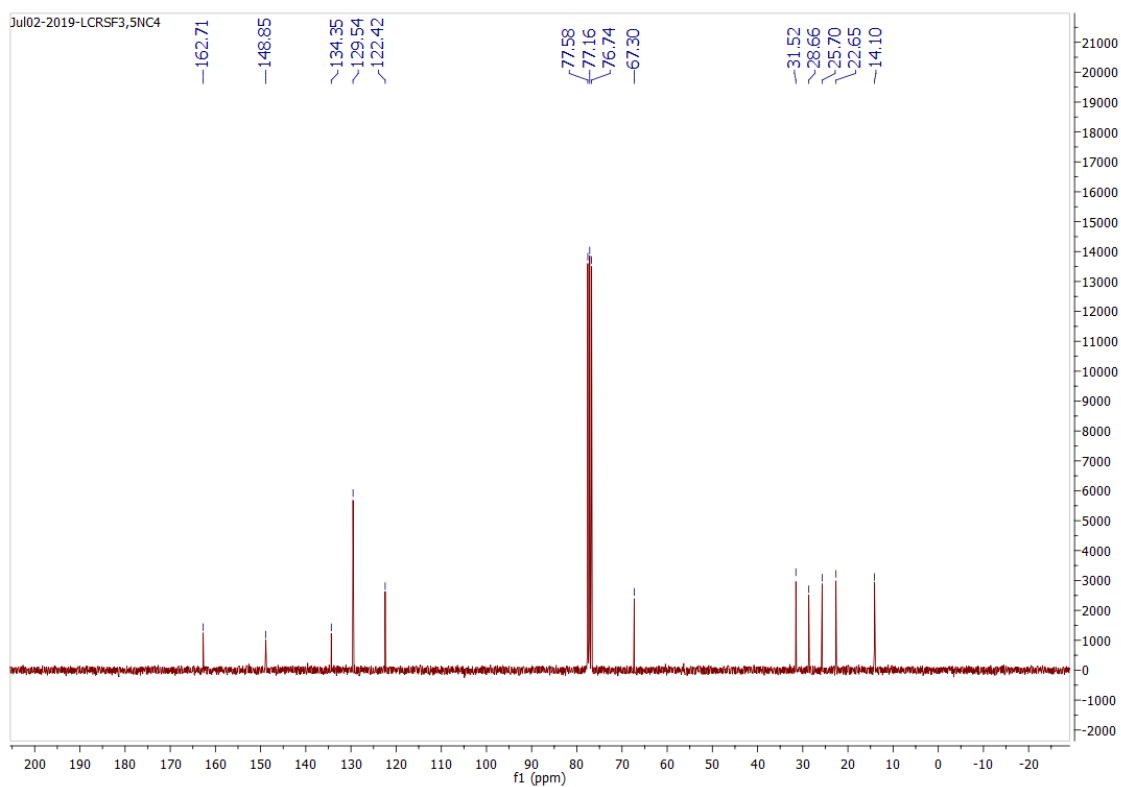


Figura 6.52. Espetro de ^{13}C RMN do composto 2d.

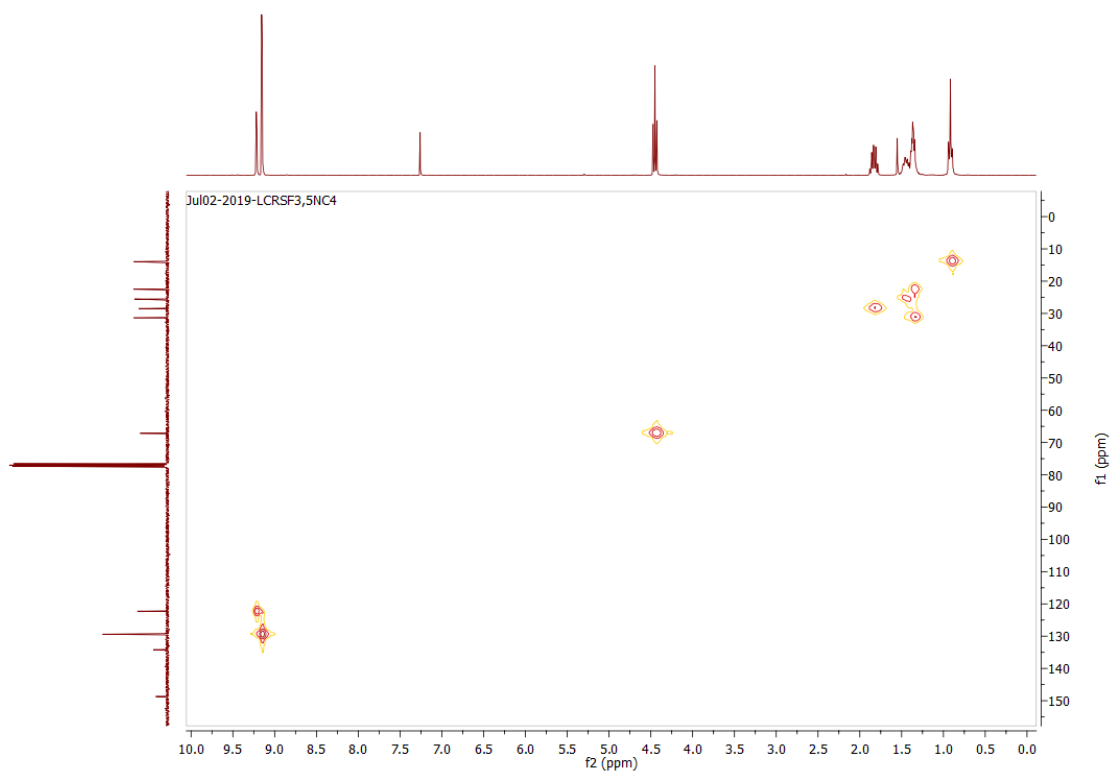


Figura 6.53. Espectro de HSQC do composto **2d**.

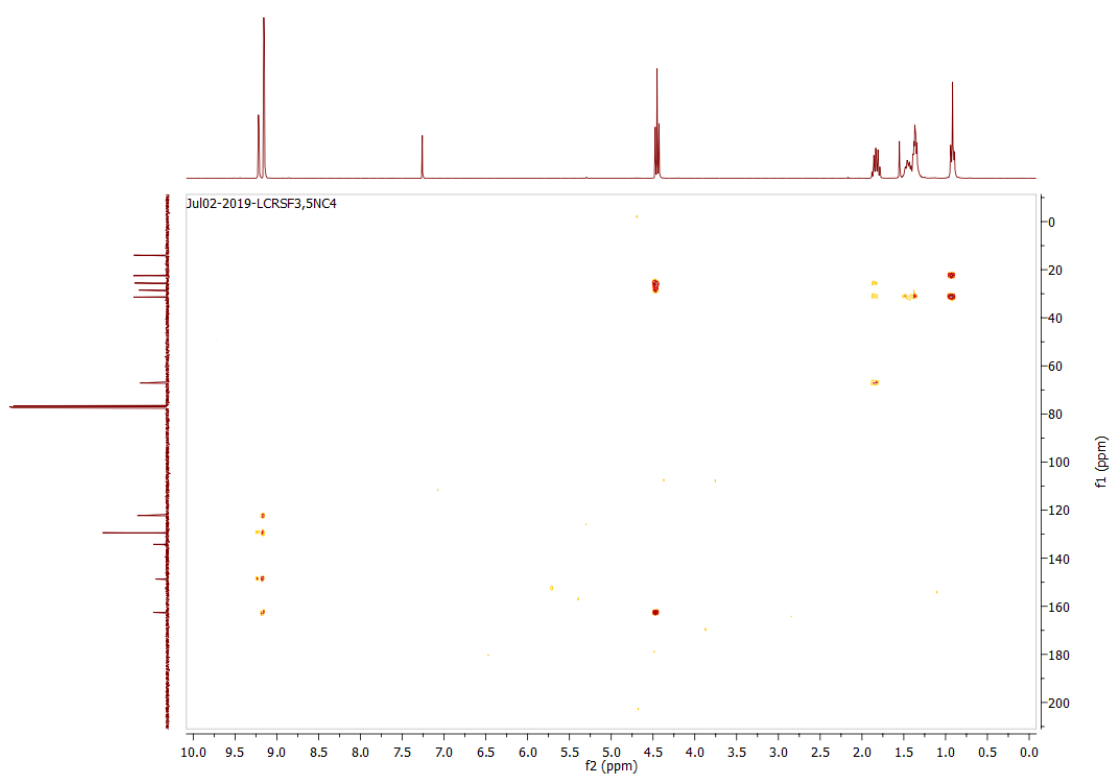


Figura 6.54. Espectro de HMBC do composto **2d**.

14. 3,5-dinitrobenzoato de heptilo (**2e**)

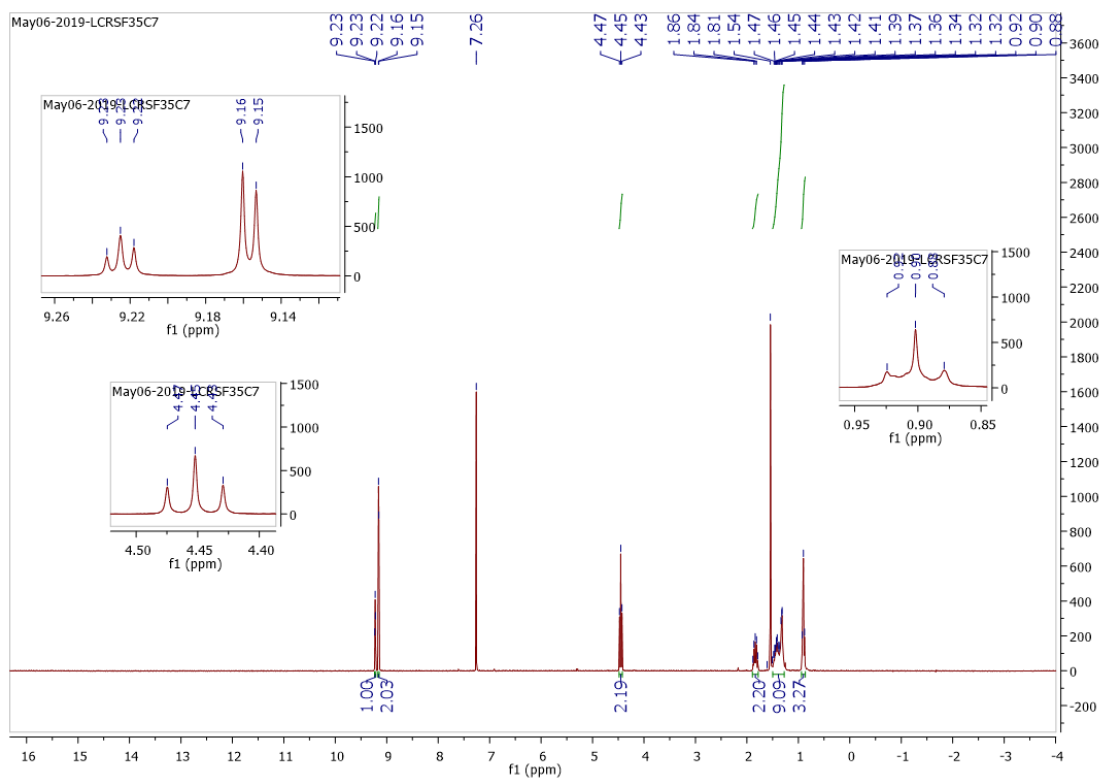
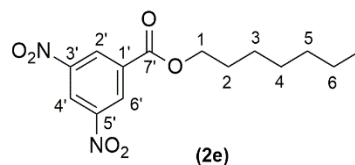


Figura 6.55. Espetro de ^1H RMN do composto **2e**.

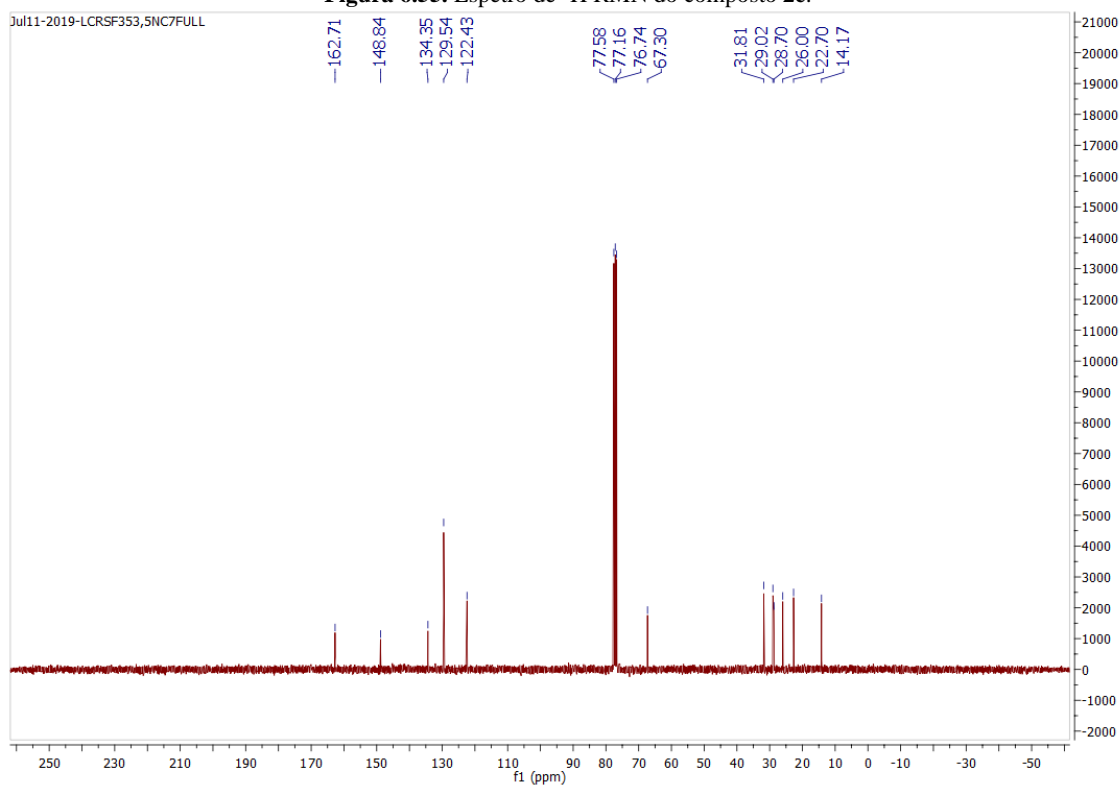


Figura 6.56. Espetro de ^{13}C RMN do composto **2e**.

