



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ORGÂNICA

SÍNTESE, DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS
FÍSICO-QUÍMICOS E
AVALIAÇÃO BIOLÓGICA
***IN VIVO* E *IN VITRO* DE COMPOSTOS DA CLASSE**
1,3,4-TIADIAZÓLIO

EDSON FERNANDES DA SILVA

Sob Orientação da Professora

Dr^a. Aurea Echevarria Aznar Neves Lima

e Co-orientação da Professora

Dr^a. Noema Faiga Grynberg

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências.

Seropédica, RJ

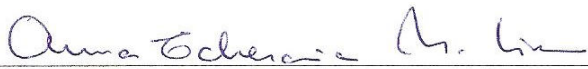
Maio de 2007

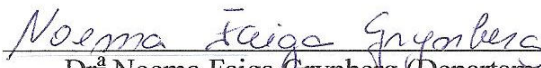
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

EDSON FERNANDES DA SILVA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, na área de Concentração em Química Orgânica.

TESE APROVADA EM ____ / ____ / ____


Dr.^a Aurea Echevarria Aznar Neves Lima (Departamento de Química - UFRRJ) - Orientadora


Dr.^a Noema Faiga Grynberg (Departamento de Química - UFRRJ) – Co-orientadora


Dr.^a Alice Maria Rolim Bernardino (Instituto de Química - UFF)


Dr. Carlos Mauricio R. Sant'Anna (Departamento de Química - UFRRJ)


Dr. João Batista Neves da Costa (Departamento de Química - UFRRJ)


Dr. Marcelo Genestra (Departamento de Imunologia - FIOCRUZ)


Dr.^a Marilene Canto-Cavalheiro (Departamento de Imunologia - FIOCRUZ)


Dr.^a Marcia Cristina C. de Oliveira (Departamento de Química - UFRRJ)

A DEUS pela minha filha Isabela e por tudo mais...

... e aos meus Pais (Luiz e Iracy).



...Hoje Estou com as Vestes e as Armas de Jorge

Para que Meus Inimigos Tendo Pés Não me Alcancem

Para que Meus Inimigos Tendo Mãos Não me Toquem

Para que Meus Inimigos Tendo Olhos Não me Vejam

Facas e Lanças se Quebrem Sem ao Meu Corpo Tocar

Cordas e Correntes se Rebentem Sem ao Meu Corpo Amarrar

Hoje Estou Feliz, Pois Também Sou da Sua Companhia ...

(oração a São Jorge)

AGRADECIMENTOS

À professora Aurea Echevarria, pela sua generosidade, compreensão, paciência, amizade, orientação e sua espiritualidade, sempre jovial.

À professora Noema Grynberg, pelo seu entusiasmo, disposição, incentivo, dedicação e co-orientação nesta tese.

À Cátia Valéria, pelo seu carinho e apoio.

Aos amigos Alexsandro Branco, Miguel Rascado, Raquel Garcia, Márcia Cristina e Javier Rincon pela amizade e aventuras extra-curriculares.

Aos colegas Paulo, Marco, Ana, Cláudio, Darí, Denise, Frances, Heloísa, Andressa, Carlão, Ruy, Eli, Fábio, Osmar, Renato, Reginaldo, Rubens e Aldir.

Ao colega Cláudio Eduardo pela ajuda espontânea com os espectros de RMN.

Ao camarada e sempre disponível, Maurício Lemos Matos.

Aos professores João Batista, Raimundo Braz, Marco Edílson, Victor, Maurício e a todos os outros pertencentes ao Programa de Pós-Graduação, que direta ou indiretamente participaram da minha formação acadêmica.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação e a todos os funcionários do ICE.

Às Dras. Leonor Leon e Marilene Canto-Cavalheiro (FIOCRUZ), pelos ensaios anti-*Leishmania*.

Ao professor Carlos Montanari (UFMG) e ao Dr. Marcelo Britto pela hospitalidade e ajuda.

À professora Rosane Nora Castro pela ajuda e dicas no cromatógrafo líquido de alta eficiência.

À professora Cecília (UFF) pelos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela experiência de vida e oportunidade de realizar este trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida.

À alegre e espirituosa Aurea Tatagiba (*in memorian*) pela amizade espontânea, e tendo a certeza de que o céu está mais divertido com sua presença.

Arrependo-me... daquilo que não realizei e das palavras que não pronunciei nos momentos oportunos.

Os erros que cometi... penso que foram necessários para o meu aprendizado e amadurecimento.

Mesmo assim... agradeço aos que me corrigiram e peço desculpas sinceras àqueles que magoei.

Edson

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

AcOEt - Acetato de etila

BuOH - Butanol

CDCl_3 – Clorofórmio deuterado

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

D - Debye

d - Duplete

dd - Duplo duplete

DEPT - Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

1,2-DiClEt - 1,2-dicloroetano

DL₅₀ - Dose letal de 50%

DMAC - N,N-dimetilacetamida

DMSO-d₆ – Dimetilsulfóxido deuterado

E_T - Energia de transição

EtO - etoxi

EtOH - Etanol

HIV – Human Immunodeficiency Virus (vírus da imunodeficiência humana)

HOMOCOSY - Homonuclear Correlation Spectroscopy

Hz - Hertz

IC₅₀ - Inibição do crescimento de 50%

ip – intra-peritoneal

IV - Infravermelho

J - Constante de acoplamento

k' – fator de capacidade

log k_w – valor obtido de log k' quando extrapolado a 100% da concentração da fase móvel

log P – logaritmo do coeficiente de partição

m – Multiplete

mL - mililitro

MeO - metoxi

MeOH - Metanol

MHz - Megahertz

nm - Nanômetro
n.o. – não observado
pf – ponto de fusão
Ph - fenil
PND - Proton Noise Decoupling
pip. – piperidina
py - piridina
2-PrOH - 2-propanol
QSAR – Quantitative Structure Activity Relationship
RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
s – simples
SDS – Lauril sulfato de sódio
SNC – Sistema Nervoso Central
TMS - Tetrametilsilano
UV - Ultravioleta
Vis. – Visível
t - tripleto
t. a. - Temperatura ambiente
δ - Deslocamento químico
ΔH – variação de entalpia
λ - Comprimento de onda
ν_{max.} - Frequência máxima
μ – Momento dipolar
μg – micrograma
μM - micromolar

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE TABELAS	xxi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xxiv
RESUMO	xxv
ABSTRACT	xxvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Compostos Meso-iônicos	1
1.1.1 Histórico e estrutura	1
1.1.2 Atividade biológica	7
1.2 O Câncer	8
1.2.1 Introdução	8
1.2.2 Tratamento e ação dos quimioterápicos	9
1.2.3 resistência aos quimioterápicos	12
1.2.4 As DNA-topoisomerasas	15
1.3 Leishmaniose	21
1.3.1 Introdução	21
1.3.2 Quimioterápicos	25
1.4 Correlação entre a Estrutura Química e Atividade Biológica	34
1.4.1 Parâmetros hidrofóbicos	34
1.4.1.1 Lipofilicidade	36
1.4.2 Parâmetros estereoeletrônicos	40
1.4.3 Parâmetros eletrônicos teóricos	42
1.5 Avaliação da Atividade Citotóxica por Colorimetria	44

2 OBJETIVOS	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 Material	49
3.1.1 Aparelhos	49
3.1.2 Reagentes e Solventes	49
3.1.3 Animais	52
3.2 Métodos	53
3.2.1 Síntese	53
3.2.1.1 Síntese da 1,4-difeniltiossemicarbazida	53
3.2.1.2 Síntese dos Ácidos <i>Trans</i> -X-cinâmicos	53
3.2.1.3 Síntese dos cloretos de cinamoíla substituídos	55
3.2.1.4 Síntese dos Cloretos de 4-fenil-5-[X-cinamoil] -1,3,4-tiadiazólio-2-[4-fenilamina]	55
3.2.1.4.1 Dados espectrométricos para os compostos mesoiônicos sintetizados	57
3.2.2 Ensaio com as DNA-topoisomerasas	74
3.2.2.1 DNA-topoisomerase II α	74
3.2.2.2 DNA-topoisomerase I	74
3.2.3 Ensaio colorimétrico para atividade citotóxica <i>in vitro</i> (MTT)	75
3.2.4 Ensaio para atividade anti-tumoral <i>in vivo</i>	85
3.2.5 Determinação do k' através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	85
3.2.6 Determinação dos parâmetros eletrônicos teóricos	87
3.2.7 Análise estatística	87
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
4.1 Síntese e Caracterização Estrutural	88

4.2 Estudo do Efeito Hidrofóbico	96
4.3 Cálculos Teóricos	100
4.4 Atividade Biológica	105
4.4.1 Atividades <i>in vitro</i>	105
4.4.1.1 Atividade citotóxica <i>in vitro</i> frente ao carcinoma de Ehrlich	105
4.4.1.2 Ensaio <i>in vitro</i> frente a DNA-topoisomerase II α	108
4.4.1.3 Ensaio <i>in vitro</i> frente a DNA-topoisomerase I	114
4.4.2 Atividade antitumoral <i>in vivo</i> frente ao carcinoma de Ehrlich	118
4.4.3 Atividade anti-Leishmania	121
4.5 Relação entre a Estrutura Química e Atividade Biológica	123
5 CONCLUSÃO	125
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
7 ANEXOS	138
7.1 Anexo de Produção Científica	138
7.2 Anexo de Espectros dos Sais dos Compostos Meso-iônicos	138

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Resumo de mecanismos e locais de ação de agentes quimioterápicos utilizados em doenças neoplásicas	10
FIGURA 2. Estruturas do paclitaxel (taxol) e seu mais potente análogo o docetaxel (taxotere).....	12
FIGURA 3. Secção transversal de um tumor sólido, mostrando a diminuição da concentração de oxigênio em relação à distância capilar.....	14
FIGURA 4. Barreiras que o agente antineoplásico deve vencer para alcançar as células em hipóxia (OLIVEIRA & ALVES, 2002).....	15
FIGURA 5. Moléculas de DNA circular que diferem em sua superelicoidização, onde W_r =torção. (A) Superelicoidização negativa ($W_r \sim -3$, dextrorsa). (B) Relaxada ($W_r=0$). (C) Superelicoidização positiva ($W_r \sim +3$, sinistrorsa) (STRYER, 1996).....	15
FIGURA 6. Esquema mostrando o número de ligações (Lk), número de giros (Tw) e o número de torções (Wr) de moléculas circulares de DNA	16
FIGURA 7. Reação catalisada pela DNA topoisomerase tipo α	18
FIGURA 8. Reação reversível de quebra (de apenas uma hélice) catalisada pela enzima DNA topoisomerase I eucariótica. Como indicado estas enzimas formam uma ligação covalente transitória com o DNA, de modo a permitir uma rotação livre nas pontes covalentes ligadas ao fosfato (em azul) (ALBERT <i>et al.</i> , 1997).....	19
FIGURA 9. Esquema mostrando a morte celular devido a formação do complexo ternário (em colchetes), que impede a replicação do DNA.....	20
FIGURA 10. Ciclo catalítico da topoisomerase II e modos de ação dos inibidores catalíticos (CAPRANICO, <i>et al.</i> , 1997).....	21
FIGURA 11. Distribuição de leishmaniose no mundo.....	22
FIGURA 12. Distribuição de áreas de co-infecção de leishmaniose visceral/HIV.....	23
FIGURA 13. Distribuição de leishmaniose no Brasil.....	23
FIGURA 14. Formas promastigota (esquerda) e amastigota (direita).....	24
FIGURA 15. Inseto (flebotomíneo) vetor da leishmaniose.....	24

FIGURA 16. Leishmaniose tegumentar cutânea (A) e mucocutânea (B); visceral (C).....	25
FIGURA 17. Rota de ação de algumas drogas anti-tripansomatídeos.....	31
FIGURA 18. As três fases importantes da ação dos fármacos.....	35
FIGURA 19. Bicamada lipídica das membranas biológicas.....	36
FIGURA 20. Determinação do coeficiente de partição (<i>P</i>) de uma substância.....	36
FIGURA 21. Modelo matemático que correlaciona a atividade de ácidos arilidroxâmicos sobre a enzima lipoxigenase.....	40
FIGURA 22. MTT sendo reduzido por célula viável e formando a formazana.....	45
FIGURA 23. Compostos testados no ensaio colorimétrico.....	76
FIGURA 24. Mecanismo de reação sugerido para obtenção dos ácidos cinâmicos.....	89
FIGURA 25. Mecanismo de reação sugerido para obtenção da 1,4-difeniltiosemicarbazida..	90
FIGURA 26. Mecanismo de reação sugerido para obtenção do cloreto de 4,5-difenil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina.....	91
FIGURA 27. Estrutura tridimensional otimizada do sal do composto mesoiônico não substituído.....	102
FIGURA 28. Estrutura tridimensional otimizada do sal do composto mesoiônico 2',4'-diF.....	103
FIGURA 29. Estrutura tridimensional otimizada do sal do composto mesoiônico 4'-F.....	103
FIGURA 30. Estrutura tridimensional otimizada do sal do composto mesoiônico 4'-OEt.....	104
FIGURA 31. Estrutura tridimensional otimizada do sal do composto mesoiônico 4'-OMe.....	104
FIGURA 32. Estrutura tridimensional otimizada do sal do composto mesoiônico 4'-NO ₂	105
FIGURA 33. Bio-redução do MTT na presença das enzimas desidrogenases para produzir a formazana.....	106
FIGURA 34. Gráfico ilustrando a comparação entre os valores de log(IC ₅₀) dos sais mesoiônicos frente a células do carcinoma de Ehrlich.....	108
FIGURA 35. Eletroforese em gel de agarose mostrando o ensaio com a topo II α e etoposida no relaxamento do kDNA. 1. kDNA, topo II e etoposida (100mM); 2. kDNA puro; 3. kDNA e topo II.....	109
FIGURA 36. Sais dos mesoiônicos ensaiados frente a topo II α	110

FIGURA 37. Eletroforese do ensaio com a topo II α : 1. kDNA puro; 2. kDNA e topo II α ; 7. kDNA, topo II e 4'-F (60 μ M); 8. kDNA, topo II e 4'-F (30 μ M); 9. kDNA, topo II e 2',4'-diF (120 μ M); 10. kDNA, topo II e 2',4'-diF (60 μ M); 11. kDNA, topo II e 2',4'-diF (30 μ M).....	111
FIGURA 38. Eletroforese do ensaio com topo II α : 1. kDNA + etoposida(50 μ M) + topo II (não apareceu); 2. kDNA + etoposida (100 μ M) + topo II; 3. kDNA puro; 4. kDNA + topo II; 5. H + kDNA + topo II; 6. 4'-Me + kDNA + topo II; 7. 4'-OMe + kDNA + topo II; 8. 4'-NO ₂ + kDNA + topo II; 9. 4'-OH + kDNA + topo II; 10. 3'-OMe + kDNA + topo II; 11. 3'-Br + kDNA + topo II.....	111
FIGURA 39. Eletroforese do ensaio com a topo II α : 1. kDNA puro; 2. kDNA + topo II α ; 9. kDNA, topo II e 3'-OMe (60 μ M); 10. kDNA, topo II e 3'-OMe (30 μ M).....	112
FIGURA 40. Eletroforese do ensaio com a topo II α : 1. kDNA puro; 2. kDNA + topo II α ; 3. 2',4'-diF (120 μ M), kDNA e topo II; 5. kDNA, topo II e 4'-OEt (120 μ M); 6. kDNA, topo II e 4'-OEt (60 μ M).....	112
FIGURA 41. Eletroforese do ensaio com a topo II α : 1. kDNA puro (com ATP); 2. kDNA + topo II; 3. 4'-Me (120 μ M) + kDNA + topo II; 4. 4'-Me (60 μ M) + kDNA + topo II; 5. 4'-Me (30 μ M) + kDNA + topo II; 6. 4'-OMe (120 μ M) + kDNA + topo II; 7. 4'-OMe (60 μ M) + kDNA + topo II; 8. 4'-OMe (30 μ M) + kDNA + topo II; 9. 3'-OMe (120 μ M) + kDNA + topo II; 10. 3'-OMe (60 μ M) + kDNA + topo II; 11. 3'-OMe (30 μ M) + kDNA + topo II.....	113
FIGURA 42. Eletroforese do ensaio com a topo II α : 1. kDNA puro (com ATP); 2. kDNA + topo II; 3. 2'-OMe (120 μ M) + kDNA + topo II; 4. 2'-OMe (60 μ M) + kDNA + topo II; 5. 2'-OMe (30 μ M) + kDNA + topo II; 6. 4'-CN (120 μ M) + kDNA + topo II; 7. 4'-CN (60 μ M) + kDNA + topo II; 8. 4'-CN (30 μ M) + kDNA + topo II; 9. 4'-OEt (120 μ M) + kDNA + topo II; 10. 4'-OEt (60 μ M) + kDNA + topo II; 11. 4'-OEt (30 μ M) + kDNA + topo II.....	114

FIGURA 43. Eletroforese do ensaio com a topo I: 1. Campotecina (25 μ M) + Φ x + topo I; 2. ACHP (120 μ M) + Φ x + topo I; 3. Φ x puro; 4. Φ x + topo I; 5. 4'-Cl (120 μ M) + Φ x + topo I; 6. 4'-F (120 μ M) + Φ x + topo I; 7. 4'-Br (120 μ M) + Φ x + topo I; 8. 2',4'-diF (120 μ M) + Φ x + topo I; 9. 3',4'-diCl (120 μ M) + Φ x + topo I; 10. 3'-Cl (120 μ M) + Φ x + topo I.....	115
FIGURA 44. Eletroforese do ensaio com a topo I: 1. Campotecina (25 μ M) + Φ x + topo I; 2. Φ x puro; 3. Φ x + topo I; H (120 μ M) + Φ x + topo I; 5. 4'-Me (120 μ M) + Φ x + topo I; 6. 4'-OMe (120 μ M) + Φ x + topo I; 7. 4'-NO ₂ (120 μ M) + Φ x + topo I; 8. 3'-Br (120 μ M) + Φ x + topo I; 9. 4'-OH (120 μ M) + Φ x + topo I; 10. 3'-OMe (120 μ M) + Φ x + topo I.....	116
FIGURA 45. Eletroforese do ensaio com a topo I: 1. Campotecina (25 μ M) + Φ x (0,125mg) + topo I; 2. Φ x puro; 3. Φ x + topo I; 4. 4'-OEt (120 μ M) + Φ x + topo I; 5. 4'-CN (120 μ M) + Φ x + topo I; 6. 2'-OMe (120 μ M) + Φ x + topo I; 7. VRB (120 μ M) + Φ x + topo I.....	117
FIGURA 46. Eletroforese do ensaio com a topo I: 1. Campotecina (25 μ M) + Φ x (0,125mg) + topo I; 2. Φ x puro; 3. Φ x + topo I; 4. 4'-OEt (120 μ M) + Φ x + topo I; 5. 2'-OMe (120 μ M) + Φ x + topo I; 6. 2'-OMe (60 μ M) + Φ x + topo I; 7. 2'-OMe (30 μ M) + Φ x + topo I.....	117
FIGURA 47. Espectro de IV para o derivado não substituído.....	139
FIGURA 48. Espectro de RMN ¹³ C-PND (50 MHz, DMSO-d ₆) do derivado não substituído.....	140
FIGURA 49. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆) do derivado não substituído.....	141
FIGURA 50. Espectro de IV para o derivado 4'-Me.....	142
FIGURA 51. Espectro de RMN ¹³ C-PND (50 MHz, CDCl ₃ e CD ₃ OD) para o derivado 4'-Me.....	143
FIGURA 52. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆) para o derivado 4'-Me.....	144
FIGURA 53. Espectro de IV para o derivado 4'-OMe.....	145
FIGURA 54. Espectro de RMN ¹³ C-PND (50 MHz, DMSO-d ₆) para o derivado 4'-OMe.....	146
FIGURA 55. Espectro de RMN ¹³ C-PND e RMN ¹³ C-DEPT (50 MHz, DMSO-d ₆) para o derivado 4'-OMe.....	147

FIGURA 56. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-OMe.....	148
FIGURA 57. Espectro de IV para o derivado 4'-NO $_2$	149
FIGURA 58. Espectro de RMN ^{13}C -PND (75 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-NO $_2$	150
Figura 59. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (75 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-NO $_2$	151
FIGURA 60. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-NO $_2$	152
FIGURA 61. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) expandido para o derivado 4'-NO $_2$	153
FIGURA 62. Espectro de IV para o derivado 4'-F.....	154
FIGURA 63. Espectro de RMN ^{13}C -PND (75 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-F.....	155
FIGURA 64. Espectro de RMN ^{13}C -PND (75 MHz, DMSO- d_6) expandido para o derivado 4'-F.....	156
FIGURA 65. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-F.....	157
FIGURA 66. Espectro de RMN -2D ^1H X ^1H HOMOCOSY (300 MHz, DMSO- d_6) expandido para o derivado 4'-F.....	158
FIGURA 67. Espectro de IV para o derivado.4'-Cl.....	159
FIGURA 68. Espectro de RMN ^{13}C -PND (75 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-Cl.....	160
FIGURA 69. Espectro de RMN ^{13}C -PND (75 MHz, DMSO- d_6) expandido para o 4'-Cl.....	161
FIGURA 70. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-Cl.....	162
FIGURA 71. Espectro de RMN -2D ^1H X ^1H HOMOCOSY (300 MHz, DMSO- d_6) expandido para o derivado 4'-Cl.....	163
FIGURA 72. Espectro de IV para o derivado 4'-CN.....	164
FIGURA 73. Espectro de RMN ^{13}C -PND (50 MHz, CDCl $_3$ e CD $_3$ OD) para o derivado 4'-CN.....	165
FIGURA 74. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-CN.....	166
FIGURA 75. Espectro de IV para o derivado 4'-Br.....	167
FIGURA 76. Espectro de RMN ^{13}C -PND (50 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-Br.....	168
FIGURA 77. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-Br.....	169

FIGURA 78. Espectro de RMN $-2D^1H \times ^1H$ HOMOCOSY (200 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-Br.....	170
FIGURA 79. Espectro de IV para o derivado 4'-OEt.....	171
FIGURA 80. Espectro de RMN ^{13}C -PND (50 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-OEt.....	172
FIGURA 81. Espectro de RMN 1H (200 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-OEt.....	173
FIGURA 82. Espectro de RMN $-2D^1H \times ^1H$ HOMOCOSY (200 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-OEt.....	174
FIGURA 83. Espectro de IV para o derivado 4'-OH.....	175
FIGURA 84. Espectro de RMN ^{13}C -PND (50 MHz, $CDCl_3$ e CD_3OD) para o derivado 4'-OH.....	176
FIGURA 85. Espectro de RMN 1H (200 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 4'-OH.....	177
FIGURA 86. Espectro de IV para o derivado 3'-OMe.....	178
FIGURA 87. Espectro de RMN ^{13}C -PND (50 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 3'-OMe.....	179
FIGURA 88. Espectro de RMN 1H (200 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 3'-OMe.....	180
FIGURA 89. Espectro de IV para o derivado 3'-NO $_2$	181
FIGURA 90. Espectro de RMN ^{13}C -PND (50 MHz, $CDCl_3$ e CD_3OD) para o derivado 3'-NO $_2$	182
FIGURA 91. Espectro de IV para o derivado 3'-Cl.....	183
FIGURA 92. Espectro de RMN ^{13}C -PND (50 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 3'-Cl.....	184
FIGURA 93. Espectro de RMN 1H (200 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 3'-Cl.....	185
FIGURA 94. Espectro de RMN $-2D^1H \times ^1H$ HOMOCOSY (200 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 3'-Cl.....	186
FIGURA 95. Espectro de IV para o derivado 3'-Br.....	187
FIGURA 96. Espectro de RMN ^{13}C -PND (50 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 3'-Br.....	188
FIGURA 97. Espectro de RMN 1H (200 MHz, DMSO- d_6) para o derivado 3'-Br.....	189
FIGURA 98. Espectro de RMN ^{13}C -PND (50 MHz, $CDCl_3$ e DMSO- d_6) para o derivado 2'-OMe.....	190
FIGURA 99. Espectro de RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) para o derivado 2'-OMe.....	191
FIGURA 100. Espectro de IV para o derivado 2',4'-diF.....	192
FIGURA 101. Espectro de RMN ^{13}C -PND (50 MHz, $CDCl_3$ e DMSO- d_6) para o derivado 2',4'-diF.....	193

FIGURA 102. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) para o derivado 2',4'-diF.....	194
FIGURA 103. Espectro de IV para o derivado 3',4'-diCl.....	195
FIGURA 104. Espectro de RMN ^{13}C -PND (50 MHz, CDCl_3 e CD_3OD) para o derivado 3',4'-diCl.....	196
FIGURA 105. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 e CD_3OD) para o derivado 3',4'-diCl.....	197

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Pontos de fusão e rendimentos obtidos para os ácidos <i>trans</i> -X-cinâmicos	54
Tabela 2. Pontos de fusão e rendimentos obtidos para os sais dos compostos mesoiônicos...	56
Tabela 3. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = H	57
Tabela 4. Dados de RMN ¹ H para o mesoiônico com X = H	57
Tabela 5. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = 4'-Me	58
Tabela 6. Dados de RMN ¹ H para o mesoiônico com X = 4'-Me.....	58
Tabela 7. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = 4'-OMe.....	59
Tabela 8. Dados de RMN ¹ H para o mesoiônico com X = 4'-OMe.....	59
Tabela 9. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = 4'-NO ₂	60
Tabela 10. Dados de RMN ¹ H para o mesoiônico com X = 4'-NO ₂	60
Tabela 11. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = 4'-F	61
Tabela 12. Dados de RMN ¹ H para o mesoiônico com X = 4'-F	61
Tabela 13. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = 4'-Cl	62
Tabela 14. Dados de RMN ¹ H para o mesoiônico com X = 4'-Cl	62
Tabela 15. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = 4'-CN	63
Tabela 16. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = 4'-Br	64
Tabela 17. Dados de RMN ¹ H para o mesoiônico com X = 4'-Br	64
Tabela 18. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = 4'-OEt.....	65
Tabela 19. Dados de RMN ¹ H para o mesoiônico com X = 4'-OEt.....	65
Tabela 20. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = 4'-OH	66
Tabela 21. Dados de RMN ¹ H para o mesoiônico com X = 4'-OH	66
Tabela 22. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = 3'-OMe.....	67
Tabela 23. Dados de RMN ¹ H para o mesoiônico com X = 3'-OMe.....	67
Tabela 24. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = 3'-NO ₂	68
Tabela 25. Dados de RMN ¹ H para o mesoiônico com X = 3'-NO ₂	68
Tabela 26. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = 3'-Cl	69
Tabela 27. Dados de RMN ¹ H para o mesoiônico com X = 3'-Cl	69
Tabela 28. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = 3'-Br.....	70
Tabela 29. Dados de RMN ¹ H para o mesoiônico com X = 3'-Br	70
Tabela 30. Dados de RMN ¹³ C para o mesoiônico com X = 2'-OMe.....	71

Tabela 31. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 2'-OMe.....	71
Tabela 32. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 2',4'-diF.....	72
Tabela 33. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 2',4'-diF.....	72
Tabela 34. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 3',4'-diCl.....	73
Tabela 35. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 3',4'-diCl.....	73
Tabela 36. Preparação de soluções em <i>eppendorf</i> para análise em gel de agarose.....	74
Tabela 37. Preparação de soluções em <i>eppendorf</i> para análise em gel de agarose.....	75
Tabela 38. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=4'-OEt.....	76
Tabela 39. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=4'-F.....	76
Tabela 40. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=4'-Cl.....	77
Tabela 41. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=4'-Br.....	77
Tabela 42. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=3',4'-diCl.....	77
Tabela 43. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=2',4'-diF.....	78
Tabela 44. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=2'-OMe.....	78
Tabela 45. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=3'-Br.....	78
Tabela 46. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=3'-Cl.....	79
Tabela 47. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=4'-OH.....	79
Tabela 48. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=3'-OMe.....	79
Tabela 49. Tempos de retenção para os sais derivados dos mesoiônicos obtidos por CLAE.....	86

Tabela 50. Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^1H dos sais mesoiônicos.....	92
Tabela 51. Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ^{13}C dos sais mesoiônicos.....	95
Tabela 52. Valores de $\log k'$ calculados em diferentes proporções da fase aquosa: tampão para os compostos mesoiônicos em estudo.....	97
Tabela 53. Equações obtidas por regressão linear dos gráficos $\log k'$ versus % tampão para os derivados mesoiônicos.....	98
Tabela 54. Valores de $\log k_w$ obtidos por extrapolação para 100% da fase aquosa, utilizando-se as equações da Tabela 53, para os derivados mesoiônicos.....	99
Tabela 55. valores obtidos de cálculos semi-empíricos PM3, com palavras chaves: nolog, nointer precise, grad, xyz, ef, hess=1, charge=1.....	100
Tabela 56. Valores obtidos de cálculos semi-empíricos, utilizando o hamiltoniano PM3, para os mesoiônicos (bases livres BL).....	101
Tabela 57. Valores dos coeficientes de correlação das equações para obtenção dos IC_{50} (μM) dos sais dos mesoiônicos frente a células do carcinoma de Ehrlich.....	107
Tabela 58. Resultados da ação dos mesoiônicos sobre a topoisomerase II- α	110
Tabela 59. Resultados da atividade anti-tumoral <i>in vivo</i> dos derivados mesoiônicos frente ao carcinoma de Ehrlich.....	119
Tabela 60. Valores de IC_{50}^a (μM) dos sais de compostos mesoiônicos contra <i>L. amazonensis</i>	122

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Absorbância obtida com a solução de MTT frente a células de Ehrlich.....	46
GRÁFICO 2. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 4'-OEt.....	80
GRÁFICO 3. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 4'-F.....	80
GRÁFICO 4. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 4'-Cl.....	81
GRÁFICO 5. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 4'-Br.....	81
GRÁFICO 6. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 3',4'-diCl.....	82
GRÁFICO 7. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 2',4'-diF.....	82
GRÁFICO 8. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 2'-OMe.....	83
GRÁFICO 9. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 3'-Br.....	83
GRÁFICO 10. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 3'-Cl.....	84
GRÁFICO 11. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 4'-OH.....	84

RESUMO

Os compostos mesoiônicos são heterociclos com estrutura dipolar. Esses compostos têm apresentado bastante interesse devido à sua diversificada atividade biológica, e também por sua utilização como novos materiais e corantes, entre outras.

Neste trabalho de tese foram sintetizados 17 sais de compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio, sendo 7 novos. A metodologia utilizada envolveu a reação de acilação anidra da 1,4-difenil-tiossemicarbazida na presença de cloretos de cinamoila-substituídos. Esses compostos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas, como RMN de ^1H e ^{13}C e infravermelho.

Ensaio de quimiossensibilidade frente a células do carcinoma de Ehrlich foram realizados, indicando significativa atividade citotóxica para os sais dos compostos mesoiônicos, sendo o mais ativo o 4'-OEt-substituído dentre aqueles sintetizados neste trabalho.

Os mesoiônicos sintetizados foram submetidos à ensaios com as enzimas DNA-topoisomerasas I e II- α , onde vários mostraram-se inibidores das mesmas, principalmente em relação a Topo II- α .

Avaliou-se, também, a atividade antitumoral *in vivo* em camundongos com carcinoma de Ehrlich, obtendo-se resultados bastante promissores e satisfatórios para os derivados mesoiônicos cloro e fluoro-substituídos.

Parâmetros físico-químicos foram determinados para estudo das relações entre a atividade biológica e a estrutura química (QSAR). O parâmetro hidrofóbico $\log k'$ foi determinado experimentalmente para todos os compostos sintetizados, utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os parâmetros eletrônicos teóricos foram calculados através da modelagem molecular para todos os compostos da série. Suas estruturas foram otimizadas utilizando o método semi-empírico através do programa MOPAC 6.0, onde o Hamiltoniano de escolha foi o PM3.

Sais de compostos mesoiônicos, num total de 14, também foram ensaiados *in vitro* contra *L. amazonensis* no Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, tendo-se mostrado bastante promissores para a quimioterapia da leishmaniose.

O estudo da correlação entre a atividade biológica e os parâmetros físico-químicos mostrou que os efeitos hidrofóbicos ($\log k'$ e π) e eletrônico de ressonância (R) contribuíram mais significativamente para a atividade citotóxica.

ABSTRACT

Mesoionic compounds are heterocycles with dipolar structure. They have been considered interesting because of their several biological activities and other applications, such as new materials and dyes.

In this work were synthesized 17 salts of mesoionic compounds from the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class, in which 7 are new compounds. The synthetic methodology involved the anhydroacylation reaction of 1,4-thiosemicarbazide with substituted cinnamoyl chlorides. These compounds were characterized by spectroscopic techniques such NMR ^1H , ^{13}C and infrared.

Chemosensitivity assays against Ehrlich carcinoma cells showed significant cytotoxic activity for mesoionic salts, and the 4'-OEt derivative was the most active synthesized compound.

The mesoionic compounds had been assayed with DNA-topoisomerases I and II α enzymes, several derivatives showed inhibitory activity especially on DNA-topoisomerase II α .

Very promising and satisfactory results were observed for chloro and fluor-derivatives when the *in vivo* anti-tumour activity was evaluated on mice with Ehrlich carcinoma.

The physico-chemical parameters were determined to aim the quantitative-structure relationship (QSAR) study. The hydrophobic parameter, $\log k'$, was experimentally determined for mesoionic compounds using the high performance liquid chromatography (HPLC) method.

The electronic theoretical parameters were calculated using semi-empirical molecular orbital methods for all series derivatives. Their structures were optimized using the MOPAC 6.0 package and PM3 Hamiltonian.

The mesoionic salts (14) were also assayed *in vitro* against *Leishmania amazonensis* in Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos – FIOCRUZ, and very promising results for leishmaniasis chemotherapy have been observed.