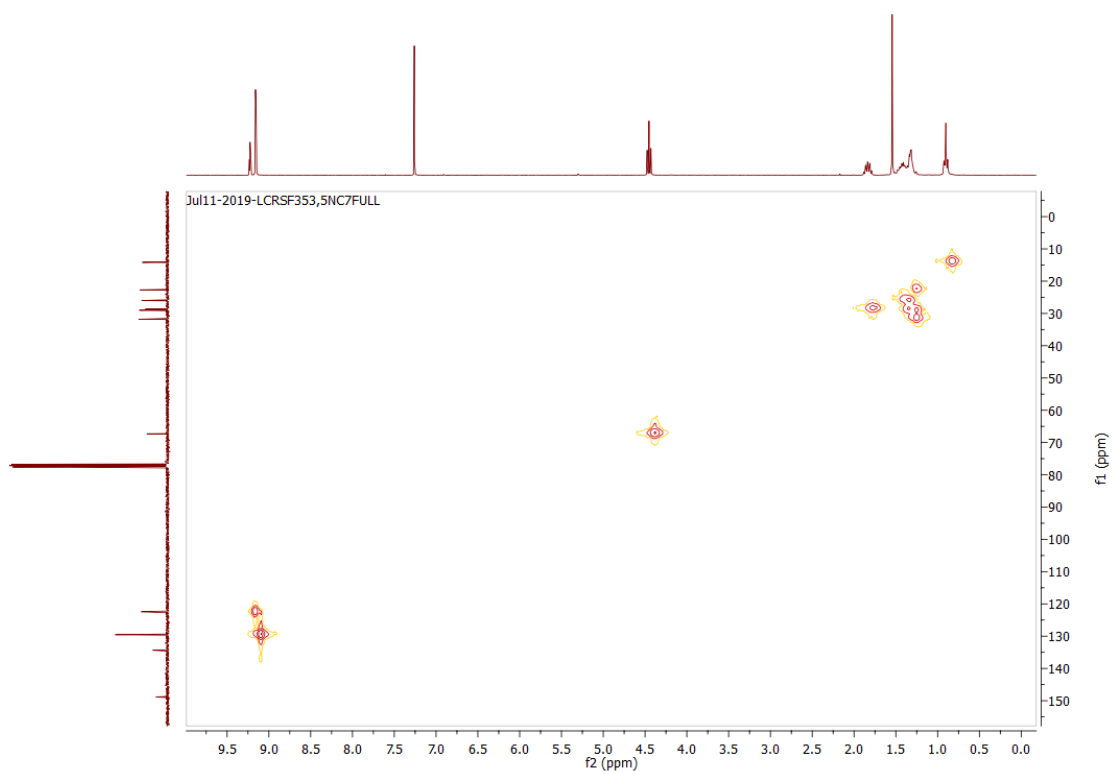


Figura 6.57. Espectro de HSQC do composto 2e.

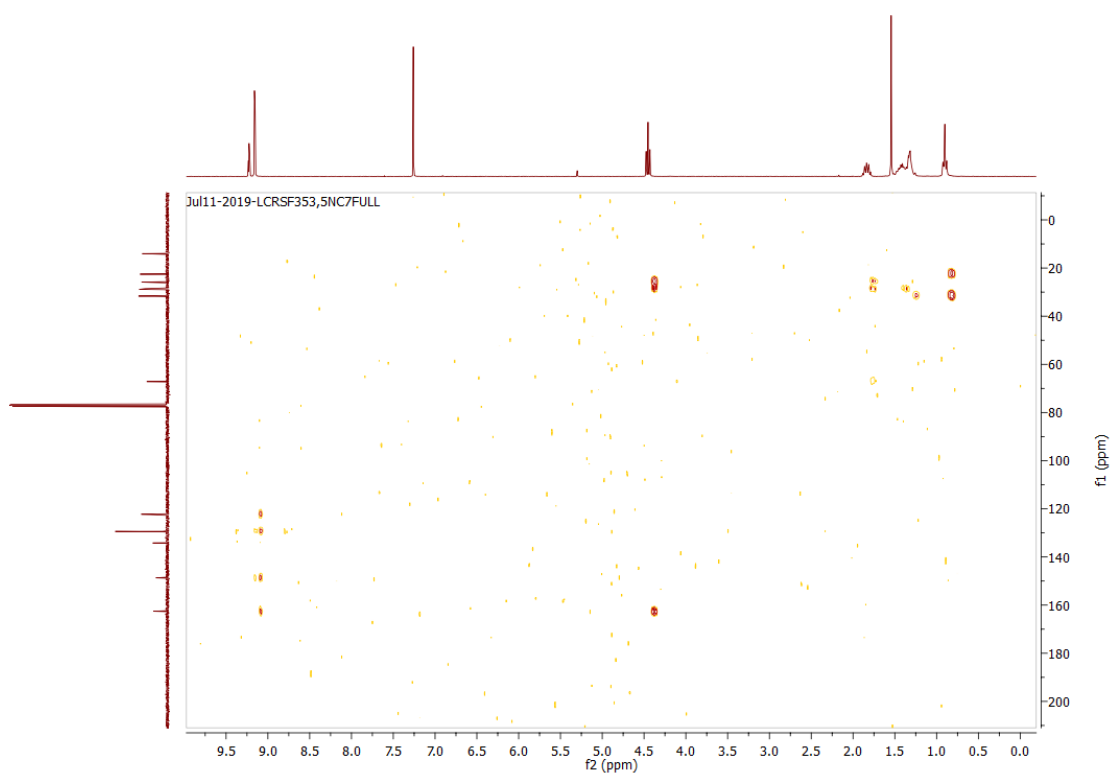


Figura 6.58. Espectro de HMBC do composto 2e.

3,5-dinitrobenzoato de octilo (**2f**)

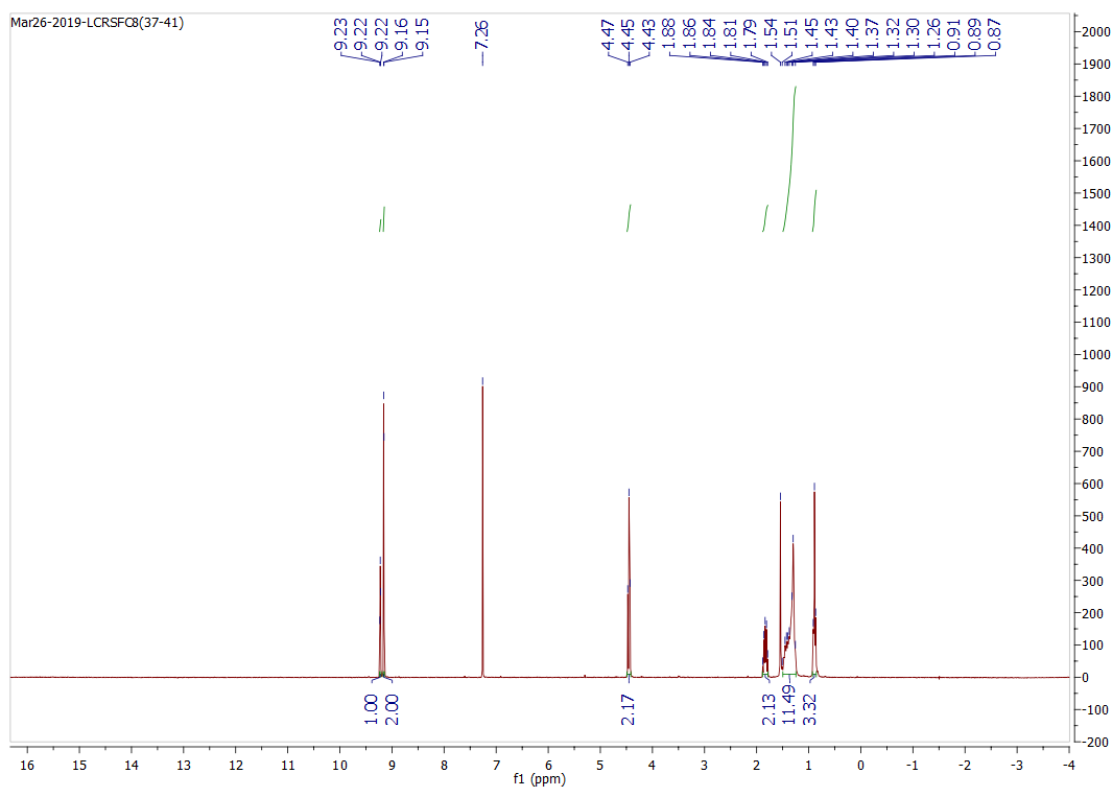
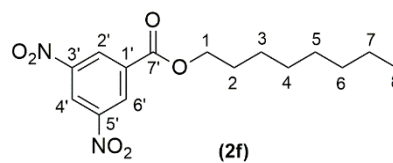


Figura 6.59. Espectro de ^1H RMN do composto **2f**.

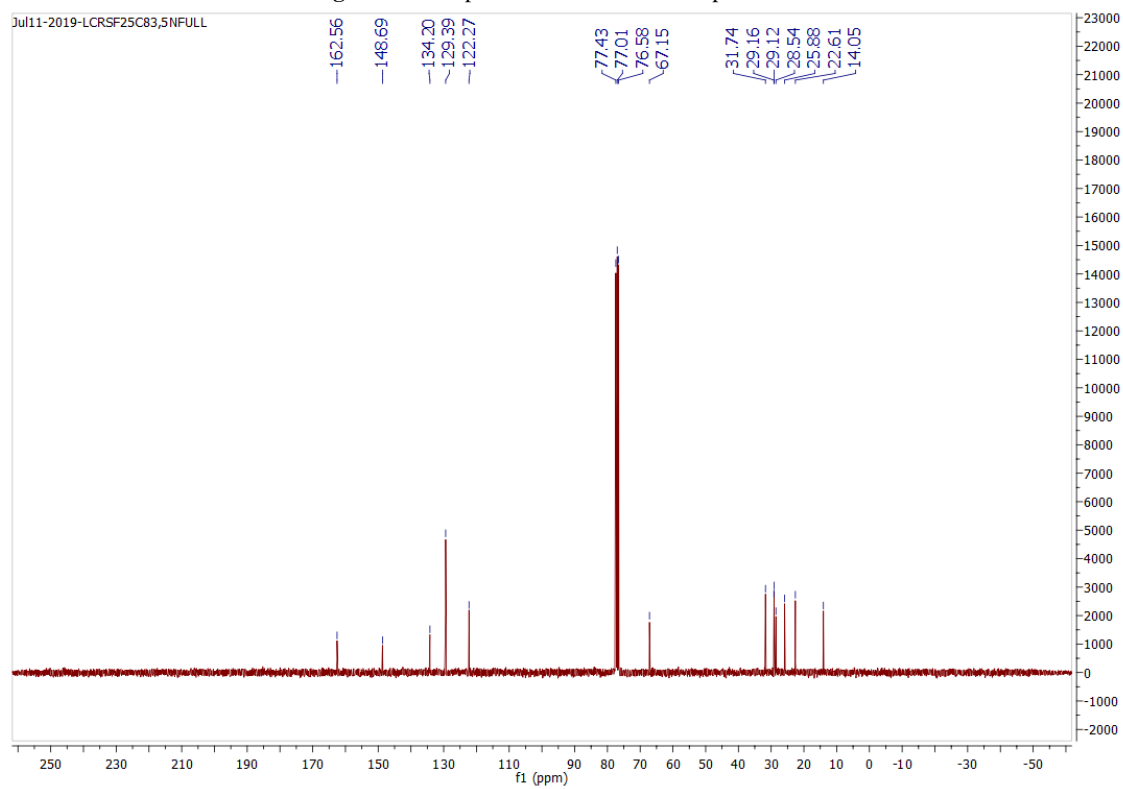


Figura 6.60. Espectro de ^{13}C RMN do composto **2f**.

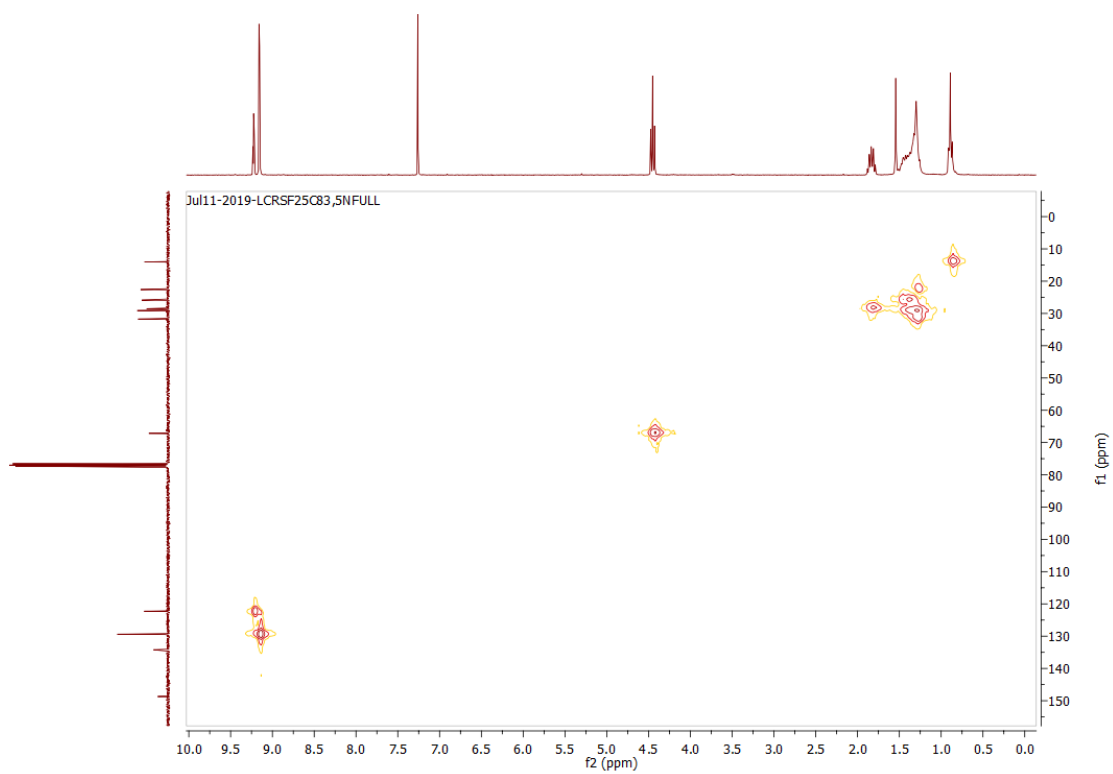


Figura 6.61. Espectro de HSQC do composto 2f.