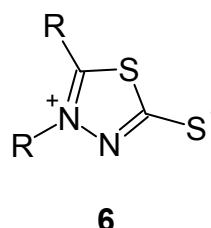
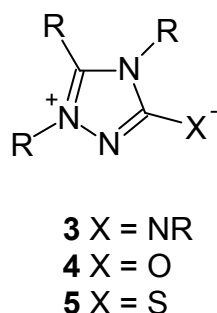
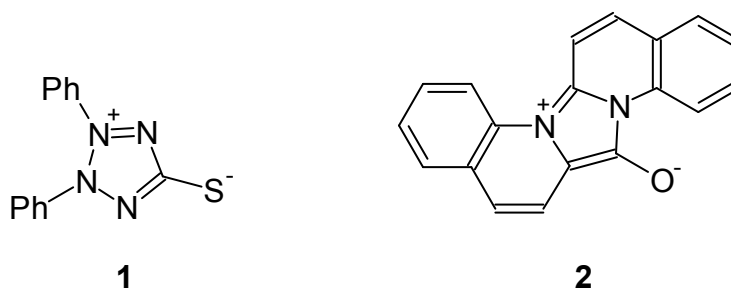
The QSAR study indicated that the hydrophobic parameters ($\log k'$ and π) and resonance electronic effect (R) were the most significant contribution to the cytotoxic activity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Compostos Meso-iônicos

1.1.1 Histórico e estrutura

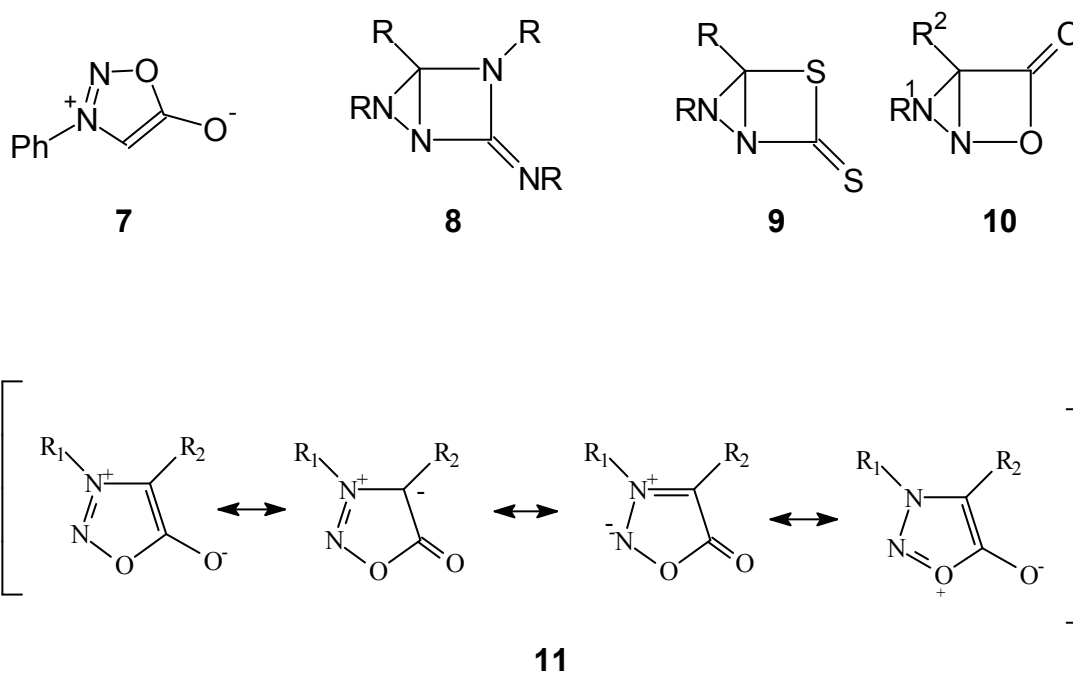
Em 1882, Emil Fisher e Emil Besthorn sintetizaram o composto (1) conhecido atualmente como meso-iônico. Subseqüentemente, Besthorn descobriu o corante vermelho de Besthorn (2). Despertado pelo trabalho inicial de Fischer, Max Busch, no decorrer de 1895 a 1905, descreveu a preparação e propriedades químicas de alguns compostos meso-iônicos (3-6) (NEWTON & RAMSDEN, 1982).



Earl e Mackney, em 1935, prepararam a N-fenilsidnona (7), primeira sidnona sintetizada (sendo a precursora dos sistemas atuais 1,2,3-oxadiazólio-5-olato), recebendo essa designação por ter sido sintetizada na Universidade de Sydney, Austrália (NEWTON & RAMSDEN, 1982).

No ano de 1938, Schönberg propôs que os compostos 8 e 9, que tinham sido formulados como compostos bicíclicos por Busch, fossem híbridos de ressonância dipolar, 3 e

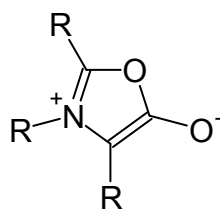
6 (NEWTON & RAMSDEN, 1982). Da mesma forma, Baker e Ollis em 1946, consideraram a estrutura da sidnona, até então representada como uma β -lactama (**10**), como inaceitável e propuseram que as sidnonas também fossem híbridos de ressonância de formas dipolares (**11**) (KIER & ROCHE, 1967).



Ainda em 1946, o termo mesoiônico (mesomérico + iônico) foi sugerido pela primeira vez por Simpson, para descrever um tipo de molécula que “desafiase” a representação covalente. Em 1957, Baker e Ollis (BAKER & OLLIS, 1957) propuseram a primeira definição para composto mesoiônico:

- (a) O composto deveria possuir um anel aromático heterocíclico de cinco ou seis membros que não fosse capaz de ser representado por uma estrutura covalente;
- (b) Todos os átomos do anel proveriam elétrons π , para formar um sexteto deslocalizado;
- (c) O anel deveria apresentar uma carga positiva parcial, balanceada por uma negativa localizada em um grupo ou átomo exocíclico;
- (d) O anel deveria ser planar ou quase, possuindo considerável energia de ressonância.

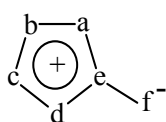
Esta definição formou a base para o conceito de composto mesoiônico nos atuais relatos da literatura. Após 1964, devido aos trabalhos de Huisgen (NEWTON & RAMSDEN, 1982) com munchonas (**12**), os compostos mesoiônicos foram extensivamente estudados nas duas décadas posteriores.



12

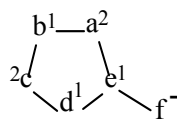
Na década de 90 estudos sobre as características dos compostos mesoiônicos continuaram a ser estudadas, sendo caracterizados também por possuir caráter aromático e constituir um plano ou quase, juntamente com o átomo α -exocíclico (HAMAGUCHI *et al.*, 2003) e substancial separação de cargas, com momentos dipolares em torno de 5 D (ECHEVARRIA *et al.*, 1992).

Conforme a definição, os mesoiônicos apresentam-se representados pela fórmula geral **13**, onde a-f são átomos de carbono ou heteroátomos. Segundo a distribuição de elétrons no anel, podemos ter dois tipos de mesoiônicos: Tipo A (**14**) e Tipo B (**15**), onde os números sobrescritos correspondem ao número de elétrons com que cada átomo contribui para formar os orbitais π .



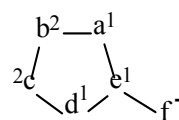
Fórmula Geral

13



Tipo A

14

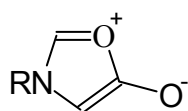


Tipo B

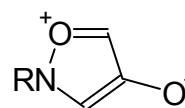
15

Usando combinações de átomos de carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre, é possível formar 144 classes de mesoiônicos do tipo A e 84 classes do tipo B. Até recentemente, 60 classes do tipo A e 13 do tipo B eram conhecidas (NEWTON & RAMSDEN, 1982).

Mesoiônicos do tipo A e B são exemplificados pelos 1,3-oxazólio-5-olato (**16**) e 1,2-oxazólio-4-olato (**17**), respectivamente. Os dois tipos gerais de compostos mesoiônicos mostram propriedades químicas totalmente distintas.

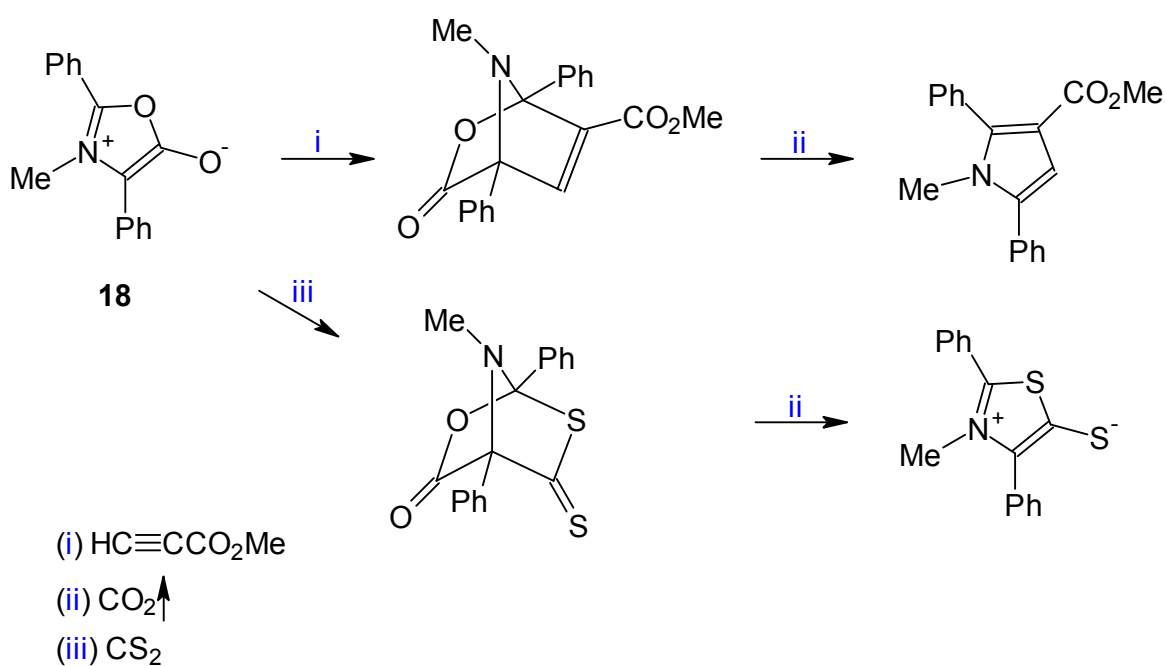


16



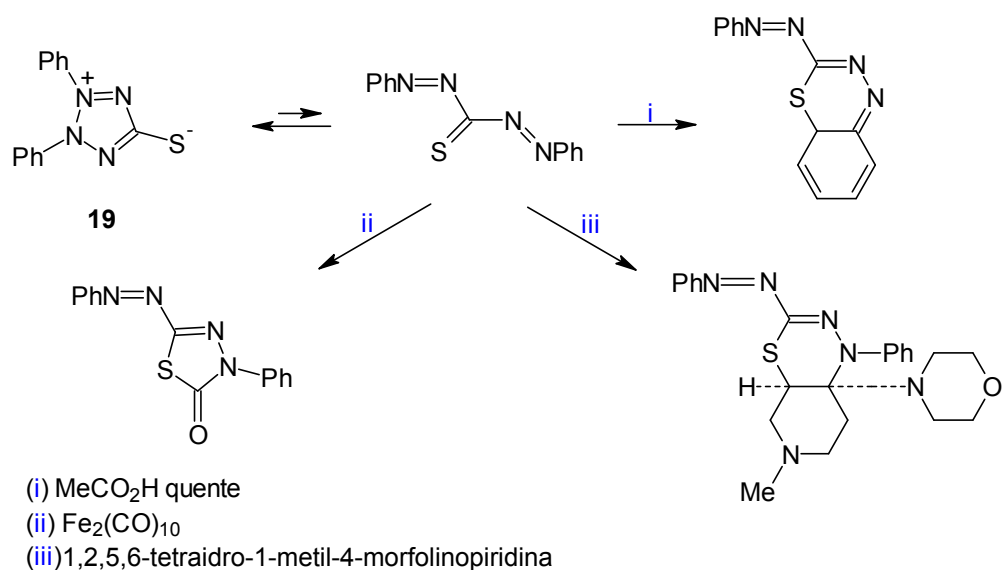
17

Compostos mesoiônicos do tipo A participam de reações de cicloadição 1,3-dipolar. O Esquema 1 mostra dois exemplos de reações de cicloadição do 2,4-difenil-3-metil-1,3-oxazólio-5-olato (**18**) (NEWTON & RAMSDEN, 1982).



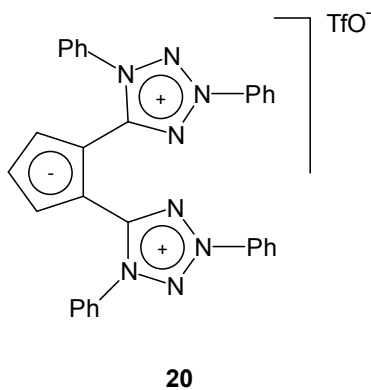
Esquema 1

Uma importante característica dos compostos tipo B está na facilidade em sofrerem abertura do anel, fornecendo o tautômero acíclico correspondente. Por exemplo, diversas reações da deidroditizona (**19**), ocorrem envolvendo seu tautômero acíclico, Esquema 2 (NEWTON & RAMSDEN, 1982).

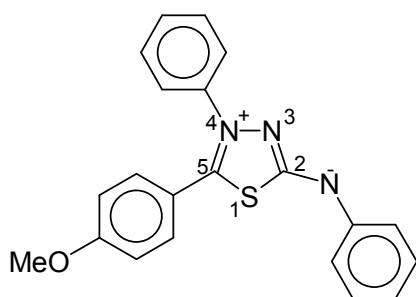


Esquema 2

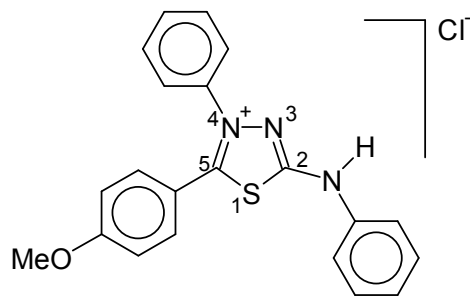
Apesar dos compostos mesoiônicos apresentarem-se, em sua maioria, sob a forma dipolar, podemos encontrar exemplos na literatura de compostos mesoiônicos do tipo tripolar, pouco estudados (ARAKI *et al.*, 1995), tal como o triflato de 1,2-bis-(1,3-difeniltetrazol-5-ílio)-ciclopentadienida (**20**).



Em busca de mais informações sobre a estrutura dos compostos mesoiônicos, Echevarria e cols. (ECHEVARRIA *et al.*, 1992), através de difração de raio-X e cálculos teóricos, estudaram o 4-fenil-5-(4-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida (**21**) e seu cloridrato (**22**). Através das evidências obtidas, sugeriram que em **21** e **22**, a carga positiva está substancialmente associada com o átomo de N-4 (e seu grupo fenila), enquanto a negativa formalmente localizada no átomo de N-exocíclico.

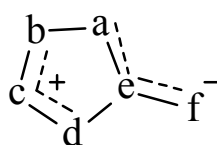


21



22

Como podemos observar, compostos agora classificados como mesoiônicos já são conhecidos a mais de um século. Desde então, o conceito de compostos mesoiônicos e os métodos de síntese têm sofrido inúmeras mudanças. Uma dessas seria que os compostos mesoiônicos não são aromáticos, embora sejam fortemente estabilizados por deslocalização dos elétrons π e pela deslocalização de carga. Seguindo esta mudança a definição de mesoiônico seria: “Compostos mesoiônicos são betaínas heterocíclicas planares de cinco membros com pelo menos uma cadeia lateral cujo átomo α é também plano ao anel e com um momento de dipolo na ordem de 5 D. Os elétrons π deslocalizados sobre duas regiões separadas por aquelas que são essencialmente ligações simples. Uma região a qual inclui o átomo α da cadeia lateral é associado com o HOMO e a negativa carga π , enquanto a outra é associada com o LUMO e positiva carga π ” (LIRA *et al.*, 2002). A estrutura **23** corresponde a esta definição, onde a, b, c, d, e e f são comumente C, N, O, S ou Se.



23

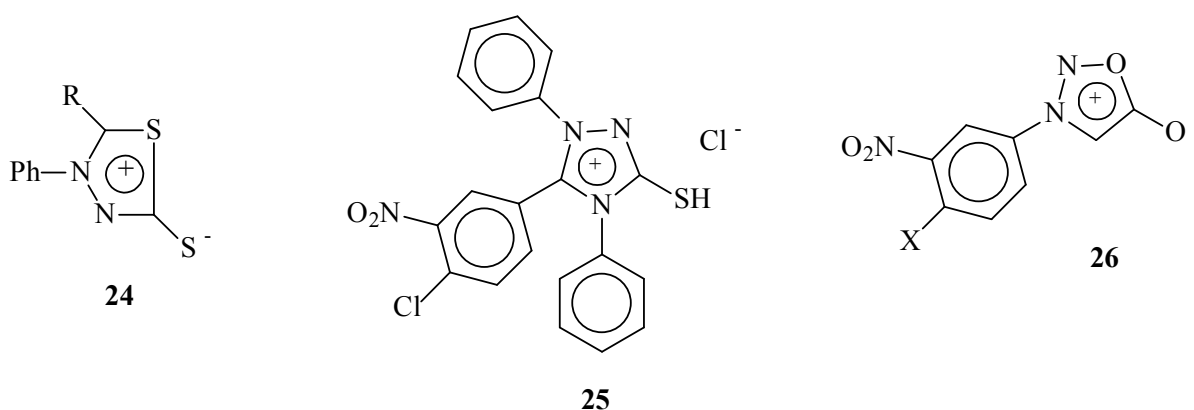
Devido às suas características estruturais especiais, os mesoiônicos, nos últimos anos, têm sido alvo de inúmeros estudos nas mais diversas áreas, podendo-se destacar, pesquisas na área de cristais líquidos (SATO & UJIIE, 1996; CHAN *et al.*, 2004), na confecção de materiais com propriedades óticas não-lineares (MOURA *et al.*, 1994), na síntese de corantes (EDWARD & SHEFFLER, 1979) e, sobretudo, nas pesquisas em função de suas atividades biológicas bastante diversificadas.

1.1.2 Atividade biológica

Os compostos mesoiônicos possuem características estruturais, que têm sido de considerável interesse à química medicinal. Este potencial como substâncias bioativas tem sido atribuído, até o momento, aos seguintes fatos: caráter aromático planar, anéis heterocíclicos de pequenos tamanhos, caráter final neutro apesar da presença de cargas formais, variação de densidade eletrônica no anel e às várias possibilidades da presença de heteroátomos diferentes levando a diversos sistemas mesoiônicos.