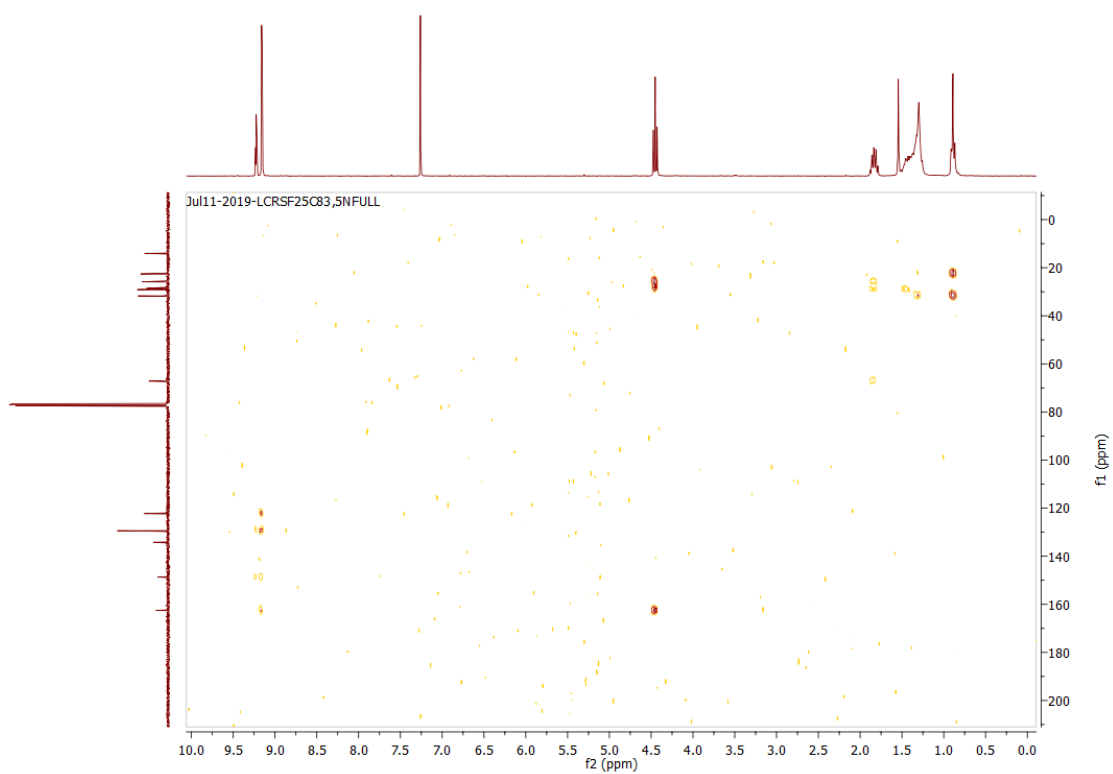


Figura 6.62. Espectro de HMBC do composto 2f.

15. 3,5-dinitrobenzoato de tridecilo (**2k**)

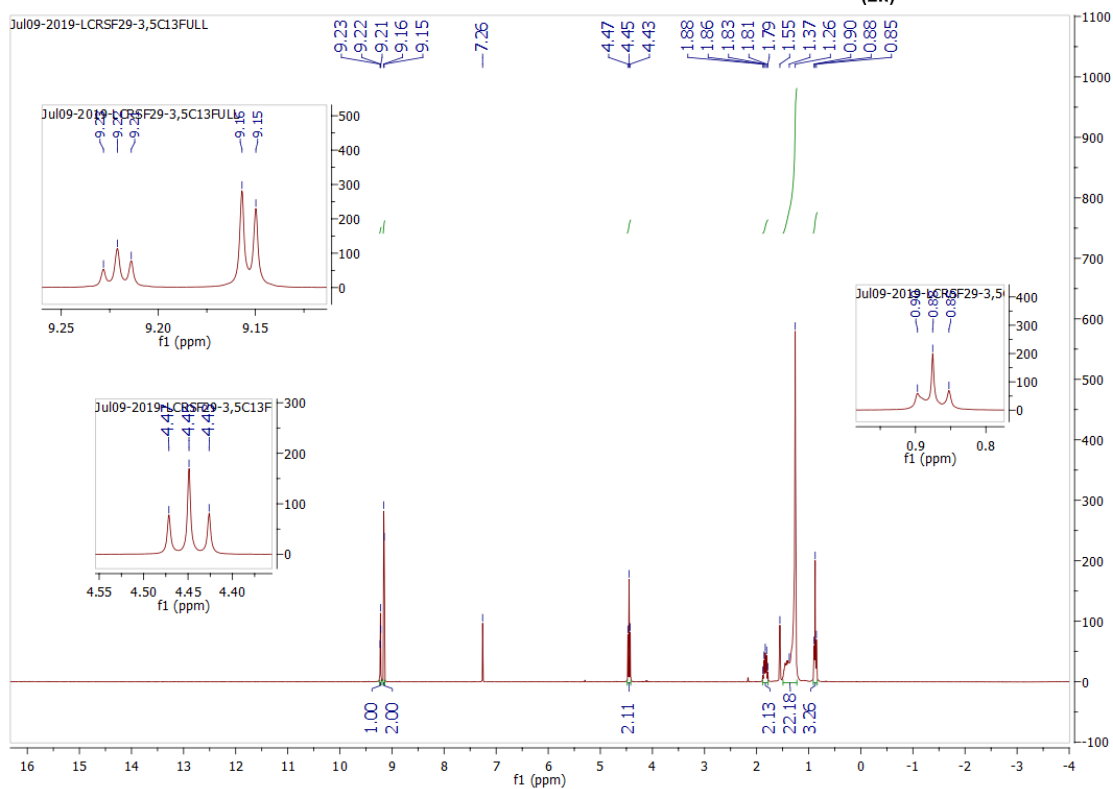
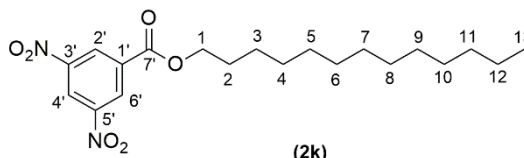


Figura 6.63. Espetro de ^1H RMN do composto **2k**.

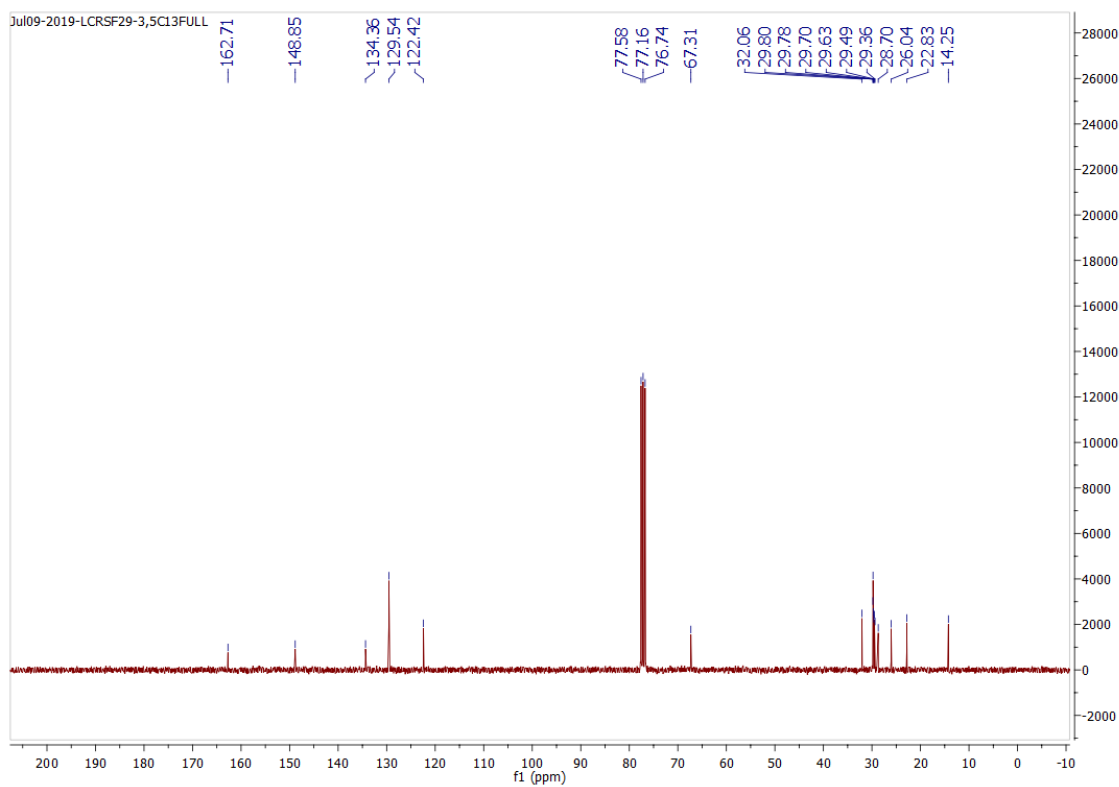


Figura 6.64. Espetro de ^{13}C RMN do composto **2k**.

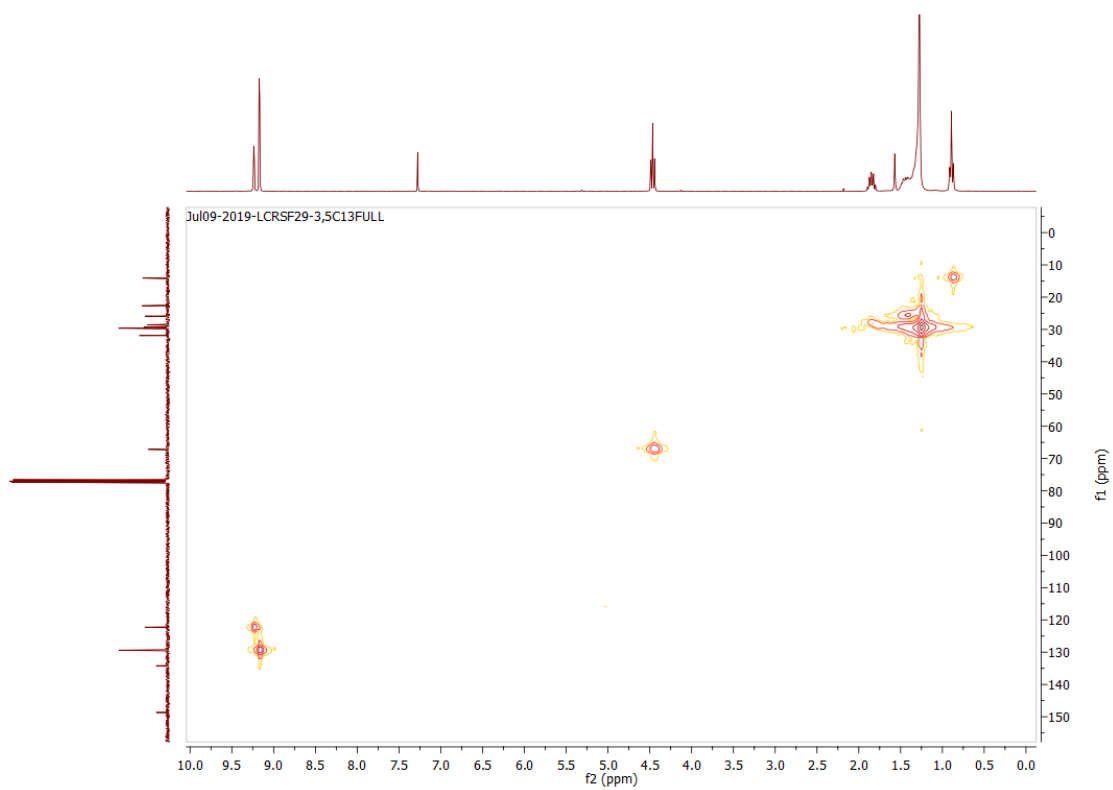


Figura 6.65. Espectro de HSQC do composto **2k**.