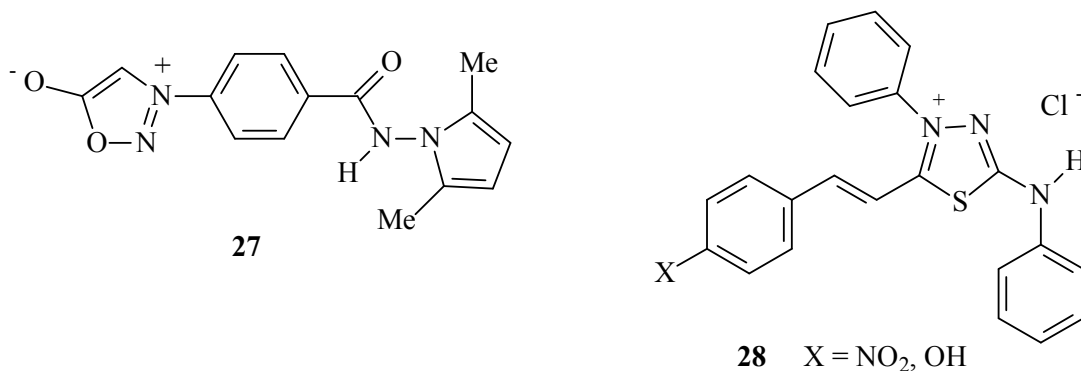
Os mesoiônicos da série 4-fenil-1,3,4-tiadiazólio-2-tiolato-5-substituídos (**24**), foram testados por Kier & Stewart em *Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*, sendo que os compostos com os substituintes metil, etil, isopropil e propila, mostraram-se ativos (STEWART & KIER, 1965). Echevarria & Grynberg (SCHINZATO *et al.*, 1989) estudaram as atividades antitumorais do cloreto de 1,4-difenil-5-[4'-cloro-3'-nitrofenil]-1,2,4-triazólio-3-tiol (**25**), mostrando-se ativo contra os tumores de Ehrlich, Sarcoma 180 e B10MCII.

Os efeitos antitumorais das aril-sidnonas 3-[4'-X-3'-nitrofenil]-1,2,3-oxadiazólio-5-olato (**26**), onde X = Cl, pirrolidino, piperidino e morfolino, foram relatados por Grynberg (GRYNBERG *et al.*, 1992). Esses compostos mostraram-se ativos frente aos tumores: Sarcoma 180, carcinoma de Ehrlich, B10MCII (histiocitoma fibroso) e leucemia L 1210 (tumores experimentais murinos).



Testado contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans*, o mesoiônico 3-[4-(2,5-dimetilpirrol-1-ilaminocarbonil)]-fenilsidnona (**27**), mostrou-se eficaz na inibição do crescimento destes microrganismos (HIREMATH *et al.*, 1994).

Grynberg estudou a atividade antitumoral *in vivo* dos cloridratos dos compostos mesoiônicos da série 1,3,4-tiadiazólio-2-amina (**28**), *p*-X-cinamoil-substituídos, onde X = NO₂ e OH. Os compostos testados mostraram-se ativos contra Sarcoma 180 e o carcinoma de Ehrlich (GRYNBERG *et al.*, 1997).



Posteriormente a Grynberg, novos análogos do composto **26** foram testados *in vitro* contra três linhagens de células tumorais: MCF7 (mama), NCI-H460 (pulmão) e SF-268 (SNC). Dentre estes o substituído com flúor mostrou-se o mais ativo (DUNKLEY & THOMAN, 2003).

Devido ao nosso grande interesse no estudo dos compostos mesoiônicos com potencial atividade antitumoral, a seguir serão apresentados alguns aspectos fundamentais para o entendimento da quimioterapia do câncer.

1.2 O Câncer

1.2.1 Introdução

O câncer é uma doença caracterizada pelo desenvolvimento e proliferação descontrolados de células anormais. Se o crescimento destas células não for controlado, acarretará um crescimento pré-canceroso ou canceroso. Os cânceres podem tornar-se invasivos e metastatizar (a metástase é a capacidade dos tumores malignos de disseminarem-se do órgão primário para outros locais no corpo. Isso ocorre quando células malignas desprendem-se do tumor primário, seguem através do corpo através da circulação sanguínea ou linfática, e depois infiltram tecidos e crescem em novos depósitos tumorais), levando à morte se não forem tratados (BOYER *et al.*, 2000).

A maioria dos cânceres é relacionada aos fatores dietéticos, ou ao tabagismo. De todos os pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão, 80 a 85% são fumantes ou tabagistas de longa data. Cerca de 5 a 10% dos cânceres estão relacionados à exposição ocupacional a carcinógenos, como as irradiações, solventes orgânicos ou o asbesto. Entretanto, em 30% dos casos presumem-se tratar-se de agentes virais, fatores genéticos ou eventos mutacionais espontâneos (BOYER *et al.*, 2000).

Dieta rica em gordura, proteína animal e calorias têm sido correlacionadas com tumores de mama, cólon e próstata. Já alimentos defumados e conservados com sal estão associados com tumores de esôfago e estômago. O uso de bebida alcoólica, particularmente em pacientes fumantes, predispõe aos tumores de boca, faringe, laringe, esôfago e fígado (MURAD & KOTZ, 1996).

O Ministério da Saúde estimou que, para 2003, em todo o Brasil, ocorreriam 402.190 casos novos e 126.960 óbitos por câncer. Para o sexo masculino, seriam esperados 186.155 casos novos e 68.350 óbitos, enquanto que, para o sexo feminino, foram estimados 216.035 casos novos e 58.610 óbitos. Estimou-se que o principal tipo de câncer a acometer a população brasileira é o câncer de pele não melanoma (82.155), seguido pelas neoplasias malignas da mama feminina (41.610), próstata (35.240), pulmão (22.085) e estômago (20.640) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

1.2.2 Tratamento e ação dos quimioterápicos

Os fármacos antineoplásicos entraram em uso clínico para neoplasias antes não tratáveis ou suscetíveis apenas a meios locais de terapia, tais como cirurgia e irradiação. Hoje, a quimioterapia segue rotineiramente ao tratamento de inúmeras neoplasias. Progressos importantes na quimioterapia foram registrados na área da biologia molecular e celular, o que facilitou, juntamente com o maior entendimento do mecanismo de ação de muitas substâncias, a aplicação mais racional dos quimioterápicos e o planejamento de novos fármacos.

Os primeiros quimioterápicos descobertos nas décadas de 1950 a 1970 interagem predominantemente com o DNA ou seus precursores, inibindo a síntese do novo material genético ou causando dano irreparável ao DNA. A Figura 1 mostra uma visão geral da atuação de alguns agentes antineoplásicos (GILMAN *et al.*, 1987).

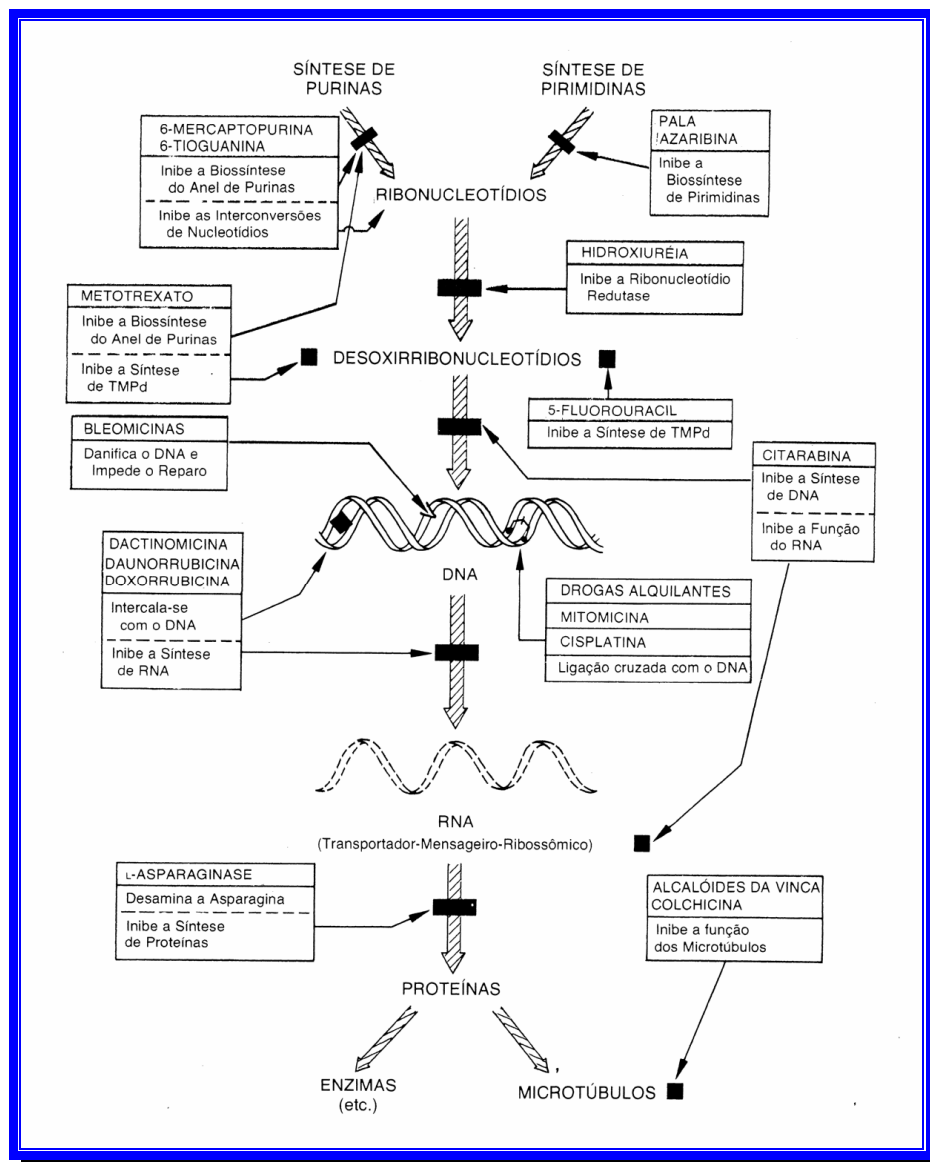


Figura 1. Resumo de mecanismos e locais de ação de agentes quimioterápicos utilizados em doenças neoplásicas (GILMAN *et al.*, 1987).

Muitos dos mais potentes agentes citotóxicos atuam em fases específicas do ciclo celular, e por essa razão têm atividade apenas contra células que estão no processo de divisão (HARDMAN *et al.*, 1996). Sendo assim, as neoplasias malignas humanas que, atualmente, são mais susceptíveis ao tratamento quimioterápico e, freqüentemente, curadas, são aquelas que possuem alta porcentagem de células em processo de divisão. Por outro lado, os tumores sólidos, que apresentam divisão celular relativamente lenta, tais como os carcinomas de pulmão, cólon e mama, constituem mais de 90% de todos os tipos de câncer do homem. Estes tipos de neoplasias, em geral, respondem pouco aos agentes quimioterápicos existentes e o tratamento curativo, utilizando qualquer uma das modalidades terapêuticas, é extremamente difícil (OLIVEIRA & ALVES, 2002).

No presente, pesquisas avançam explorando terapias genéticas e no desenvolvimento de drogas altamente específicas. O tratamento genético já está sendo avaliado em estudos clínicos, vários destes tratamentos investigativos concentram-se no uso de genes para tornar as células suscetíveis a drogas antivirais, genes que aumentam a resposta imune de um paciente, e genes que conferem à medula óssea resistência ao quimioterápico de forma que possam ser administradas maiores doses desses agentes. Os inibidores da angiogênese, substâncias que bloqueiam a capacidade das células tumorais de formar vasos sanguíneos, estão sendo investigados. Em condições ideais, se a angiogênese pudesse ser interrompida, os tumores não poderiam crescer além do tamanho de uma ervilha. O planejamento farmacológico racional está permitindo a criação de substâncias que inibirão muitos fatores na via do câncer, incluindo ação de oncogenes, receptores hormonais, e fatores do crescimento, metástase e angiogênese. O planejamento farmacológico racional combina a tecnologia da estrutura tridimensional de oncogenes e outras moléculas com modelos computadorizados matemáticos para projetar substâncias que interagirão especificamente com moléculas envolvidas no câncer (BOYER *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, a descoberta de novos agentes tem se estendido de produtos naturais, tal como o paclitaxel (taxol, figura 2), e semi-sintéticos, tal como a etoposida, ambos objetivando como alvo o processo de proliferação celular, para um campo de investigação inteiramente novo, que representa uma safra inédita de conhecimento sobre a biologia do câncer. As primeiras aplicações bem sucedidas destes conhecimentos incluem diversas substâncias. O agente, interleucina-2, regula a proliferação de linfócitos T, e é também chamado de assassino natural de células; este agente provou ser capaz de induzir a redução de melanoma maligno e carcinoma de células renais em uma fração de pacientes, doenças irresponsivas aos medicamentos convencionais. Outro agente, o ácido *trans*-retinóico, pode ser usado para promover a redução de leucemia promielocítica aguda, mesmo depois do insucesso da quimioterapia padrão. O ácido 13-*cis*-retinóico previne a ocorrência de segundo tumor primário em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Sucessos iniciais caracterizando antígenos tumorais em células de melanoma e produtos de oncogênese, tal como p53 mutado ou proteínas *ras*, oferecem a real possibilidade de vacinas contra tumores, que estão sendo exploradas em testes clínicos. Estes exemplos enfatizam que a quimioterapia para os pacientes com câncer está sofrendo mudanças revolucionárias devido a um novo conjunto de tratamento baseados em novos conhecimentos da biologia do câncer (HARDMAN *et al.*, 1996).

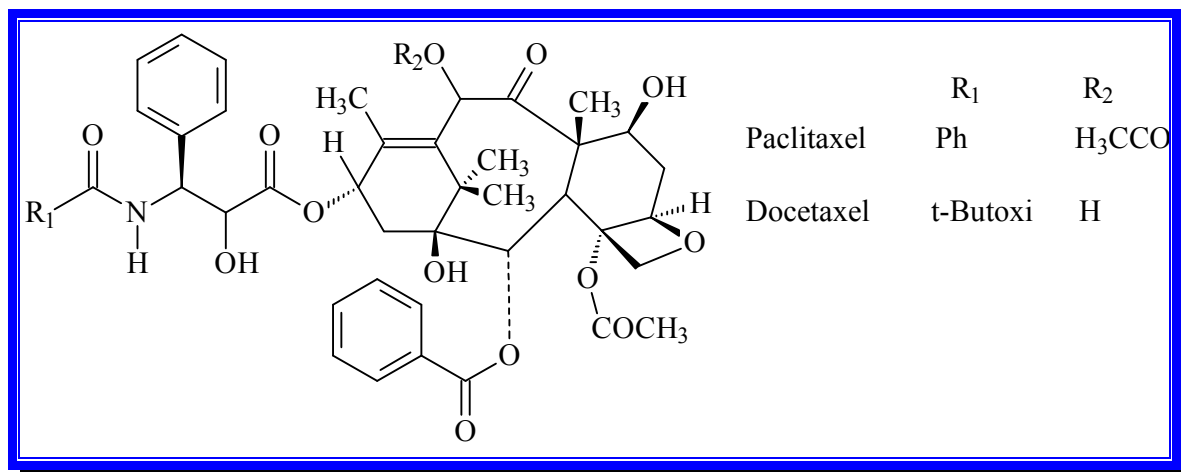
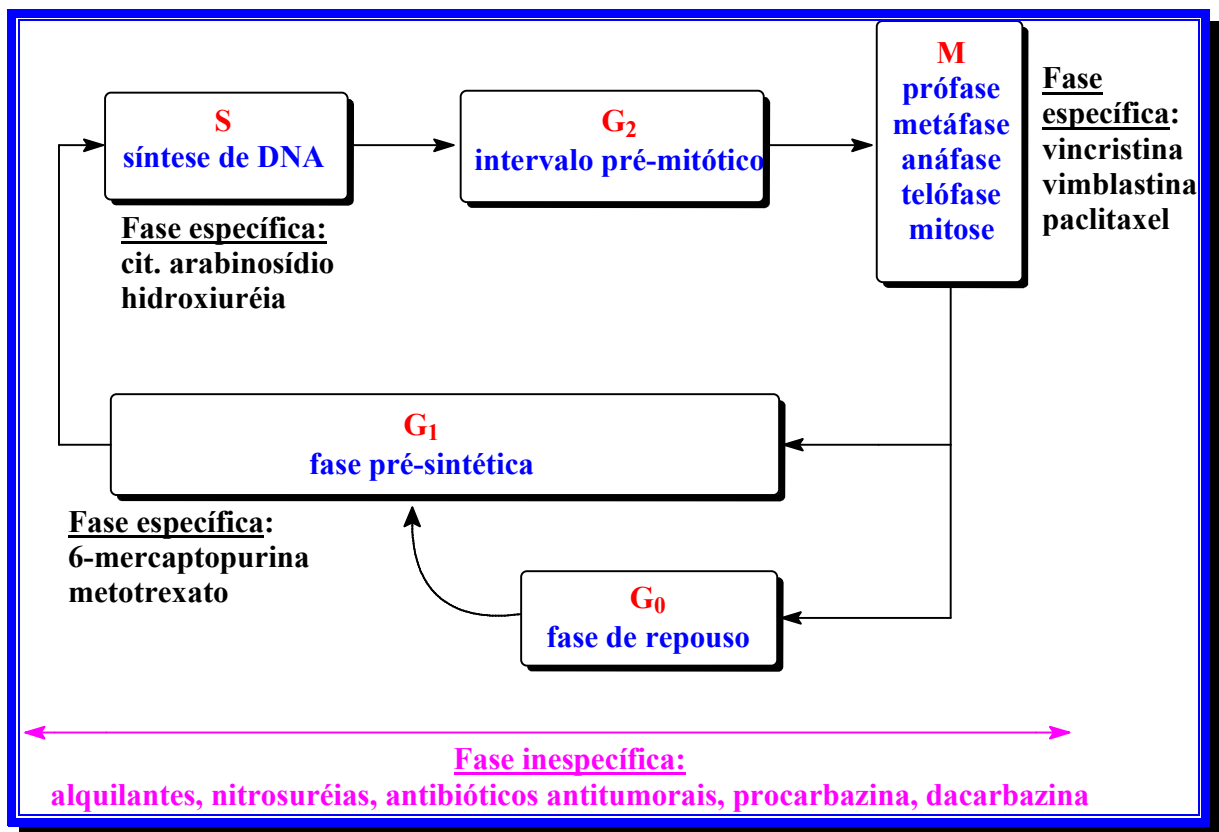


Figura 2. Estruturas do paclitaxel (taxol) e seu mais potente análogo o docetaxel (taxotere).

1.2.3 Resistência aos quimioterápicos

Embora diferenças na duração do ciclo celular ocorram entre as células de vários tipos, todas exibem um padrão semelhante durante o processo de divisão. Este ciclo caracteriza-se por uma fase pré-sintética (G₁); uma fase de síntese do DNA (S); um intervalo segue-se à terminação da síntese do DNA, fase pós-sintética (G₂); e por último ocorre a mitose (M), originando duas células filhas. Cada uma destas células pode reentrar imediatamente no ciclo, ou passar para uma fase não-proliferativa (G₀). Vale ressaltar, que células de tumores de crescimento lento, podem permanecer no estado G₀, durante períodos prolongados, e que células danificadas que atravessam a fronteira G₁/S sofrerão apoptose, se o gene p53 estiver intacto. Se o gene p53 estiver mutado, as células danificadas e potencialmente mutadas prosseguirão através da fase S e emergirão como uma população resistente a drogas. O Esquema 1 ilustra o ciclo celular descrito acima (HARDMAN *et al.*, 1996).



Esquema 3. Atuação de fármacos no ciclo celular.

A resistência aos agentes quimioterápicos antineoplásicos pode ser natural ou adquirida. Chama-se de resistência natural à falta de responsividade inicial de um tumor a uma determinada droga, enquanto resistência adquirida diz respeito à irresponsividade que emerge após um tratamento inicialmente bem sucedido.

Um tipo de resistência comumente observada é a hiperexpressão de uma bomba geral de saída de agentes quimioterápicos como a glicoproteína-P (proteína de transporte de membrana). Outra resistência é conferida à superexpressão do gene *bcl-2*, que inativa a apoptose e conduz a proliferação e sobrevivência contínua de células tumorais, altamente mutadas (GILMAN *et al.*, 1987).

Tumores sólidos também podem apresentar outro tipo de resistência, que está relacionada com a pouca vascularização sanguínea existente na região do tumor. Devido a esta baixa vascularização podemos ter resistência às radiações ionizantes e a quimioterápicos. Sabe-se que as células com oxigenação normal são mais sensíveis aos efeitos da radiação ionizante do que aquelas em condições de hipóxia (células existentes em uma região de baixa concentração de oxigênio (Figura 3) situadas entre células da periferia do tumor, que são bem oxigenadas e as células anóxicas e necróticas encontradas no centro do tumor e, portanto,

distantes da vascularização). Isto ocorre porque as moléculas de O_2 reagem rapidamente com os radicais livres produzidos pela radiação, originando radicais altamente reativos, tais como os radicais peroxila ($ROO\cdot$), hidroxila ($HO\cdot$) e superóxido ($O_2\cdot^-$), que provocam a destruição das biomoléculas com a conseqüente morte celular.

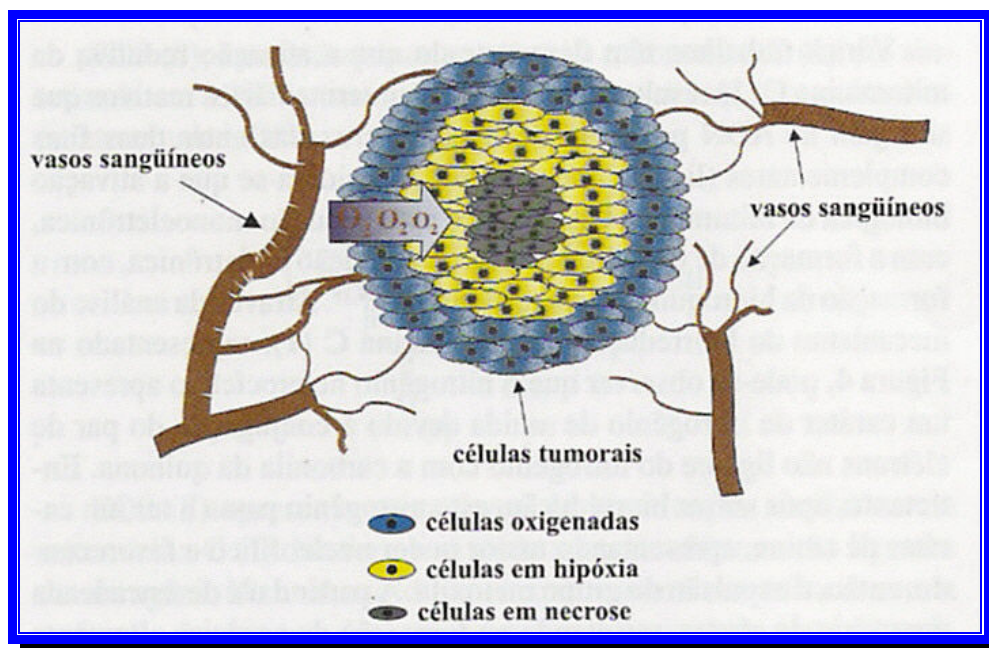


Figura 3. Secção transversal de um tumor sólido, mostrando a diminuição da concentração de oxigênio em relação à distância capilar (OLIVEIRA & ALVES, R. J., 2002).

Um dos fatores que explica a resistência à quimioterapia é a dificuldade do fármaco em alcançar as células em hipóxia. O agente quimioterápico deve vencer algumas barreiras para atingir as células em hipóxia: atingir os vasos sanguíneos do tumor; atravessar a parede destes vasos em direção ao interstício e difundir-se pelo interstício em direção às células em hipóxia (Figura 4) (OLIVEIRA & ALVES, 2002).

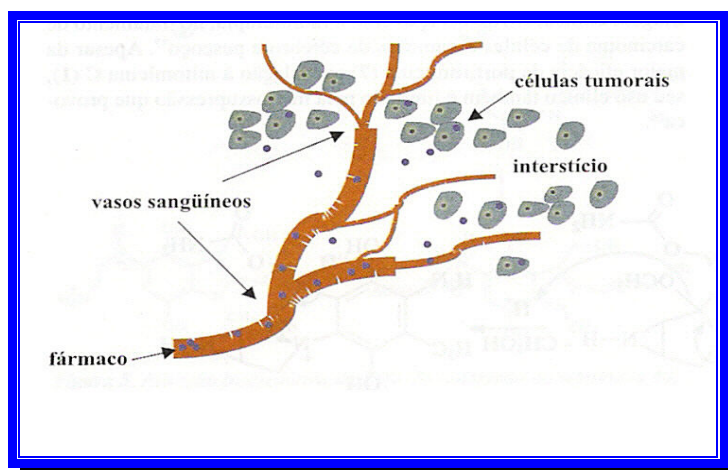


Figura 4. Barreiras que o agente antineoplásico deve vencer para alcançar as células em hipóxia (OLIVEIRA & ALVES, 2002).

1.2.4 As DNA-Topoisomerases

Um dos principais alvos para os novos agentes antineoplásicos tem sido as enzimas nucleares DNA-topoisomerases por estarem envolvidas nas principais etapas que envolvem a replicação, recombinação e transcrição. Assim, por considerarmos as DNA-topoisomerases um importante alvo para a quimioterapia do câncer, e ter sido objeto de estudo nesta tese, a seguir serão abordados alguns conceitos fundamentais.

Em 1963, Jerome Vinograd observou que o DNA circular do vírus polioma emergia em duas bandas quando era centrifugado. Assim, descobriu-se uma importante propriedade do DNA circular, a forma superelicoideada. Com isso, duas formas básicas são encontradas para o DNA, a forma relaxada e a superelicoideada, Figura 5.

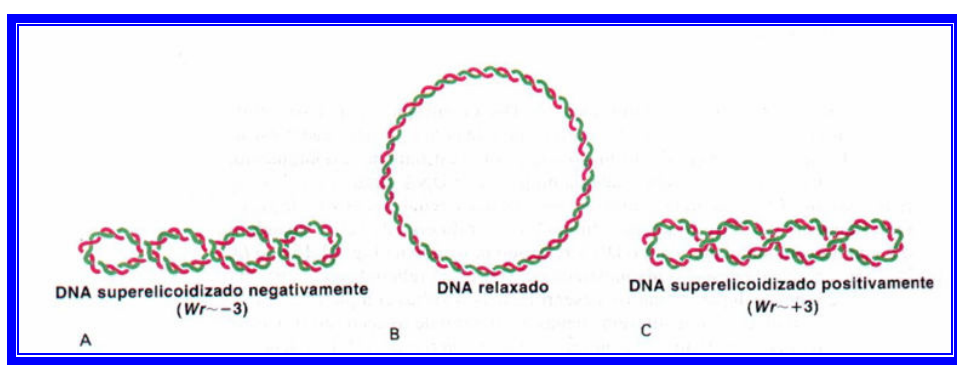


Figura 5. Moléculas de DNA circular que diferem em sua superelicoideação, onde W_r =torção. (A) Superelicoideação negativa ($W_r \sim -3$, dextrosa). (B) Relaxada ($W_r=0$). (C) Superelicoideação positiva ($W_r \sim +3$, sinistrorsa) (STRYER, 1996)

As macromoléculas que constituem os DNAs na natureza estão em sua maioria na forma de super-hélices negativas (com o giro para a esquerda). Em outras palavras, essas super-hélices surgem por desenrolamento, levando à uma importante consequência, que é a preparação do DNA para um processo que requer a separação dos filamentos: replicação, recombinação e transcrição.

Moléculas de DNA que diferem apenas em número de ligações (Lk), são isômeros topológicos (ou topoisômeros) umas das outras, sendo que estes só podem ser interconvertidos cortando um ou ambos os filamentos de DNA, Figura 6 (STRYER, 1996).

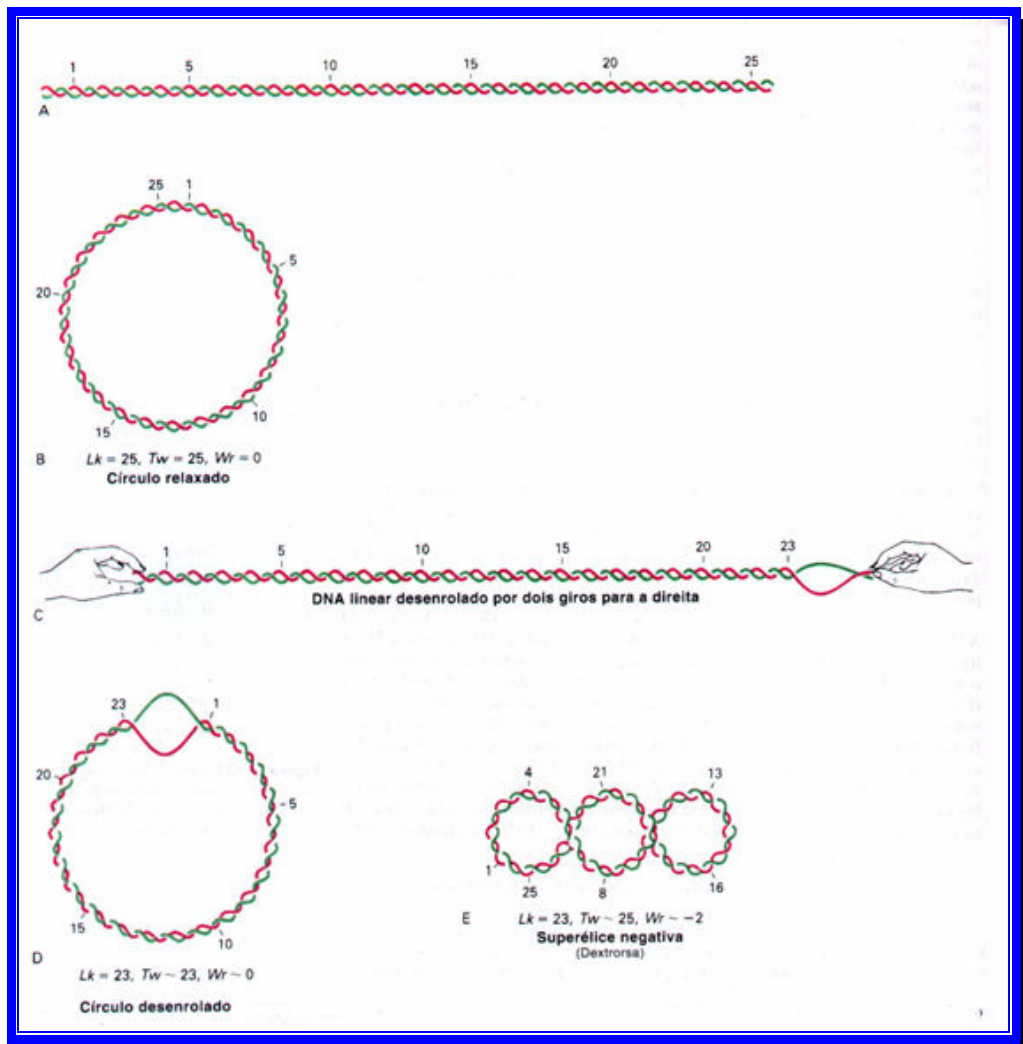


Figura 6. Esquema mostrando o número de ligações (Lk), número de giros (Tw) e o número de torções (Wr) de moléculas circulares de DNA (STRYER, 1996).

A interconversão de topoisômeros de DNA é catalisada por enzimas chamadas topoisomerases, descobertas por J. Wang e M. Gellert. Estas alteram o número de ligações do DNA catalisando um processo de três etapas: (1) clivagem de um ou ambos os filamentos do DNA, (2) passagem de um segmento de DNA por essa quebra e (3) reconstituição do trecho de DNA quebrado (STRYER, 1996).

As topoisomerases são classificadas em duas famílias: tipo II e tipo I, sendo estas divididas nas respectivas subfamílias IIA/IIB e IA/IB. Cada família tem um diferente mecanismo para manipular a topologia do DNA. Por exemplo, o tipo II (um dímero) que incluem a DNA girase procariótica, a topoisomerase IV e as topoisomerases II- α e II- β , transportam uma dupla-hélice através do corte de ambos os filamentos do DNA (Figura 7). Ao contrário da DNA topoisomerase tipo I, estas enzimas requerem hidrólise de ATP para o seu funcionamento. Em contraste, o tipo I (monomérica) transporta um segmento do DNA através da quebra de um único filamento (Figura 8). O tipo I-A inclui a proteína ω bacterial, topoisomerases III e a DNA girase reversa, enquanto o tipo I-B inclui as topoisomerases I eucarióticas (CHAMPOUX, 2001).

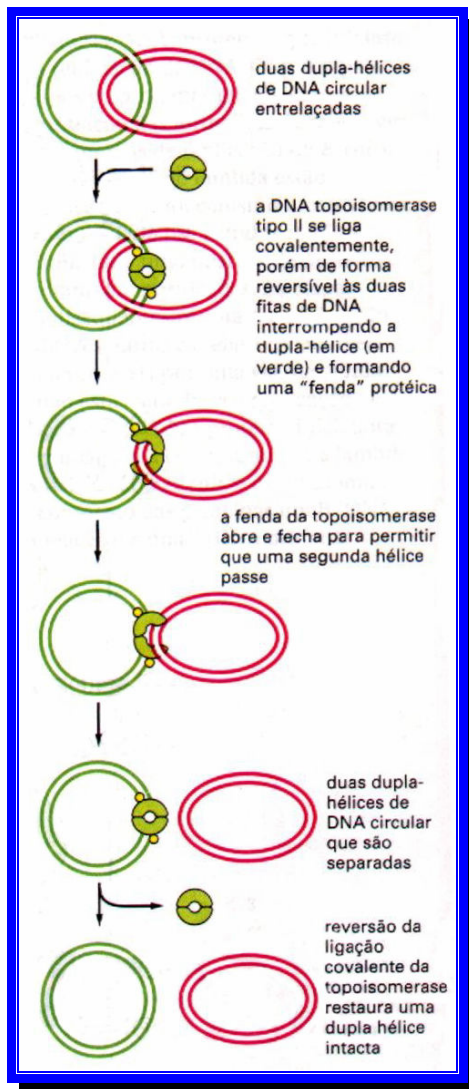


Figura 7. Reação catalisada pela DNA topoisomerase tipo II (ALBERT *et al.*, 1997).