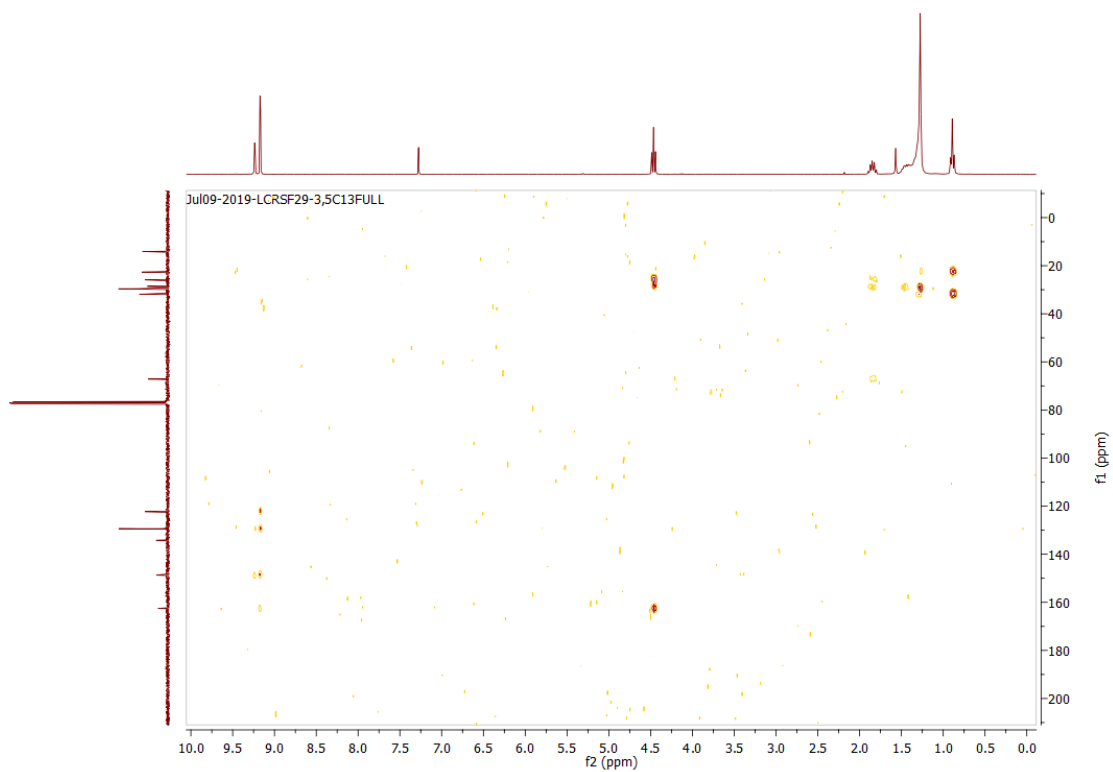


Figura 6.66. Espectro de HMBC do composto **2k**.

16. 3,5-dinitrobenzoato de tetradecilo (21)

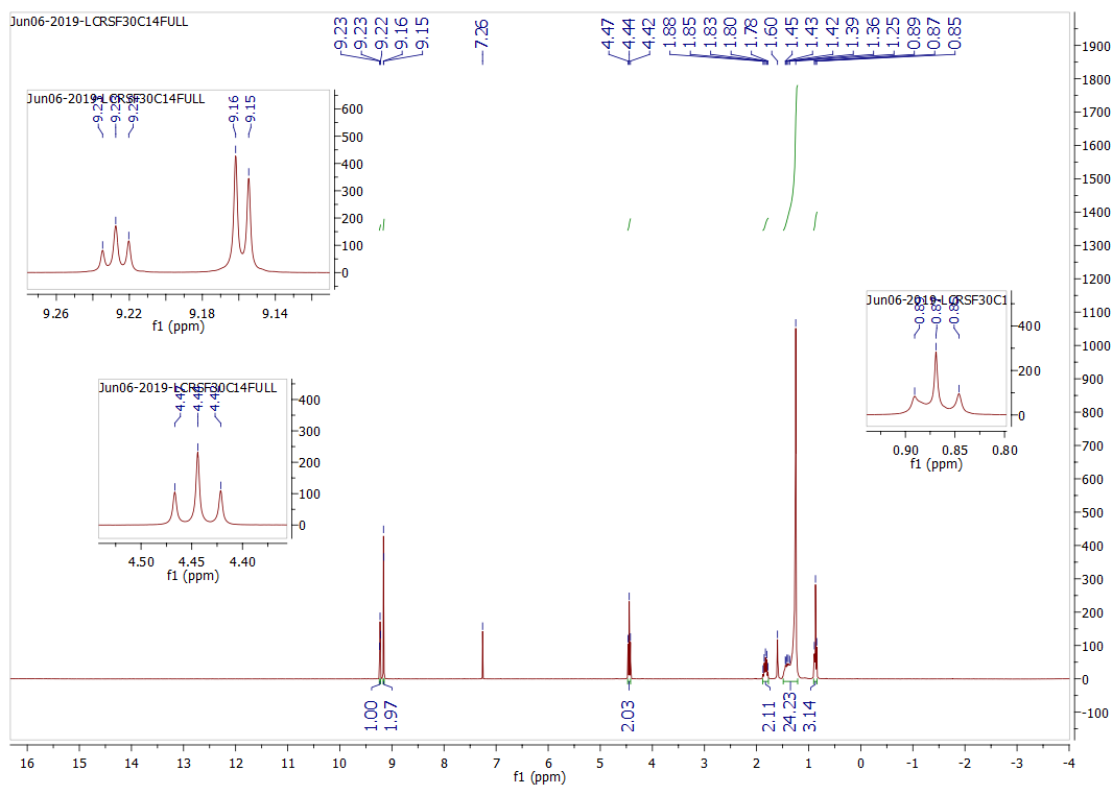
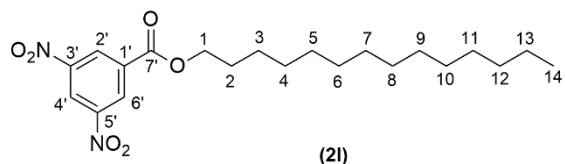


Figura 6.67. Espetro de ^1H RMN do composto 21.

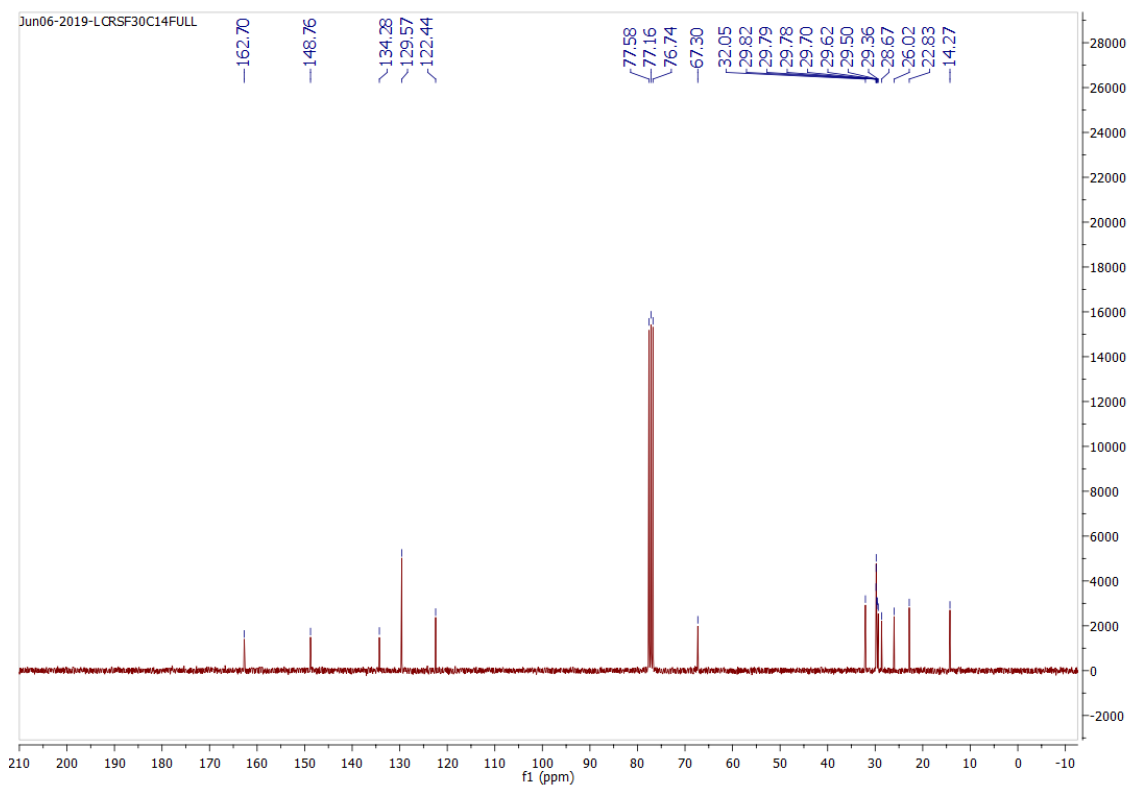


Figura 6.68. Espetro de ^{13}C RMN do composto 21.

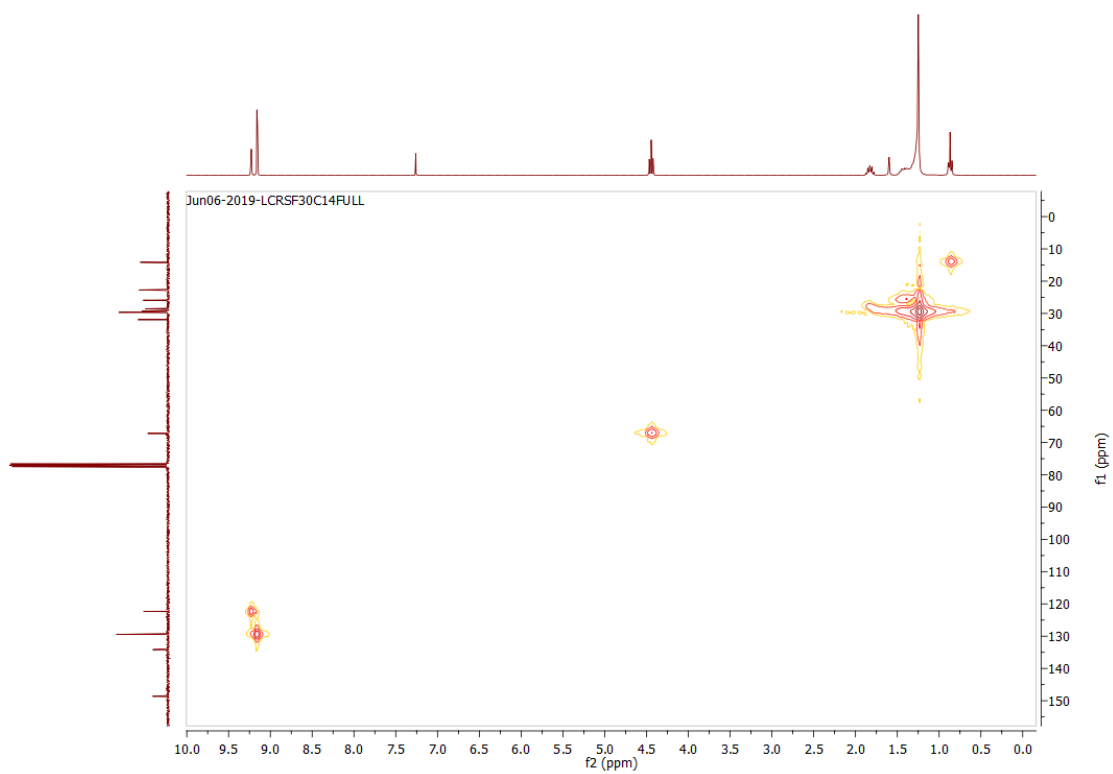


Figura 6.69. Espectro de HSQC do composto 21.

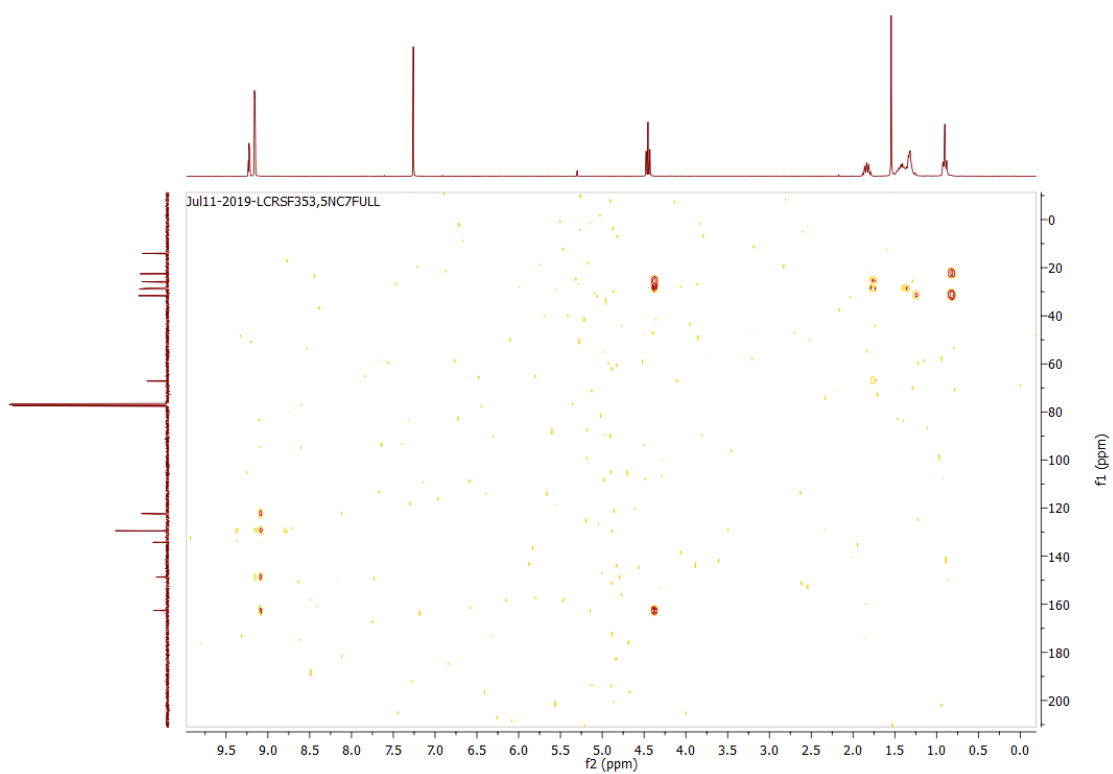


Figura 6.70. Espectro de HMBC do composto 21.

17. 4-(trifluorometil)benzoato de nonilo (**3a**)

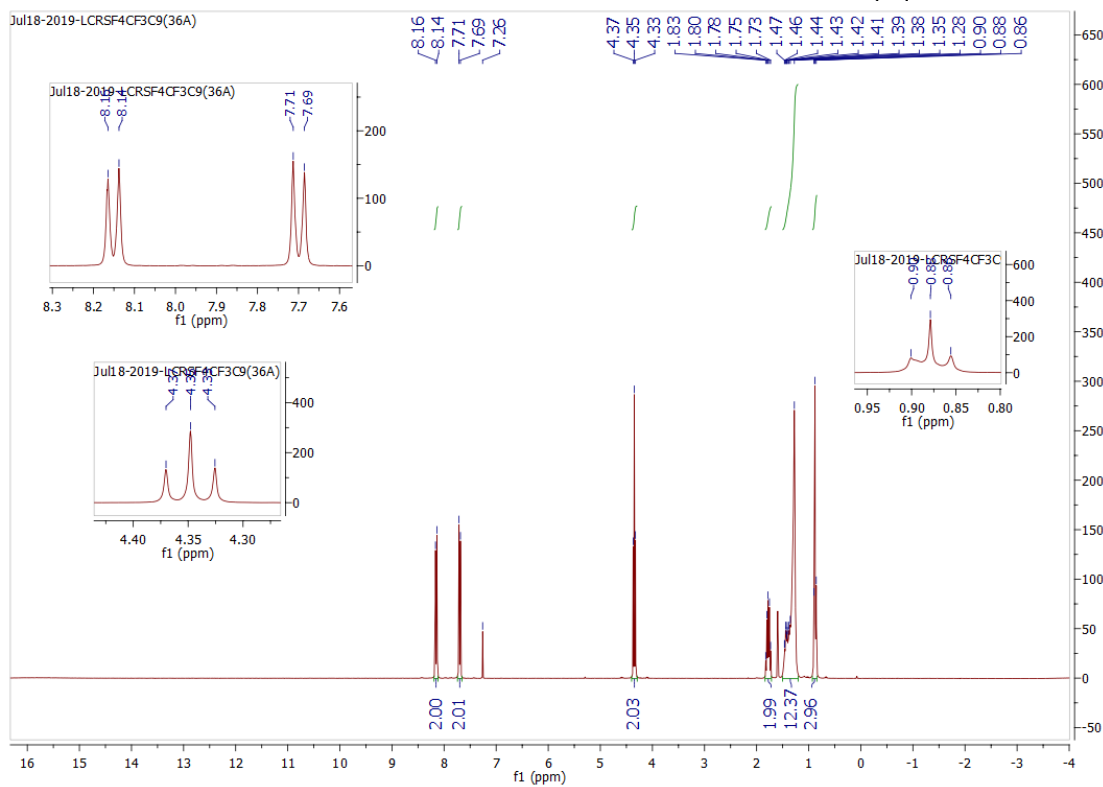
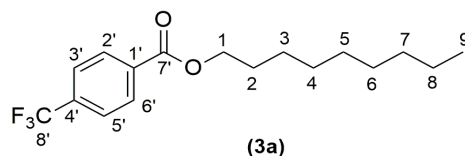


Figura 6.71. Espectro de ^1H RMN do composto **3a**.

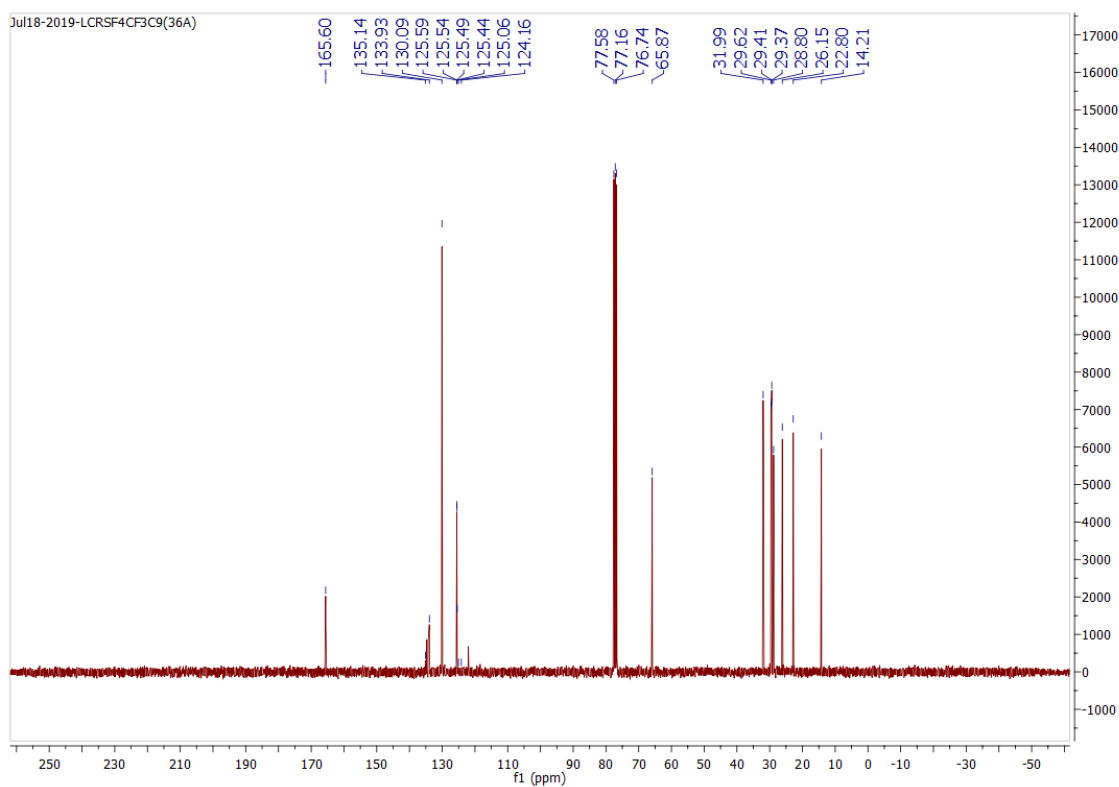


Figura 6.72. Espectro de ^{13}C RMN do composto **3a**.

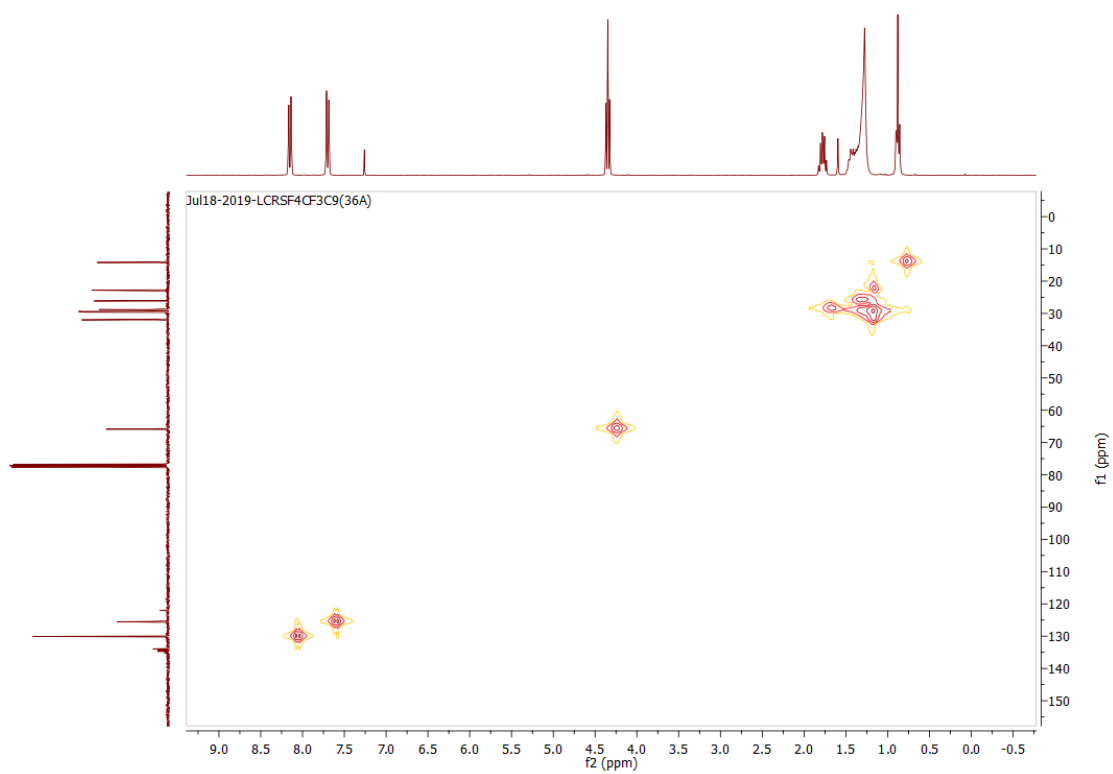


Figura 6.73. Espectro de HSQC do composto 3a.

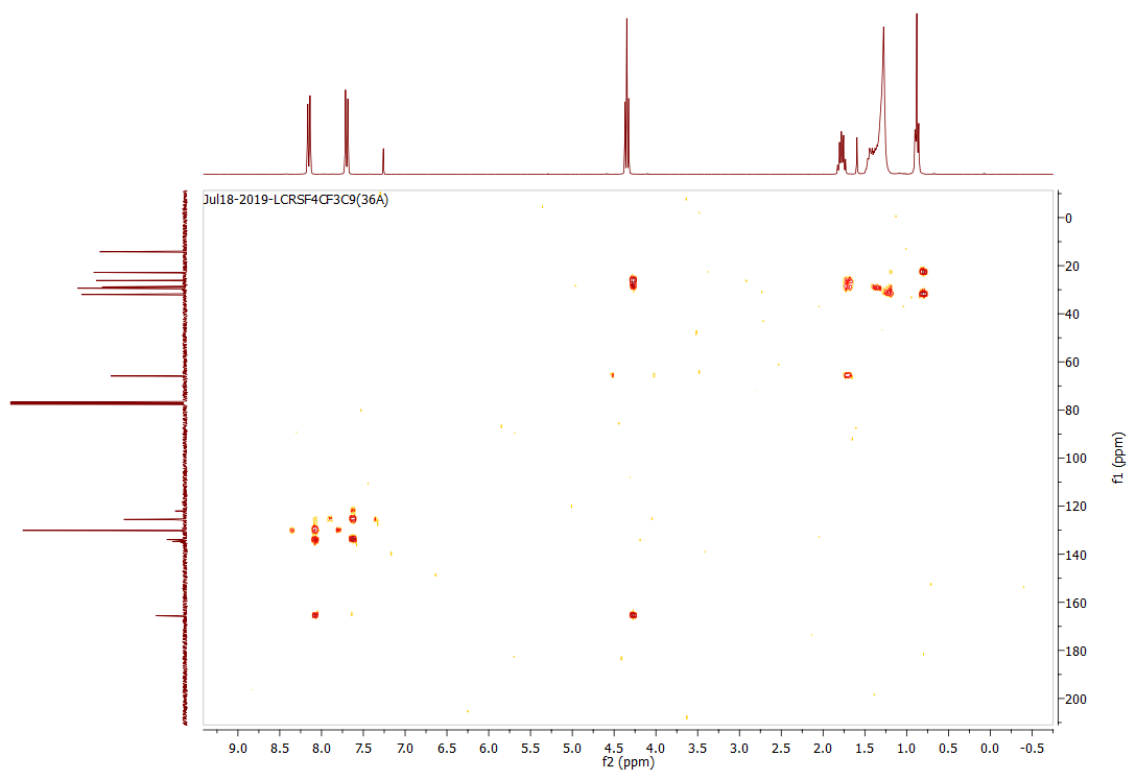


Figura 6.74. Espectro de HMBC do composto 3a.

18. 4-trifluorometilbenzoato de decilo (**3b**)

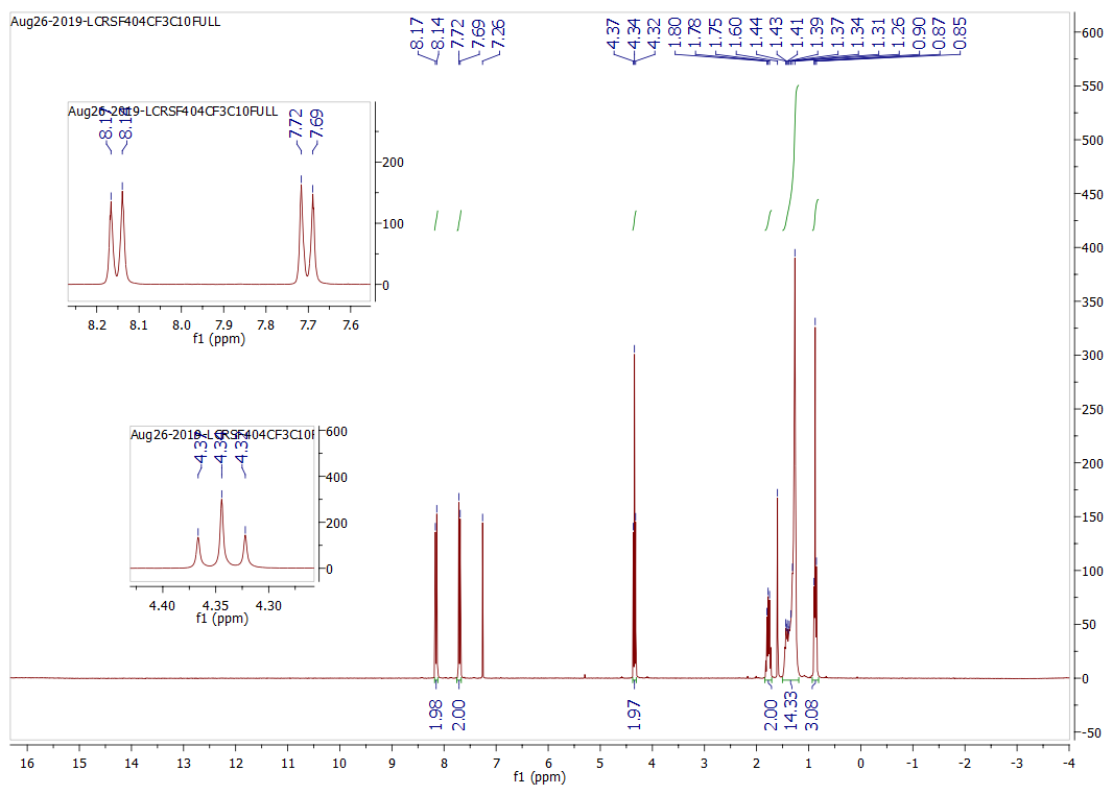
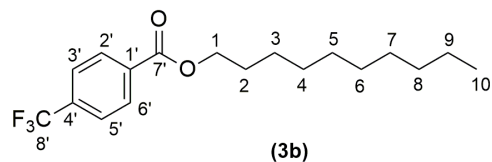


Figura 6.75. Espectro de ^1H RMN do composto **3b**.