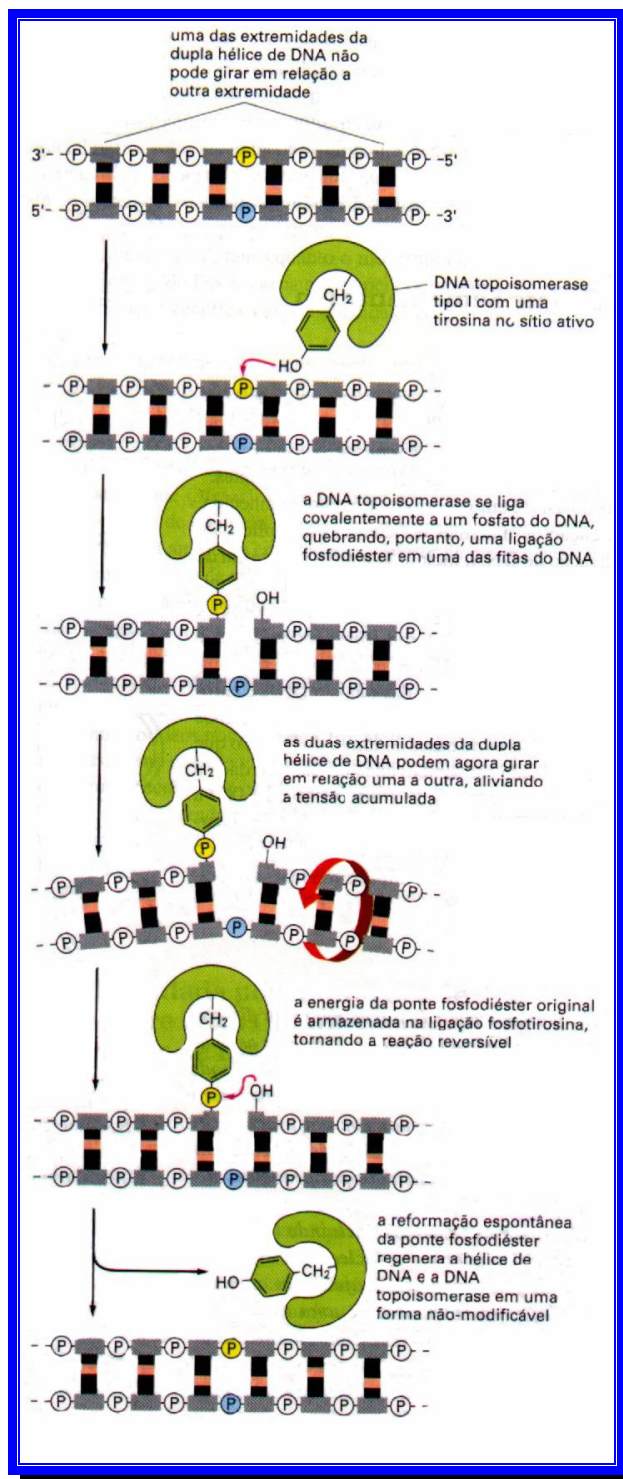


Figura 8. Reação reversível de quebra (de apenas uma hélice) catalisada pela enzima DNA topoisomerase I eucariótica. Como indicado estas enzimas formam uma ligação covalente transitória com o DNA, de modo a permitir uma rotação livre nas pontes covalentes ligadas ao fosfato (em azul) (ALBERT *et al.*, 1997).

Muitas substâncias estabilizam o complexo covalente enzima-DNA (complexo ternário: droga-enzima-DNA) e impedem uma etapa específica no ciclo catalítico, ou seja, impedem o refechamento de DNA quebrado levando à morte celular apoptótica. Estas substâncias transformam proteínas inofensivas em potentes toxinas nucleares que danificam letalmente a dupla hélice, assim, elas atuam por envenenamento da DNA topoisomerase. A Figura 9 mostra a atuação de substâncias nas DNA topoisomerases via formação de complexo ternário (ETIÉVANT *et al.*, 2003).

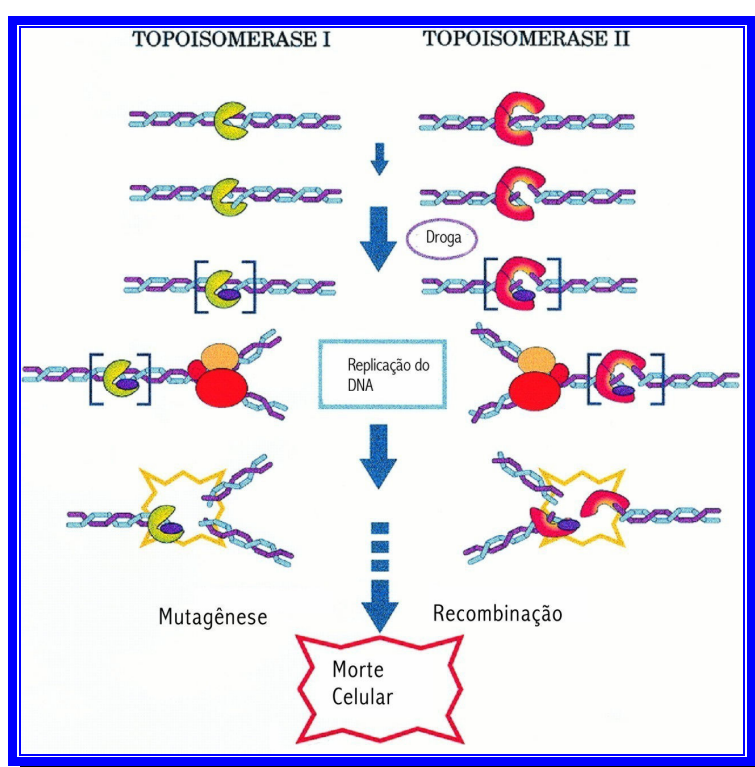


Figura 9. Esquema mostrando a morte celular devido a formação do complexo ternário (em colchetes), que impede a replicação do DNA (<http://cmgm.stanford.edu/biochem/biochem201/handouts/DNAtopo.html>).

Outras substâncias não provocam a quebra do DNA, mas inibem a atividade catalítica da enzima, sendo, portanto chamadas de inibidores catalíticos (UMERUMA *et al.*, 2003). A inibição catalítica pode ocorrer por uma variedade de mecanismos moleculares: (1) inibidores ligam-se ao DNA impedindo o acesso de topoisomerases as seqüências de DNA, tais como intercaladores e ligantes de sulco (Figura 10 - violeta); (2) outros se ligam à enzima e bloqueiam qualquer de suas transições conformacionais por “congelamento” de uma das suas

conformações (Figura 10 - verde), ou inibem a ligação do ATP à enzima. Portanto, existem 2 subcategorias de inibidores: inibidores da ligação-DNA e da ligação-enzima (CAPRANICO *et al.*, 1997).

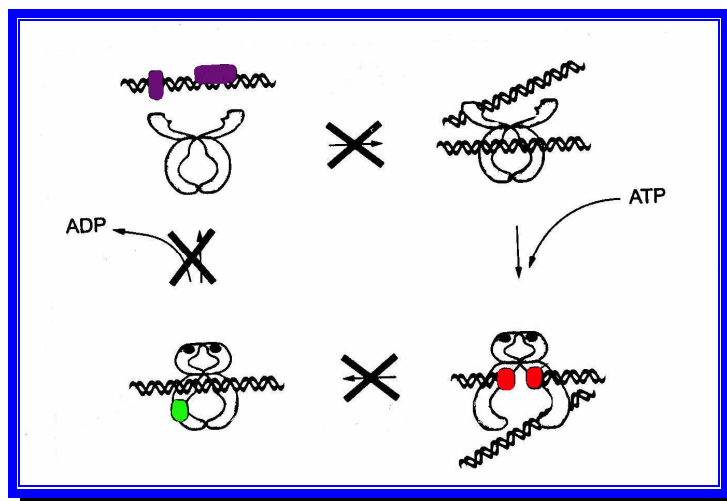


Figura 10. Ciclo catalítico da topoisomerase II e modos de ação dos inibidores catalíticos (CAPRANICO, *et al.*, 1997).

As substâncias que participam do complexo ternário podem ser caracterizadas por dois modos de ligação ao DNA: intercalação e ligação ao sulco menor. Algumas substâncias podem apresentar ambas as características de ligação ao DNA. Estes agentes estão localizados na interface entre a clivagem do DNA e sítios ativos da enzima, em contato com pares de bases adjacentes à ligação clivada (CAPRANICO & BINASCHI, 1998).

1.3 Leishmaniose

1.3.1 Introdução

O modelo de crescimento das células tumorais se assemelha muito ao dos parasitas unicelulares, como por exemplo, os tripanossomatídeos. Assim, como a leishmaniose é uma doença parasitária endêmica em nosso país, o estudo do possível potencial de uso dos compostos mesoiônicos para o combate a leishmaniose, também foi realizado neste trabalho de tese. A seguir serão descritos tópicos envolvendo a leishmaniose e a quimioterapia usada no tratamento atual.

A leishmaniose é uma infecção zoonótica que afeta animais e o homem. Estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países são acometidas pela leishmaniose (Figura 11), 72 dos quais são países em desenvolvimento: 90% de todos os casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão; 90 % das leishmanioses mucocutâneas ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru; 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Iran, Peru, Arábia Saudita e Síria (E SILVA & JACQUES, 2002).

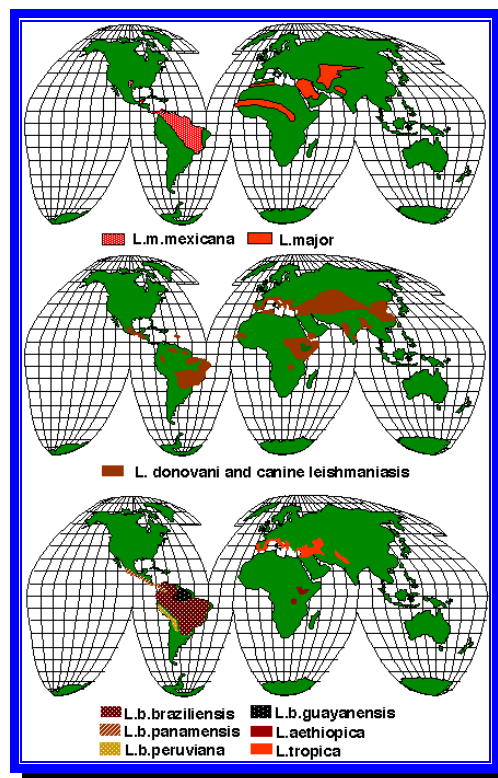


Figura 11. Distribuição de leishmaniose no mundo (www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites)

Atualmente, em alguns países a leishmaniose está sendo considerada uma doença emergente devido à sua ocorrência nos casos de co-infecção pelo vírus HIV, como observado na Figura 12, especialmente nos países do sul da Europa, onde 25 a 70% dos casos de leishmaniose visceral em adultos estão relacionados com este vírus (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/>, DE CARVALHO *et al.*, 2000).

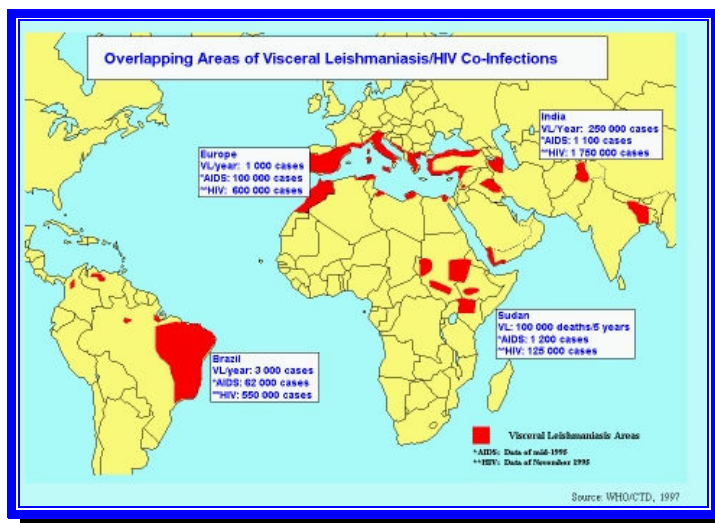


Figura 12. Distribuição de áreas de co-infecção de leishmaniose visceral/HIV (www.who.int/emc/diseases/leish/).

No Brasil as leishmanioses são detectadas praticamente em todo território nacional (Figura 13), por exemplo, no estado do Mato Grosso do Sul e, no estado do Rio de Janeiro, muito detectadas nos municípios de Casemiro de Abreu e Rio de Janeiro, especificamente na Zona Oeste, abrangendo Jacarepaguá, Vargem Grande, Bangu e Campo Grande (KAWA & SABROZA, 2002; CALDAS *et al.*, 2003).

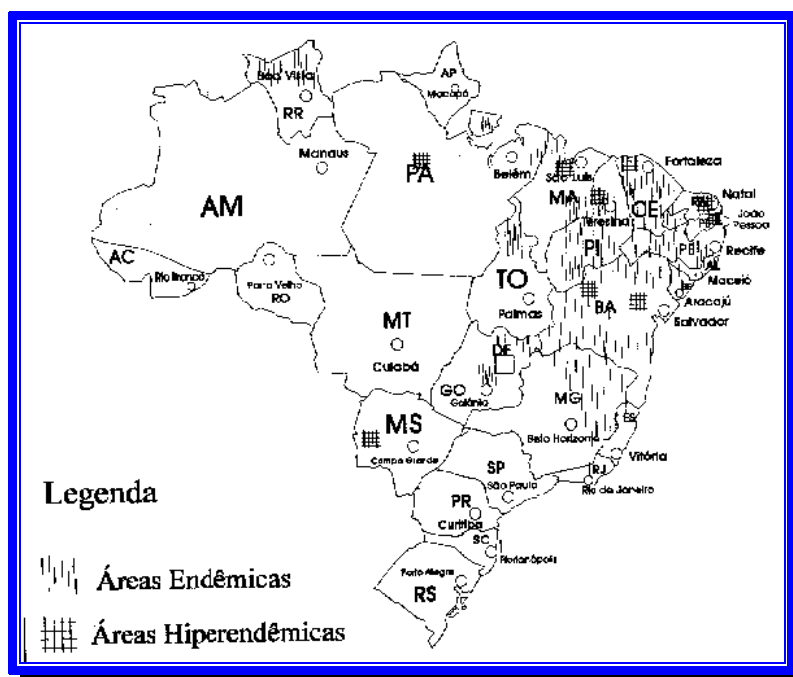


Figura 13. Distribuição de leishmaniose no Brasil (www.gerenciadeleishmaniose.hpg.ig.com.br)

O agente etiológico é um protozoário parasita da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. As leishmanias apresentam duas formas, uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada ou amastigota, que é intracelular obrigatória, sendo encontrada nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (Figura 14) (PESSOA & MARTINS, 1977; DIPERSIO, 2001).

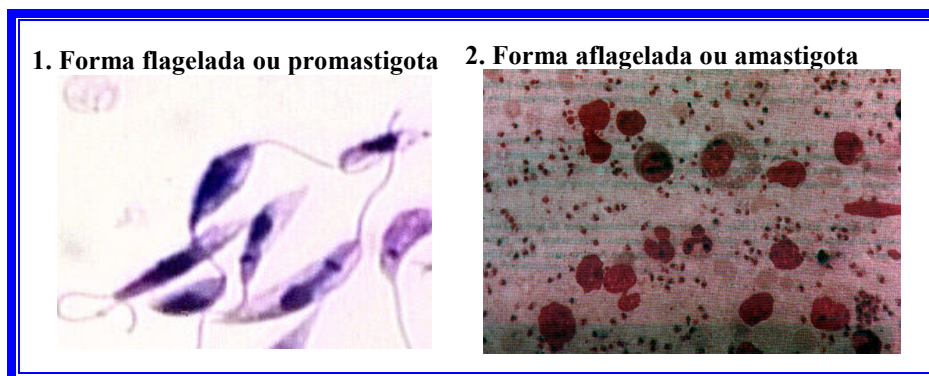


Figura 14. Formas promastigota (esquerda) e amastigota (direita)

(www.gerenciadeleishmaniose.hpg.ig.com.br).

Os hospedeiros invertebrados de todas as espécies de *Leishmania* são flebotomíneos hematófagos (Díptera: Psychodidae) dos gêneros *Phlebotomus* (Figura 15), vetores das leishmanioses do Velho Mundo, e *Lutzomya*, envolvidos no ciclo de transmissão desses parasitas no Novo Mundo. Várias ordens de mamíferos têm sido atribuídas como hospedeiros e reservatórios das leishmanioses, por exemplo: canídeos, roedores, marsupiais, endentados e primatas (DIPERSIO, 2001; GENESTRA, 2002).



Figura 15. Inseto (flebotomíneo) vetor da leishmaniose

(www.gerenciadeleishmaniose.hpg.ig.com.br).

As manifestações clínicas e patológicas da doença dependem em parte da espécie do parasita infectante, podendo ser divididas basicamente em duas grandes categorias distintas: leishmaniose tegumentar (espécies: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. venezuelensis*) e leishmaniose visceral ou calazar (espécie: *L. chagasi*), representadas na Figura 16 (BONFANTE *et al.*, 2003).

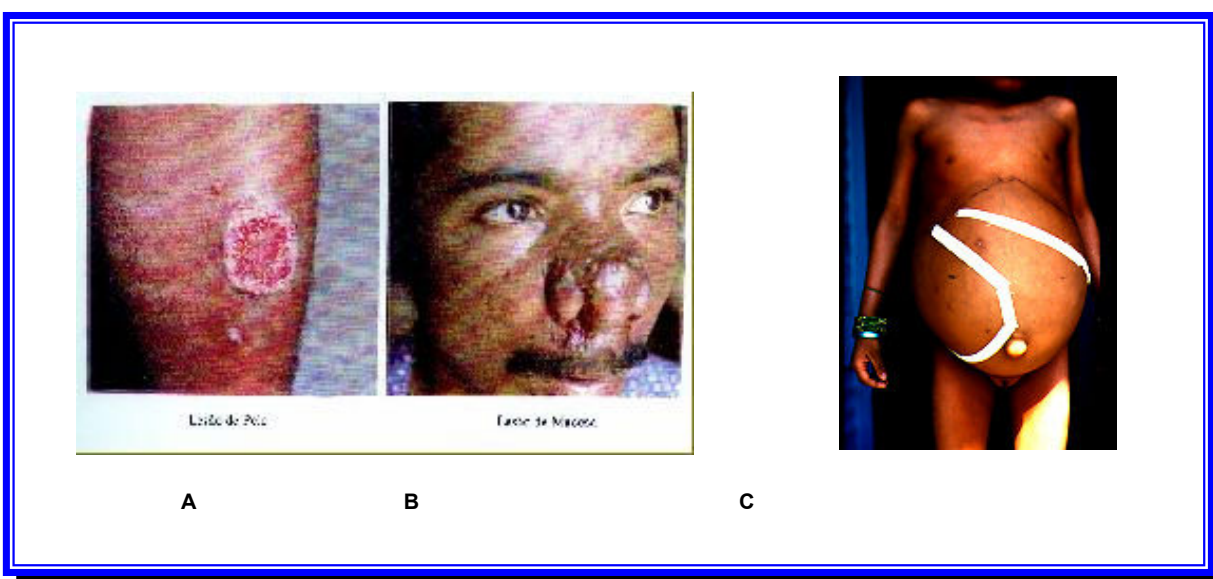


Figura 16. Leishmaniose tegumentar: cutânea (A) e mucocutânea (B); Leishmaniose visceral (C) (www.geocities.com/entomologia2000).