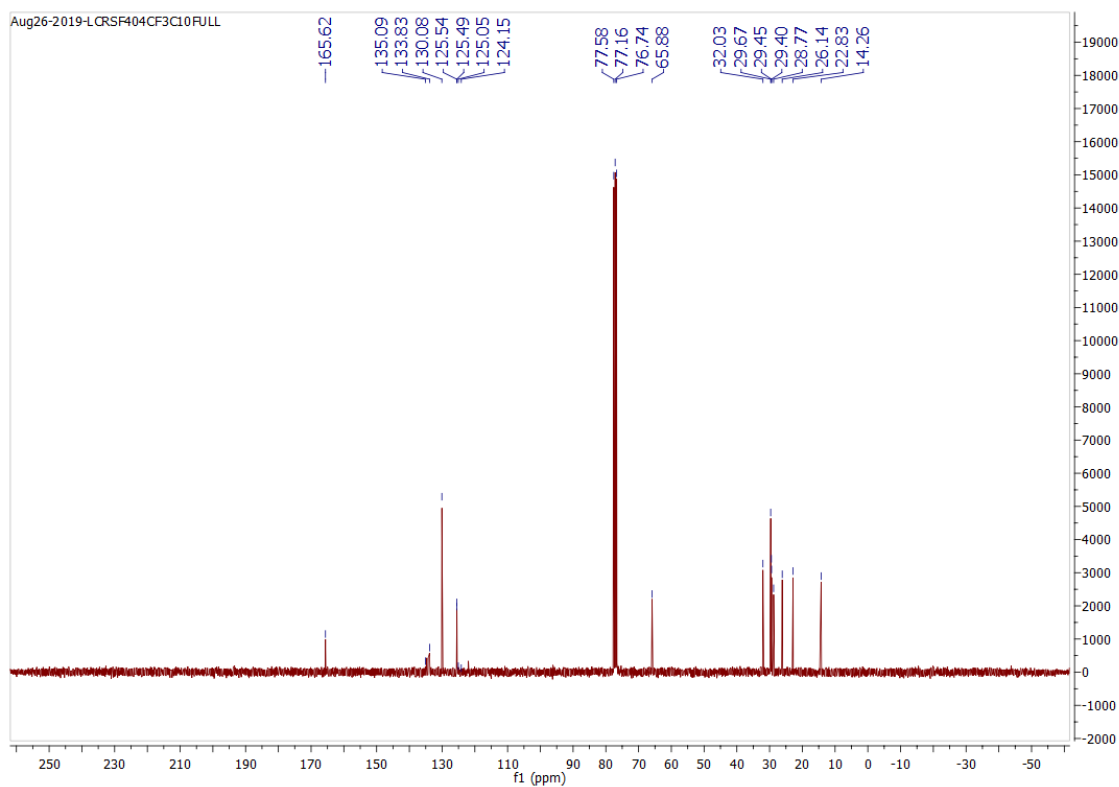


Figura 6.76. Espectro de ^{13}C RMN do composto **3b**.

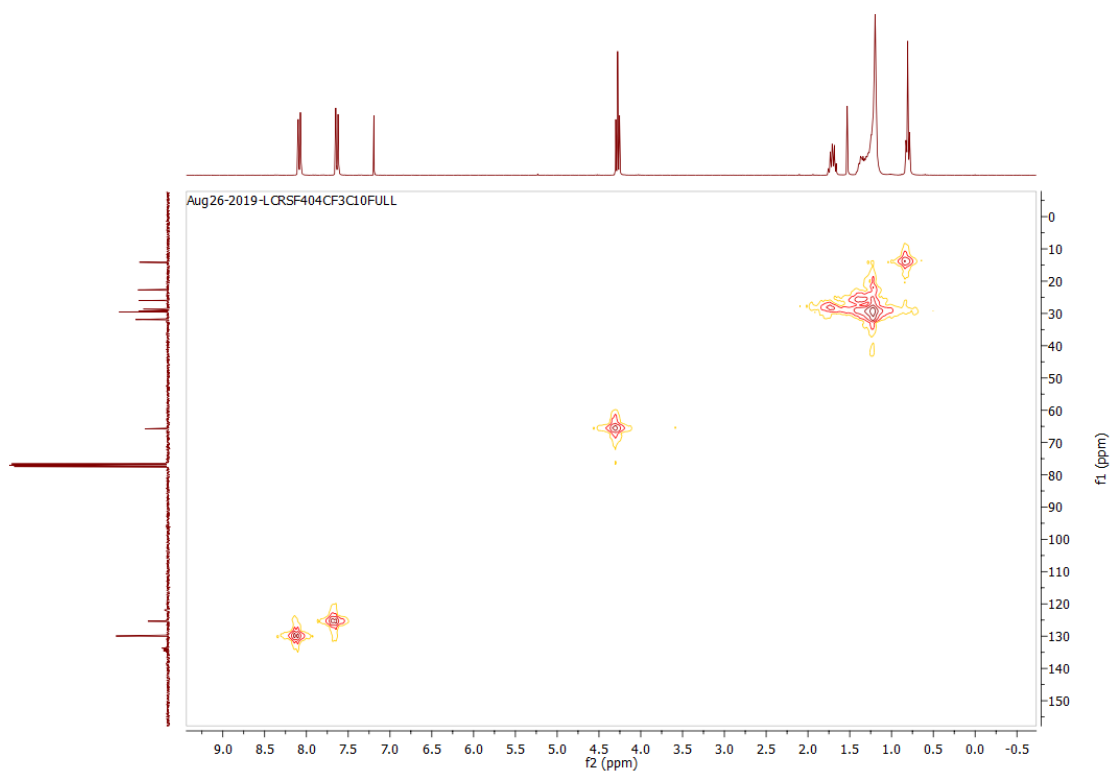


Figura 6.77. Espetro de HSQC do composto **3b**.

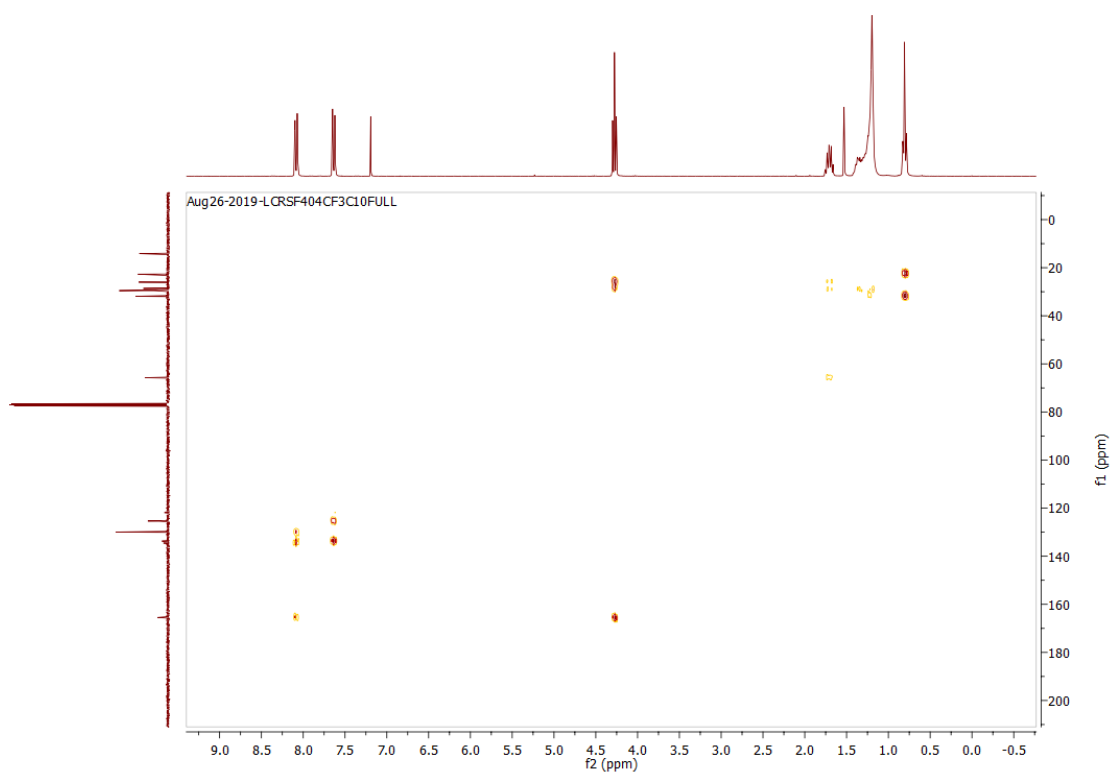


Figura 6.78. Espetro de HMBC do composto **3b**.

19. 3,5-di(trifluorometil)benzoato de decilo (**4a**)

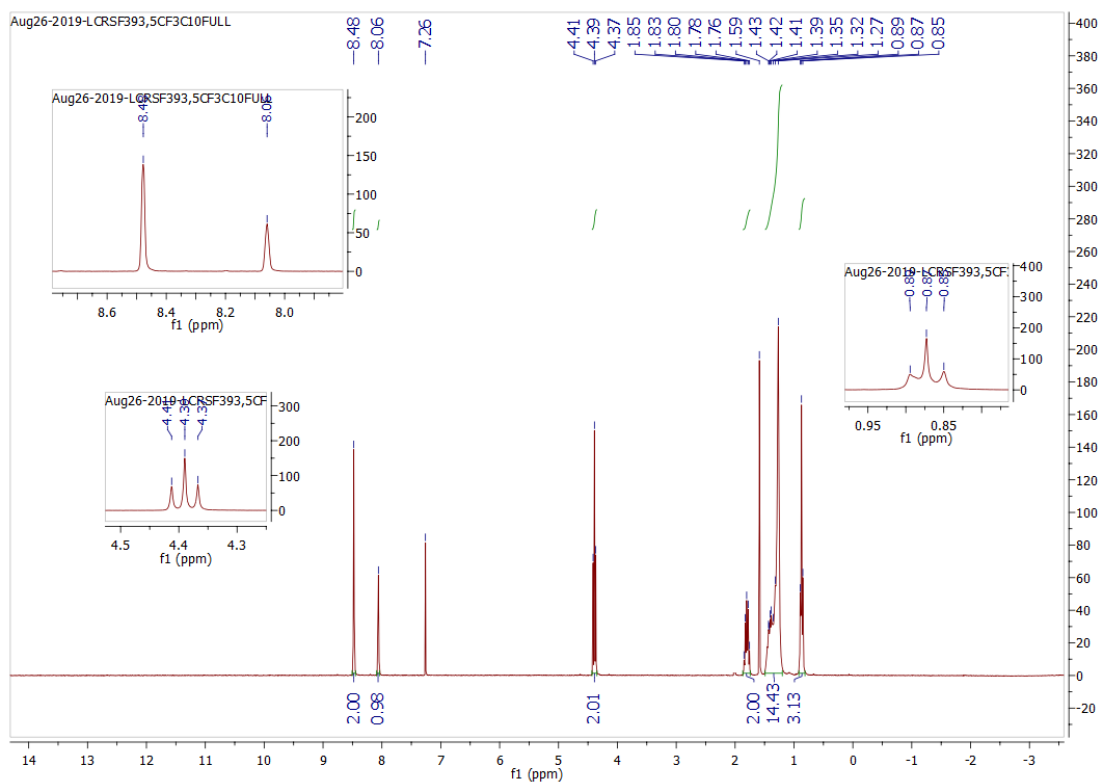
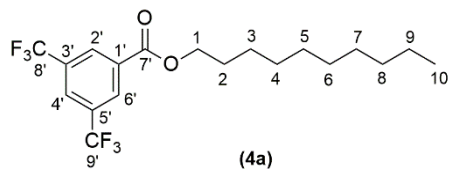


Figura 6.79. Espectro de ^1H RMN do composto **4a**.

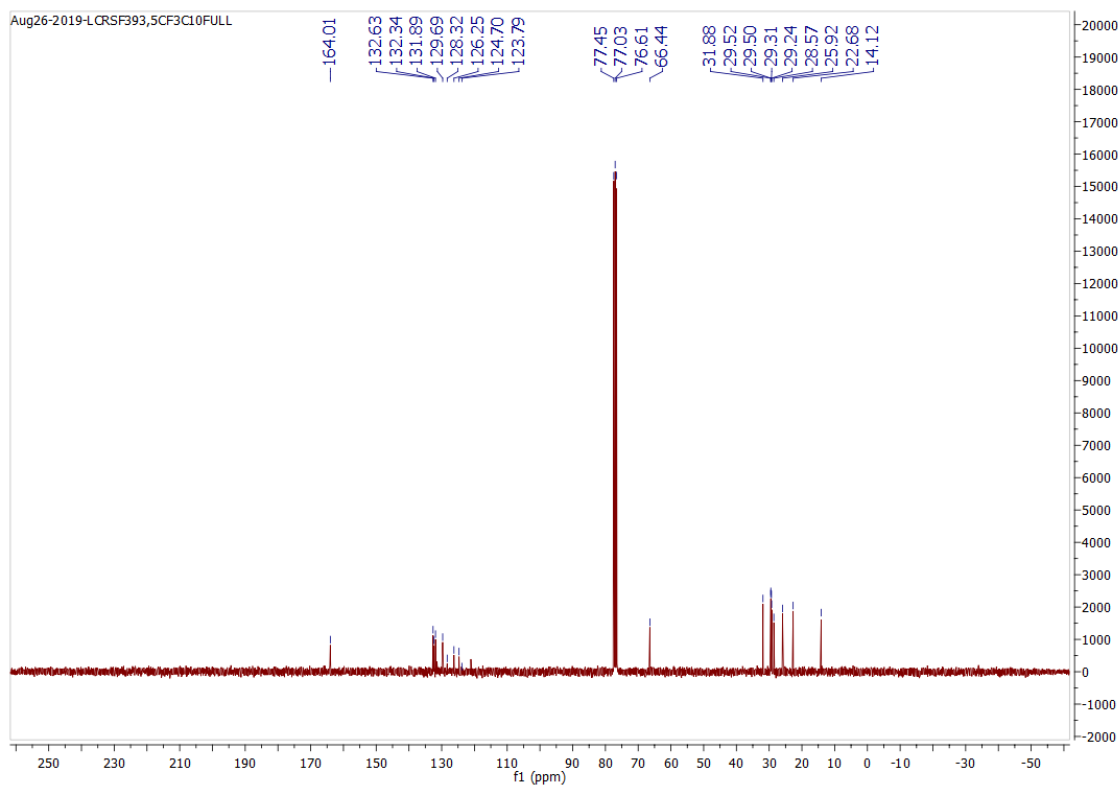


Figura 6.80. Espectro de ^{13}C RMN do composto **4a**.

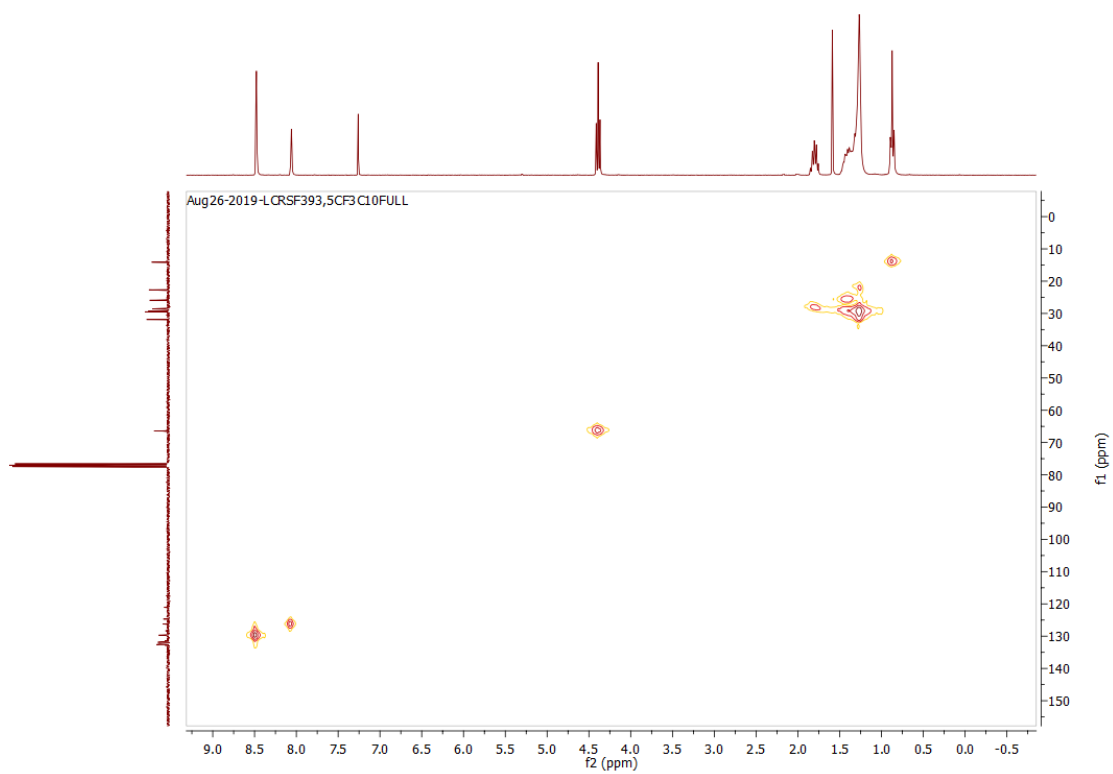


Figura 6.81. Espectro de HSQC do composto 4a.

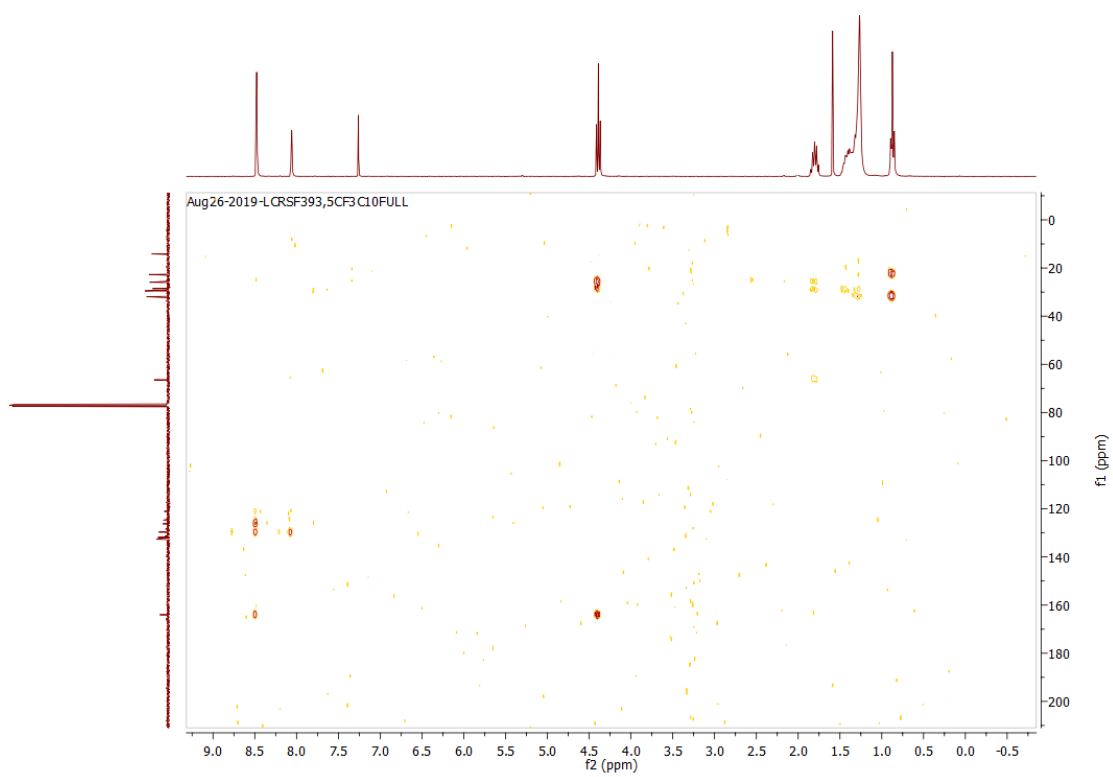


Figura 6.82. Espectro de HMBC do composto 4a.

20. 2,3,4,5,6-pentafluorobenzoato de decilo (**5a**)

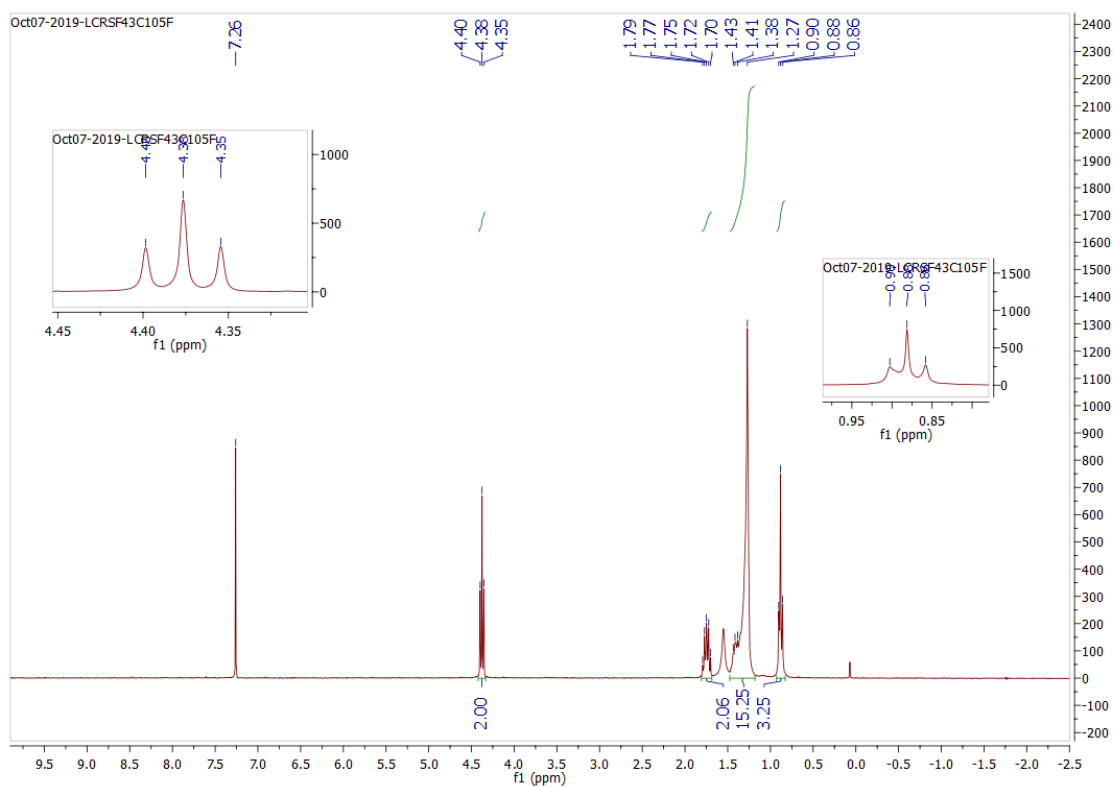
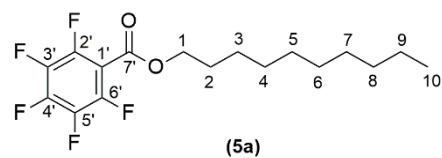


Figura 6.83. Espetro de ^1H RMN do composto **5a**.

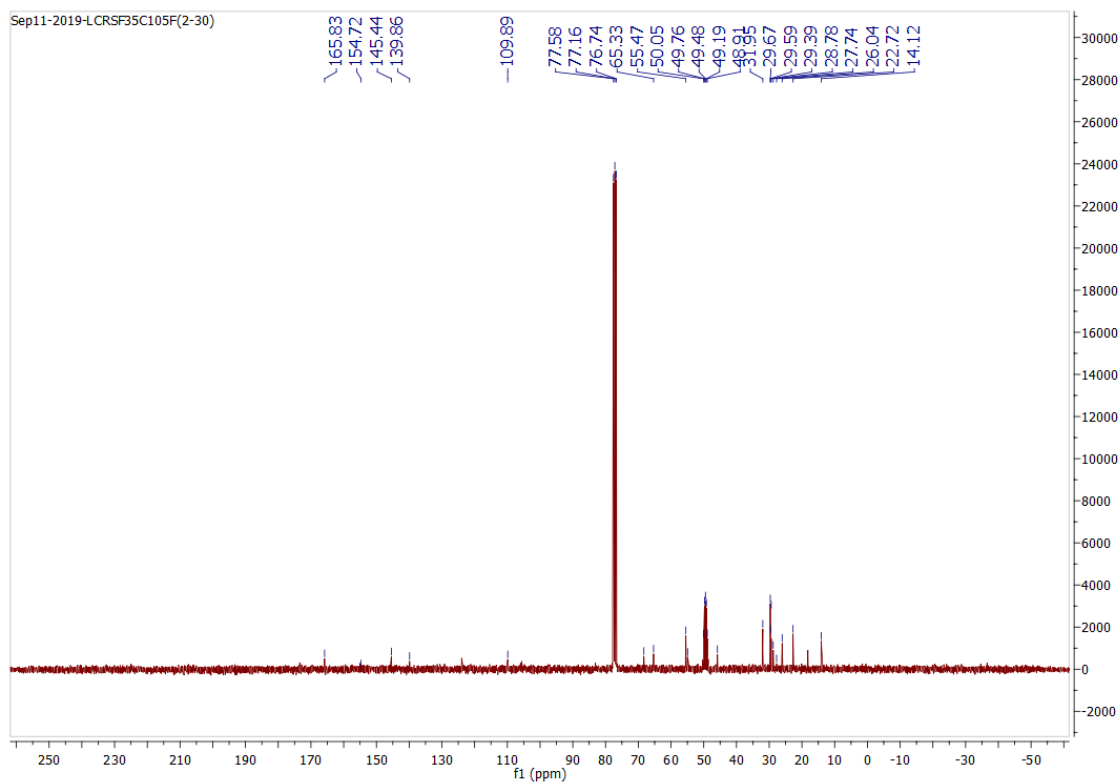


Figura 6.84. Espetro de ^{13}C RMN do composto **5a**.

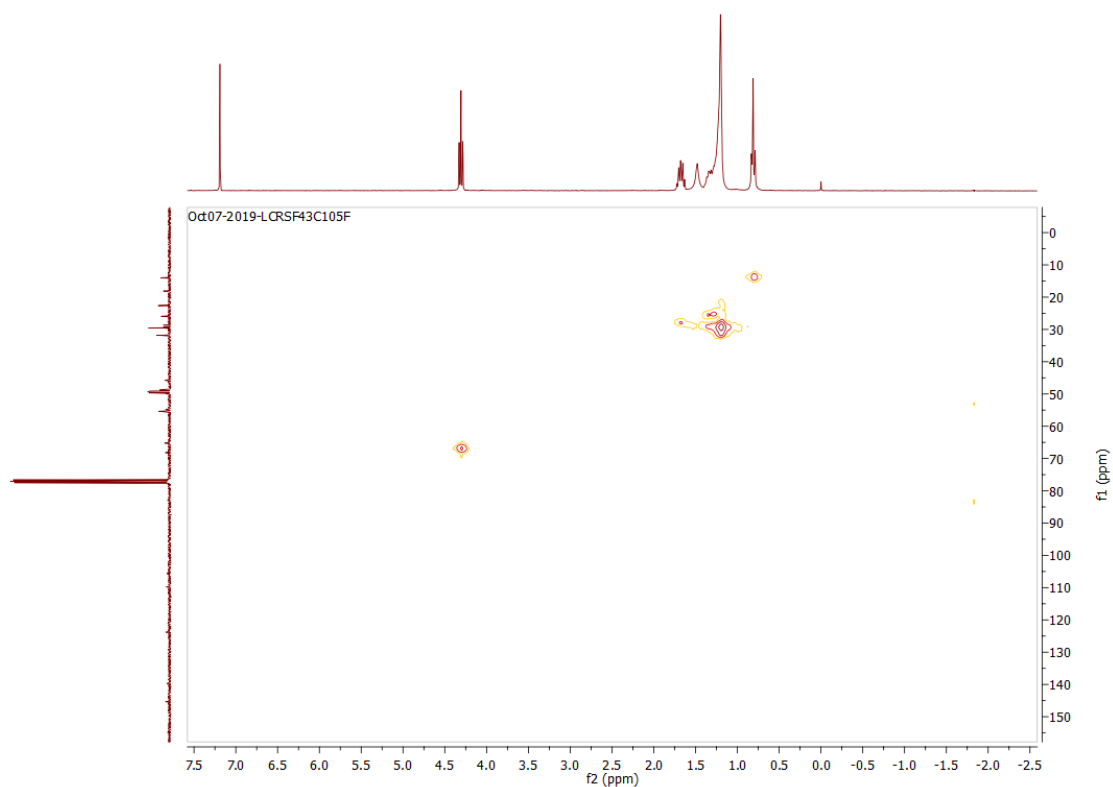


Figura 6.85. Espectro de HSQC do composto 5a.