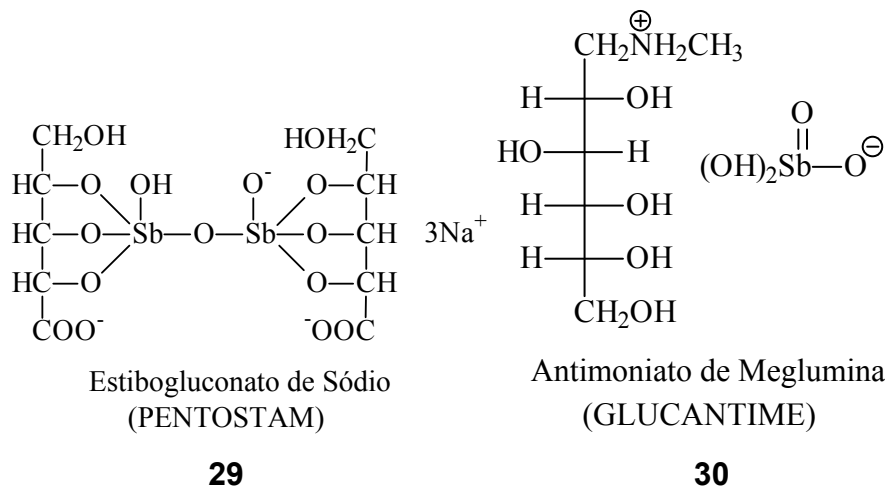
1.3.2 Quimioterápicos Antileishmaniose

Gaspar Vianna, em 1914, relatou pela primeira vez a utilização do tártaro emético no combate à leishmaniose mucocutânea, e posteriormente contra a forma visceral (DE CARVALHO *et al.*, 2000).

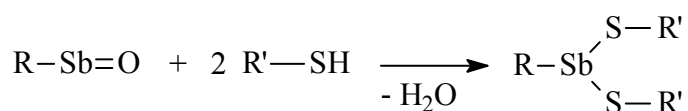
Já em 1920, foram sintetizados os primeiros antimoniais pentavalentes como a estibamina de uréia (estrutura ainda não definida- $C_7H_{12}N_3O_4Sb$) e o neostibosan (complexo formado por ácido *p*-aminobenzenoestibônico, ácido *p*-acetilaminobenzenoestibônico, ácido antimônico e dietilamina, na proporção de 1:2:1:3) (GOODWIN, 1995; The Merck Index, 12^{ed}, Merck e Co. INC, p. 3896, 1996).

Aproximadamente em 1940, foram desenvolvidos medicamentos antimoniais complexados a carboidratos na forma de estibogluconato de sódio (Pentostam®) (29) ou na

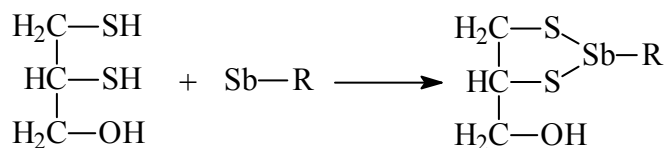
forma de antimoniato de meglumina (Glucantime®) (30), sendo utilizado até hoje no tratamento da leishmaniose (HILAIRE *et al.*, 2002).



Apesar do Pentostam® e do Glucantime® serem agentes quimioterápicos de primeira escolha no tratamento da leishmaniose, há mais de 40 anos, ainda é bastante limitado o conhecimento do mecanismo de ação de tais agentes. Entretanto, alguns mecanismos vêm sendo sugeridos com base em experiências mais recentes, por exemplo, a formação de complexos solúveis em água, de carboidratos associados ao antimônio, induzindo uma melhor absorção da substância pelos macrófagos dos hospedeiros, sendo assim, o antimônio pentavalente seria um pró-fármaco, sendo convertido posteriormente em antimônio trivalente, forma mais tóxica, e mais ativa (TIEKINK, 2002). Estas formas trivalentes possivelmente se combinam com grupos sulfidríla (tais como os da cisteína) presentes em sistemas enzimáticos essenciais do parasita por ligações covalentes.



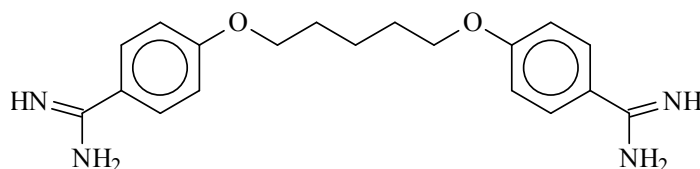
Provas neste sentido estão baseadas no fato de que o dimercaprol é utilizado como antídoto para envenenamento por antimônio (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1982; HARDMAN *et al.*, 1995).



Dimercaprol

Um exemplo deste mecanismo é o apresentado pelo tártaro emético no tratamento da esquistossomose, onde o fármaco combina-se com grupos sulfidril da fosfofrutoquinase do esquistossomo e do hospedeiro. Entretanto, a fosfofrutoquinase dos mamíferos é 80 vezes menos sensível a este fármaco do que a enzima do esquistossomo.

Estudos *in vitro* realizados com tripanossomíases africanos mostraram que a glicose é essencial na manutenção destes parasitas. Com isso levantou-se a hipótese de que agentes hipoglicêmicos teriam atividades tripanomicida, e esta hipótese foi colocada em prática utilizando-se o fármaco hipoglicemiante Synthalin (decametileno diguanidina) em *Trypanosoma brucei*, com resultados satisfatórios. Devido a este fato a pentamidina (**31**), com estrutura relacionada à do Synthalin tem sido utilizada no tratamento das tripanossomiasis (TEMPORAL, 2000).



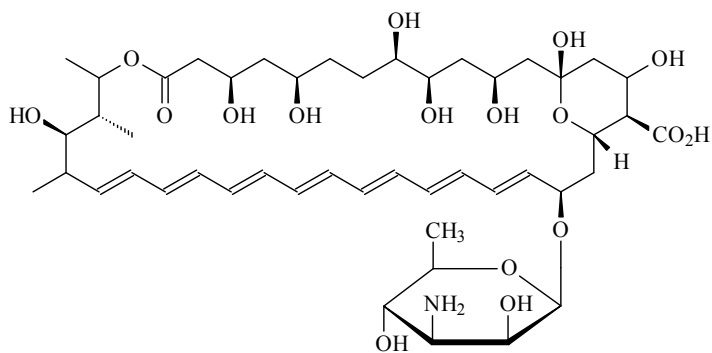
Pentamidina

31

A Pentamidina tem sido empregada por mais de 40 anos como fármaco de segunda escolha no tratamento da leishmaniose. Apesar deste tempo o mecanismo de ação ainda é pouco conhecido, sugerindo-se que esta interfere na biossíntese de poliaminas (ou se liga a esta), além da ligação com o k-DNA dos tripanosomatídeos (TEMPORAL, 2000).

Outro fármaco de segunda escolha é a anfotericina B (**32**), um antibiótico poliênico (heptaeno), que é caracterizada por alterar a membrana celular fúngica e de leishmanias. A atividade deve-se a capacidade desta de se combinar, pela sua porção poliênica, com esteróis da membrana celular, através de interações hidrofóbicas. Disto resulta a reorientação das moléculas dos esteróis, provocando alterações na permeabilidade da membrana e o

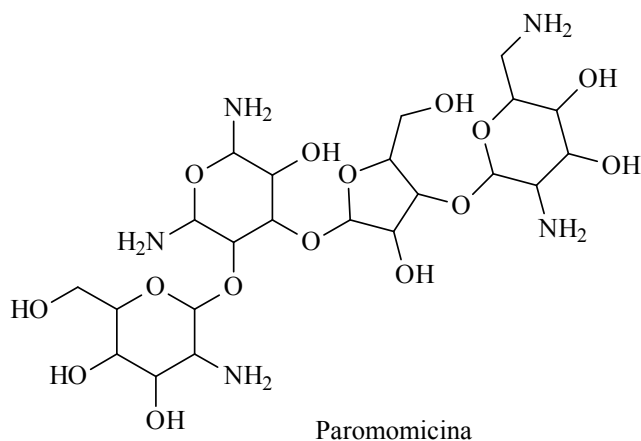
conseqüente vazamento de possíveis constituintes essenciais à sobrevivência do parasita: K^+ , fosfatos inorgânicos, ácidos carboxílicos, aminoácidos e ésteres de fosfato (GENESTRA, 2002).



Anfotericina B

32

Outro antibiótico que tem se mostrado promissor é a paromomicina (**33**), um aminoglicosídeo isolado do *Streptomyces risomus*, utilizado no tratamento de amebíase. Este vem sendo testado na forma exclusiva ou associada a um antimonial, atribuindo-se sua atividade a interação com o mRNA, introduzindo ambigüidades ou leitura errada na mensagem genética, devido a sua ligação ao ribossomo, ou seja, inibe a síntese protéica (CARVALHO, 2000).

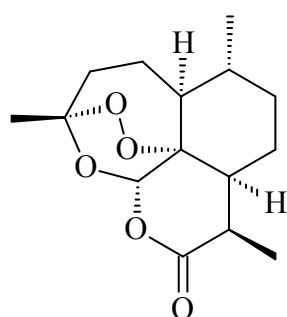


Paromomicina

33

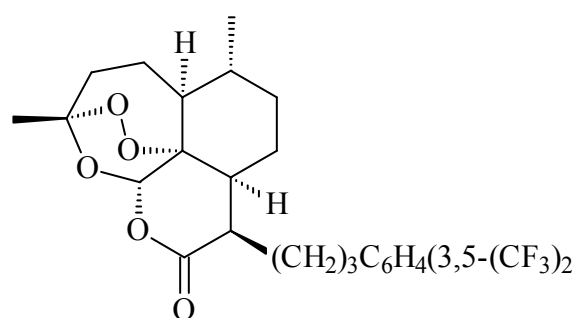
Análogos da Artemisinina (**34**), uma lactona sesquiterpénica com grupo endoperoxídeo de ocorrência natural, também vem sendo testados *in vitro* por Avery e

colaboradores contra *Leishmania donovani* na forma promastigota, sendo encontrados bons resultados, como é o caso do análogo abaixo (**35**) com $IC_{50}=0,3 \mu M$, quando comparados com as drogas em uso clínico: anfotericina B ($IC_{50}=0,01 \mu M$) e pentamidina ($IC_{50}=1,35 \mu M$). Um mecanismo provável de ação destes compostos envolveria uma inicial interação do grupamento endoperóxido, resultando na formação de radicais livres intermediários (AVERY *et al.*, 2003).



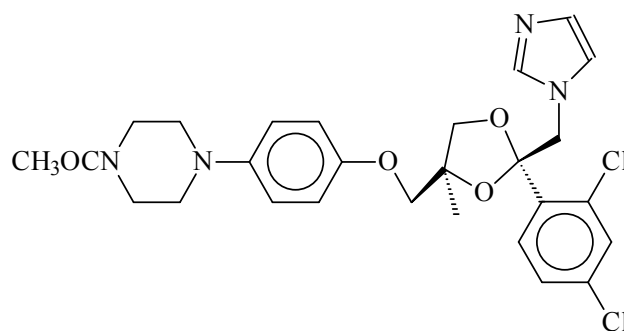
Artemisinina

34



35

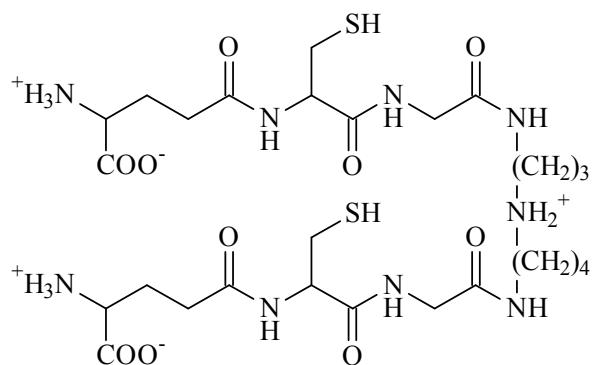
O cetoconazol (**36**), um derivado do imidazol, também vem sendo utilizado no tratamento antileishmaniose. O provável mecanismo de ação baseia-se na inibição da biossíntese de esteróides nos parasitas em sistemas enzimáticos que dependem do citocromo P450. O átomo de nitrogênio do grupo imidazólico se liga ao átomo de ferro do citocromo P450 do parasito, evitando a conversão do lanosterol em ergosterol. Ressalta-se que o principal esteróide no hospedeiro vertebrado é o colesterol, enquanto no parasito é o ergosterol (ARAÚJO, 1999).



Cetoconazol

36

Em busca de seletividade no tratamento da leishmaniose, as diferenças no metabolismo do hospedeiro e dos tripanomatídeos tem sido alvo de novos agentes quimioterápicos. Uma das alternativas leva à formação da tripanotiona (**37**) (exclusivo dos tripanosomatídeos), um aduto de duas moléculas de glutatona ligados a dois grupos amino terminais da espermidina, que é formado a partir da ornitina, após descarboxilação, conforme mostra a Figura 17 (GOMES, 2000).



Tripanotiona

37

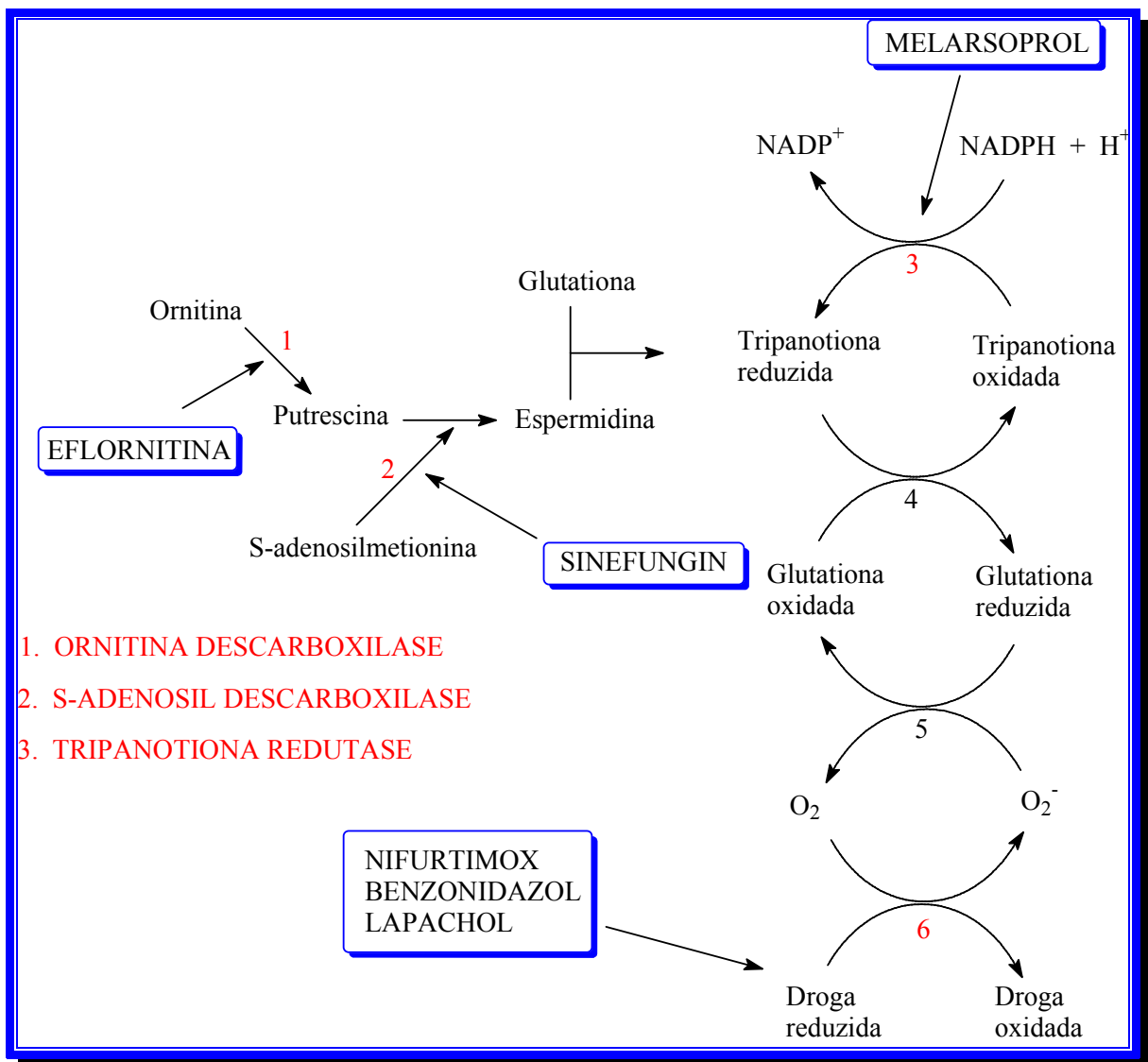
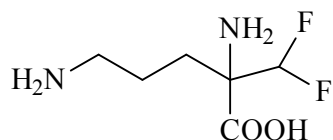


Figura 17. Rota de ação de algumas drogas anti-tripanosomatóides (adaptado de www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/).