Anexo 2. Estudos de Estabilidade

Anexo 2.1. Determinação do Comprimento de Onda para o Detetor UV de HPLC

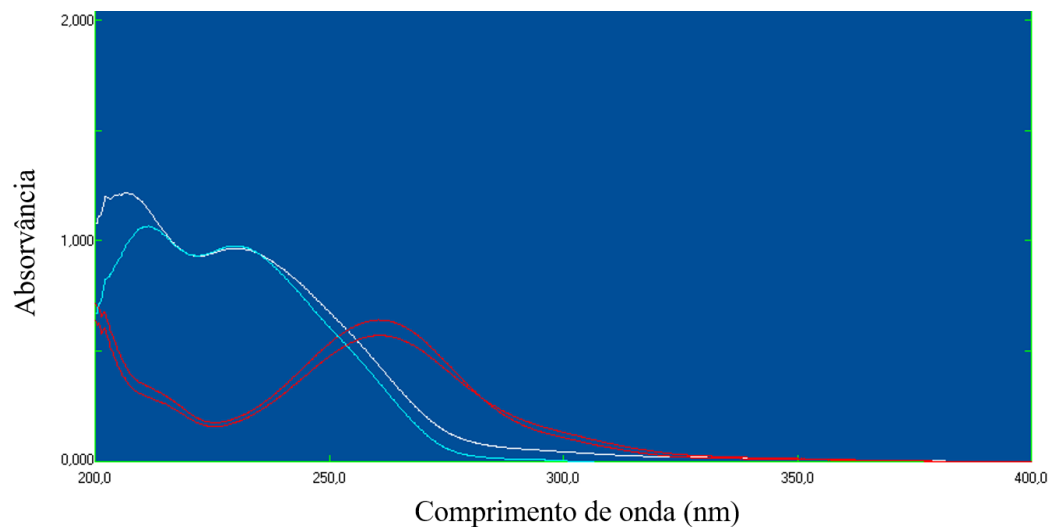


Figura 6.86. Determinação do comprimento de onda de absorção das soluções $2,5 \times 10^{-4} \text{M}$ do ácido 4-nitrobenzóico, **A** (vermelho: $\lambda = 255$) e do éster 4-nitrobenzoato de hexilo, **1d** (vermelho: $\lambda = 255$) e de ácido 3,5-dinitrobenzóico, **B** (branco: $\lambda = 230$) e do éster 3,5-dinitrobenzoato de hexilo, **2d** (azul: $\lambda = 230$).

Anexo 2.2. Curvas de Calibração em HPLC

Para quantificar as concentrações de éster e de ácido determinaram-se as curvas de calibração de concentração utilizando oito soluções padrão com concentrações 1×10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-4} M e 5×10^{-4} M (Tabela 6.1). As Figuras 6.87 e 6.88 representam as curvas de calibração de dois exemplos, o 4-nitrobenzoato de decilo, **1h**, e o 3,5-dinitrobenzoato de decilo, **2h**, respetivamente.

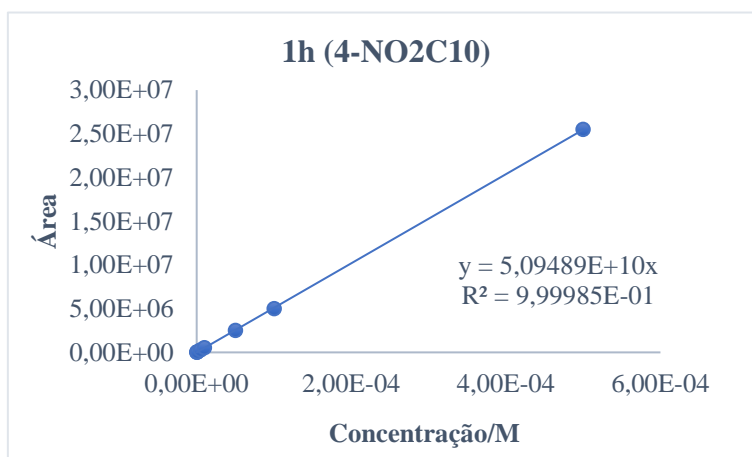


Figura 6.87. Exemplo de curva de calibração do éster 4-nitrobenzoato de decilo, **1h**, obtida através da análise por HPLC das soluções com concentrações 1×10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-4} M e 5×10^{-4} M.

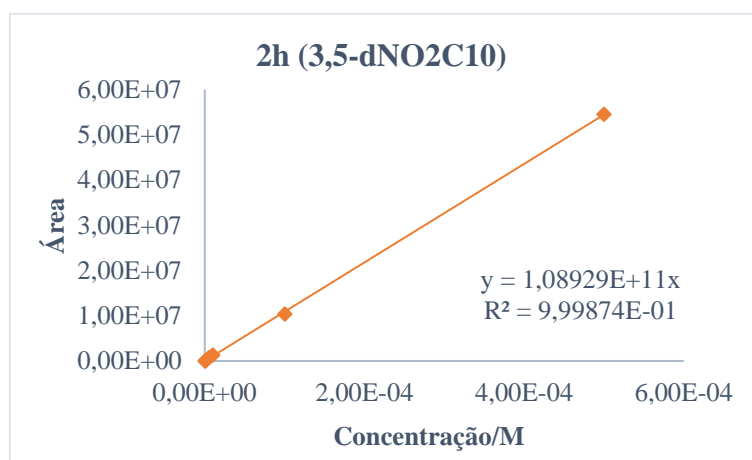


Figura 6.88. Exemplo de curva de calibração do éster 3,5-dinitrobenzoato de decilo, **2h**, obtida através da análise por HPLC das soluções com concentrações 1×10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-4} M e 5×10^{-4} M.

Tabela 6.1. Curvas de Calibração obtidas através da análise por HPLC das soluções com concentrações 1×10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-4} M e 5×10^{-4} M.

Composto	Curva de Calibração	Coefficiente de Correlação
A (4-NO ₂ COOH)	$y = 5,22055E+10x$	$R^2 = 9,98693E-01$
1b (4-NO ₂ C ₄)	$y = 6,86659E+10x$	$R^2 = 9,99675E-01$
1d (4-NO ₂ C ₆)	$y = 5,04392E +10x$	$R^2 = 9,98941E-01$
1f (4-NO ₂ C ₈)	$y = 6,13753E+10x$	$R^2 = 9,99553E-01$
1h (4-NO ₂ C ₁₀)	$y = 5,09489E+10x$	$R^2 = 9,99981E-01$
1j (4-NO ₂ C ₁₂)	$y = 5,38966E+10x$	$R^2 = 9,99826E-01$

1l (4-NO ₂ C14)	$y = 5,39032E +10x$	$R^2 = 9,99830E-01$
B (3,5- <i>d</i> NO ₂ COOH)	$y = 8,61088E+10x$	$R^2 = 9,99523E-01$
2b (3,5- <i>d</i> NO ₂ C4)	$y = 9,79555E+10x$	$R^2 = 9,99909E-01$
2d (3,5- <i>d</i> NO ₂ C6)	$y = 8,29989E+10x$	$R^2 = 9,99771E-01$
2f (3,5- <i>d</i> NO ₂ C8)	$y = 1,14858E+11x$	$R^2 = 9,99211E-01$
2h (3,5- <i>d</i> NO ₂ C10)	$y = 1,08929E+11x$	$R^2 = 9,99841E-01$
2j (3,5- <i>d</i> NO ₂ C12)	$y = 1,16584E+11x$	$R^2 = 9,99829E-01$
2l (3,5- <i>d</i> NO ₂ C14)	$y = 1,06324E+11x$	$R^2 = 9,99673E-01$

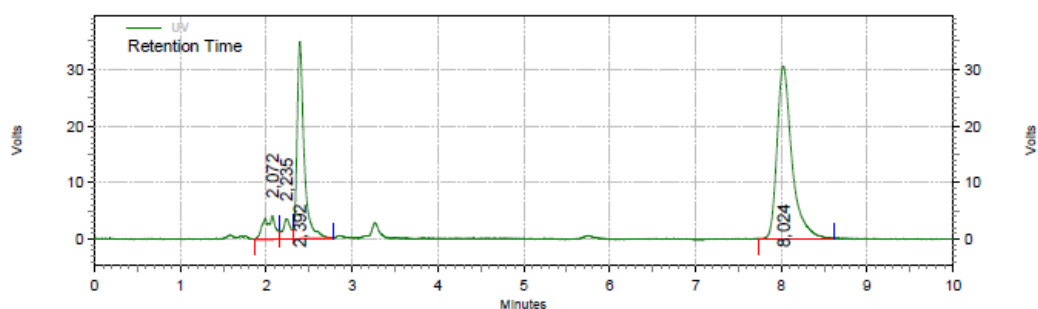
Nos ésteres **1c**, **1e**, **1g**, **1i**, **2c**, **2e**, **2g** e **2i** utilizou-se a média dos declives das curvas de calibração entre dois ésteres. Exemplo: declive do éster **2e** foi determinado pela média dos declives das curvas de calibração dos ésteres **2d** e **2f**.

Anexo 2.3. Cromatogramas em HPLC

A Figura 6.89 representa um exemplo de um cromatograma obtido na hidrólise enzimática do composto 4-nitrobenzoato de nonilo, **1g**, após 2h de reação. Os tempos de retenção do ácido e do éster encontram-se na Tabela 6.2.

Area % Report

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\4NC9 PLASMA\4NC9T33P
 Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\80_20_4NC8.met
 Acquired: 04-10-2019 2:38:51
 Printed: 04-10-2019 15:13:27



UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
2,072	153484	6,13	16801	5,73
2,235	83893	3,35	14427	4,92
2,392	785727	31,39	139559	47,63
8,024	1479935	59,13	122233	41,71
Totals	2503039	100,00	293020	100,00

Figura 6.89. Cromatograma do composto 4-nitrobenzoato de nonilo, **1g**, após 2h de reação de hidrólise enzimática.

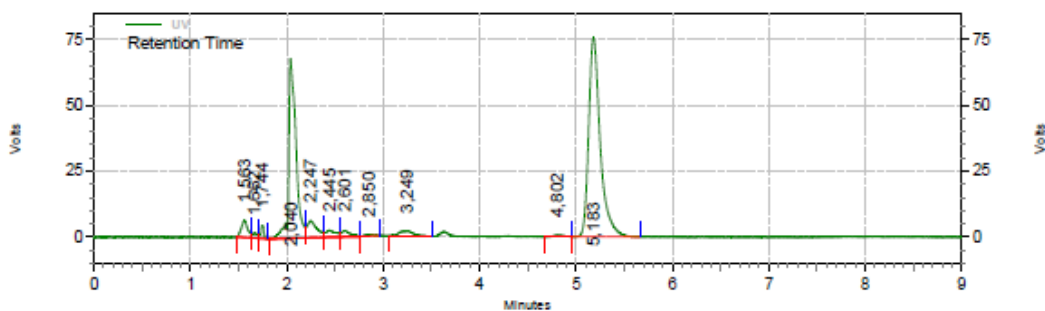
Tabela 6.2. Tempos de retenção do éster, **1g**, e do ácido 4-nitrobenzóico, **A**.

Composto	Tempo de Retenção
1g (4-NO ₂ C9)	8,024
A (4-NO ₂ COOH)	2,392

A Figura 6.90 representa um exemplo de um cromatograma obtido na hidrólise enzimática do composto 3,5-dinitrobenzoato de heptilo, **2e**, após 1h de reação. Os tempos de retenção do ácido e do éster encontram-se na Tabela 6.3.

Area % Report

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\PLASMA Raquel Freire\3,5NC7
 PLASMA\3,5NC7T33P
 Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\80_20_35NC3.met
 Acquired: 03-10-2019 3:15:47
 Printed: 03-10-2019 11:14:46



UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1,563	119589	2,63	25624	3,74
1,662	26730	0,59	7201	1,05
1,744	44974	0,99	19826	2,90
2,040	1406135	30,94	272240	39,78
2,247	186452	4,10	25503	3,73
2,445	73055	1,61	10680	1,56
2,601	61943	1,36	9609	1,40
2,850	13724	0,30	2441	0,36
3,249	82324	1,81	7645	1,12
4,802	18373	0,40	2458	0,36
5,183	2510836	55,25	301082	44,00

Totals	Area	Area %	Height	Height %
	4544135	100,00	684309	100,00

Figura 6.90. Cromatograma do composto 3,5-dinitrobenzoato de heptilo, **2e**, após 1h de reação de hidrólise enzimática.

Tabela 6.3. Tempos de retenção do éster, **2e**, e do ácido 3,5-dinitrobenzóico, **B**.

Composto	Tempo de Retenção
2e (3,5- <i>d</i> NO ₂ C7)	5,183
B (3,5- <i>d</i> NO ₂ COOH)	2,040