Os agentes quimioterápicos mostrados a seguir aumentam a sensibilidade dos tripanosomatóides ao “stress” oxidativo, pela diminuição dos níveis da enzima tripanotiona reduzida.

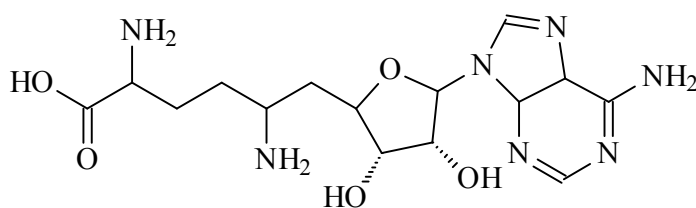
A Eflornitina (DMFO-difluorometilornitina) (**38**) é um inibidor irreversível da enzima ornitina descarboxilase (1 na Figura 17), que é utilizada no estágio inicial no tratamento da leishmaniose.



Eflornitina

38

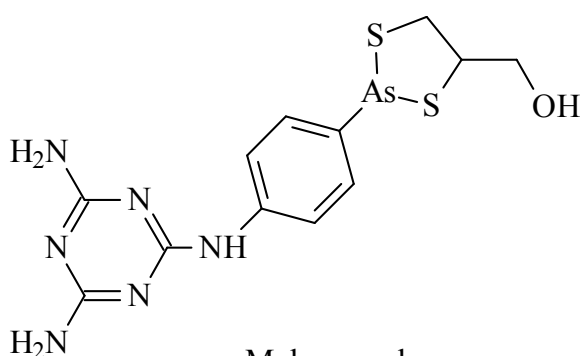
O Sinefungin (**39**) é um inibidor da enzima S-adenosilmetionina descarboxilase (2-Figura 17) envolvida na conversão da putrescina à espermidina.



Sinefungin

39

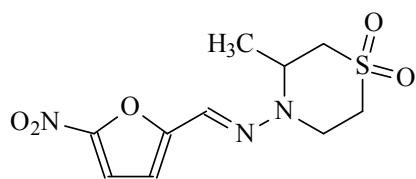
Outro fármaco recente de grande atuação é o melarsoprol (**40**), que forma um aduto com a tripanotona. Este complexo comporta-se como um inibidor da tripanotona redutase (3 na Figura 17).



Melarsoprol

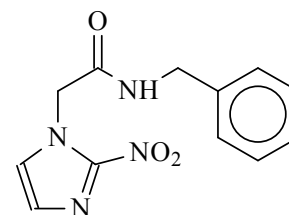
40

Fármacos como, Nifurtimox (**41**), Benzonidazol (**42**) e o Lapachol (**43**) são utilizados devido as suas capacidades redutivas, levando à produção de radicais superânion, que levam ao “stress” oxidativo (SANTOS, 2000).



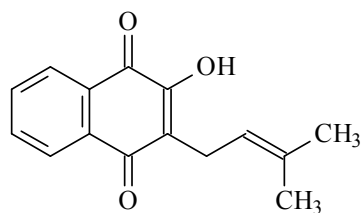
Nifurtimox

41



Benzonidazol

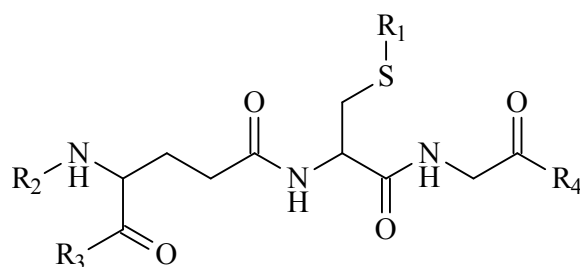
42



Lapachol

43

Outra estratégia quimioterápica alternativa para encontrar substâncias menos tóxicas inclui a inibição da tripanotona redutase através da mimetização da tripanotona e glutathionilperimidina sintetase através de análogos da glutathiona modificada (**44a-b**).



(a): $R_1 = \text{BrBz}$ (b): $R_1, R_2 = \text{CBz}$
 $R_2 = \text{CBz}$ $R_3, R_4 = \text{OMe}$
 $R_3, R_4 = \text{OBu}$

44

Além destes mecanismos de ação, podemos citar outros que estão em estudo, como por exemplo: inibidores do metabolismo dos folatos, pois os parasitas leishmanias necessitam destes para o crescimento (GILBERT, 2002), inibidores da síntese de tubulinas e inibidores da cisteína proteinase, onde podemos citar a catepsina “L-like”cisteína proteinase, que está

mais presente e ativa na forma amastigota do que na promastigota (DE CARVALHO *et al.*, 2000).

Na tentativa de contornar os indesejáveis efeitos colaterais ocasionados pelos medicamentos atualmente em uso clínico, vêm se desenvolvendo vacinas contra a leishmaniose, sendo que em 1988 foi introduzida a Leishvacin® como resultado destes estudos (MARZOCHI *et al.*, 1998; De CARVALHO *et al.*, 2000).

1.4 Correlação entre a Estrutura Química e Atividade Biológica

1.4.1 Parâmetros hidrofóbicos

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define fármaco como toda substância contida em um produto farmacêutico, empregada para corrigir, manter, recuperar e preservar sistemas fisiológicos eliminando os estados patológicos dos indivíduos em que é administrada. O planejamento destes fármacos consiste em uma série de metodologias utilizadas com o propósito de descobrir novas substâncias químicas que possam ser usadas em medicina curativa ou preventiva, de tal forma que se tornem mais eficientes no tratamento patológico e menos onerosos para aqueles que o pesquisam (KOROLKOVAS, 1982). Uma das metodologias mais eficientes no estudo do desenvolvimento de novos fármacos é o método de correlação quantitativa entre estrutura química e atividade biológica (QSAR), pois abrange fatores que governam a ação dos fármacos, como as propriedades lipofílicas e estereoelétricas da molécula bioativa (TOPLISS, 1993).

Sabe-se que, para um fármaco apresentar atividade biológica, é necessário que possua determinadas propriedades físico-químicas que permitirão passar por três fases que estão compreendidas na ação de um fármaco: farmacêutica, farmacocinética e a farmacodinâmica, como se observa na Figura 18 (FERREIRA & KOROLKOVAS, 1980).

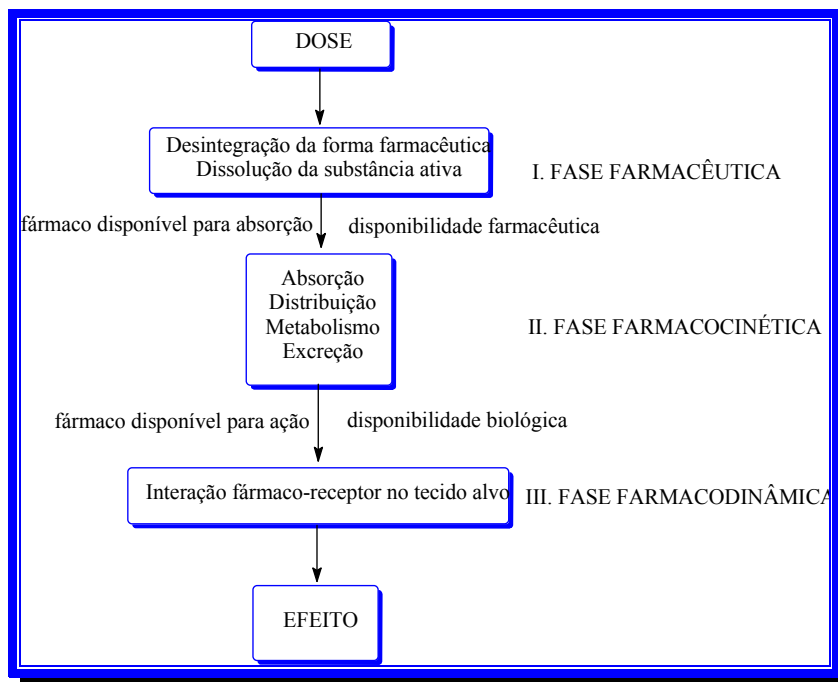


Figura 18. As três fases importantes da ação dos fármacos, adaptada da referência FERREIRA & KOROLKOVAS, 1980.

As propriedades físico-químicas são de fundamental importância na fase farmacodinâmica da ação dos fármacos, etapa de reconhecimento molecular, uma vez que sua afinidade pelo seu bio-receptor é dependente do somatório das forças de interação dos grupamentos farmacofóricos com sítios complementares da biomacromolécula.

Adicionalmente, a fase farmacocinética, que engloba os processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção, repercutindo diretamente na biodisponibilidade e no tempo de meia-vida do fármaco na biofase, também pode ser drasticamente afetada pela variação das propriedades físico-químicas de um fármaco.

Considerando que a grande maioria dos fármacos é absorvida passivamente, tendo que transpor a bicamada lipídica que constitui o ambiente hidrofóbico das membranas biológicas (Figura 19), destaca-se a importância das propriedades físico-químicas, como por exemplo, $\log P$ e pK_a , para que o fármaco atinja concentrações plasmática capazes de reproduzirem o efeito biológico evidenciado em experimentos *in vitro* (BARREIRO & FRAGA, 2001).

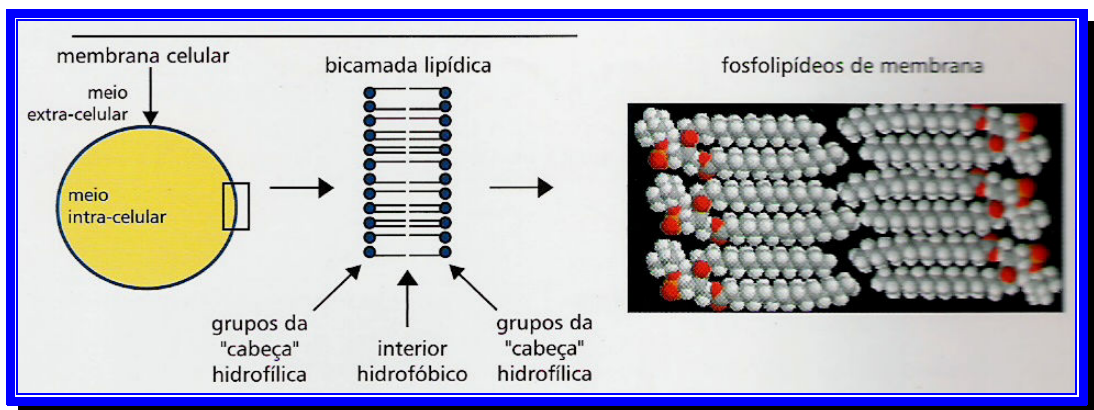


Figura 19. Bicamada lipídica das membranas biológicas (BARREIRO & FRAGA, 2001).

1.4.1.1 Lipofilicidade

A lipofilicidade pode ser expressa pelo coeficiente de partição de uma substância entre a fase aquosa e a fase orgânica. O conceito atualmente aceito para o coeficiente de partição (P) pode ser definido pela razão entre a concentração da substância na fase orgânica (C_{org}) e sua concentração na fase aquosa (C_{aq}) em um sistema de dois compartimentos sob condições de equilíbrio, como mostra a Figura 20 (TEIJEIRO *et al.*, 2000).

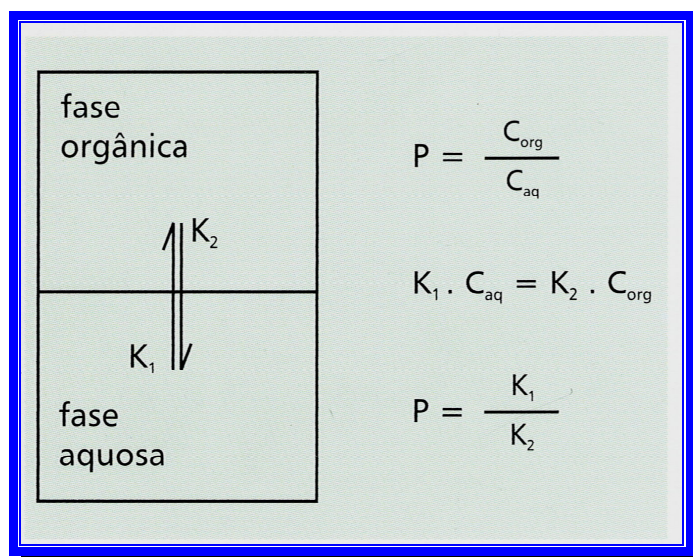


Figura 20. Determinação do coeficiente de partição (P) de uma substância (BARREIRO & FRAGA, 2001).

Os fármacos que apresentam maior coeficiente de partição, ou seja, têm maior afinidade pela fase orgânica, tendem a ultrapassar com maior facilidade as biomembranas hidrofóbicas, apresentando melhor perfil de biodisponibilidade, que pode refletir um melhor perfil farmacológico.

O coeficiente de partição (P) é tradicionalmente determinado pelo método do “shake-flask”, empregando n-octanol como fase orgânica devido à sua semelhança estrutural com os fosfolípidos de membrana. Os valores do logaritmo do coeficiente de partição ($\log P$) são normalmente correlacionados com a atividade biológica (DONOVAN & PESCATORE, 2002).

Um método bastante utilizado em laboratório para determinação do coeficiente de partição é o método do “shake-flask” (Hansch, 1963). Este método baseia-se na determinação da concentração de uma substância por método analítico, colocada em uma mistura bifásica de solventes (octanol/água), e após agitação determina-se a concentração do soluto, que ao atingir o equilíbrio encontra-se distribuída nestas duas fases, orgânica e aquosa, não miscíveis entre si. Porém, este método apresenta alguns aspectos negativos, que podem levar à resultados com alguns problemas, dentre eles podemos considerar o tempo prolongado de experimento, presença de impurezas na substância analisada, necessidade de uma pré-saturação de ambas as fases, formação de micelas e emulsões na fase aquosa, solubilidade parcial no solvente de escolha, possível instabilidade do soluto no solvente, dentre outros.

Devido a estes inconvenientes, surgiu a necessidade de buscar metodologias mais confiáveis e rápidas para determinação da lipofilicidade. Uma destas metodologias se baseia na cromatografia, onde se destacam a cromatografia em camada fina e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ambas em fase reversa (BRAUMANN & GRIMME, 1981).

As vantagens do uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em fase reversa, incluem aplicabilidade para compostos com alta hidrofobicidade, redução de perda de compostos voláteis, sua sensibilidade e reprodutibilidade. Esta metodologia utiliza como fase estacionária a sílica quimicamente ligada à hidrocarbonetos, principalmente o octadecil (C-18), sendo esta responsável pelo retardo do movimento da substância através da coluna. Quanto mais lipofílica a substância, maior o seu tempo de retenção. Na fase móvel, utiliza-se solventes, sendo um orgânico, como por exemplo, metanol, e um solvente aquoso, geralmente um tampão (POLLIEN & ROBERTS, 1999).

Devido a boa correlação entre $\log P$ e o logaritmo do fator de capacidade, k' , que é determinado baseando-se no tempo de retenção da substância em estudo, equação 1, onde t_r é

o tempo de retenção da substância analisada e t_0 é o tempo de retenção do solvente (sem a presença da droga), este vem sendo utilizado como parâmetro para quantificar a hidrofobicidade (BRAUMANN & GRIMME, 1981; POLLIEN & ROBERTS, 1999).

$$k' = (t_r - t_0)/t_0 \quad \text{Equação 1}$$

Geralmente, correlações lineares são obtidas entre os valores de $\log k'$ e as concentrações da fase móvel. Estas, quando extrapoladas a 100% da concentração da fase aquosa, originam os valores de $\log k_w$, conforme equação 2, sendo que estes valores são considerados como os mais apropriados na determinação da lipofilicidade, pois em geral se correlacionam experimentalmente com os valores de $\log P$, como mostra a equação 3 (YAMAGAMI & TAKAO, 1993; VALKÓ & SLÉGEL, 1993).

$$\log k_w = a + b (\% \text{ tampão}) \quad \text{Equação 2}$$

$$\log k_w = a \log P + b \quad \text{Equação 3}$$

Apesar das inúmeras vantagens apresentadas por esta metodologia quando comparado com o método “shake flask”, algumas limitações estão presentes no processo cromatográfico adotado, por exemplo, a restrição de se trabalhar numa faixa de pH que varia de 2,0 a 8,0, fora da qual a fase móvel pode dissolver a sílica, temos também a possibilidade de que ocorra a influência de outros fatores, além da interação hidrofóbica. Um deles é o efeito de grupos silanóis livres na fase estacionária, por recobrimento incompleto da sílica, interagindo com os derivados e alterando assim os resultados analisados.

Hansch e colaboradores demonstraram que $\log P$ é uma propriedade aditiva e possui um considerável caráter constitutivo. Por analogia à equação de Hammett, que utiliza derivados benzóicos substituídos, foi definida a constante hidrofóbica do substituinte π_x , equações 4 e 5 (HANSH *et al.*, 1963).

$$\pi_x = \log (P_x/P_H) \quad \text{Equação 4}$$

$$\pi_x = \log P_X - \log P_H \quad \text{Equação 5}$$

Onde: π_x = constante hidrofóbica do substituinte,

P_X = coeficiente de partição da substância substituída

P_H = coeficiente de partição da substância não substituída.

Assim, o coeficiente de partição ($\log P_X$) de um derivado funcionalizado com um substituinte X, pode ser calculado empregando-se a equação 6.

$$\log P_X = \log P_H + \pi_x \quad \text{Equação 6}$$

A lipofilicidade global de uma molécula aromática polissubstituída pode ser estimada por uma combinação das contribuições dos substituintes (π) e a interação cruzada entre estes. Esta interação reflete o efeito da ligação de hidrogênio em função das propriedades eletrônicas (σ) e a susceptibilidade para a ligação hidrogênio (ρ) entre cada par de substituintes (SCHMIDT, 1994).

Os trabalhos de Hansh mostraram várias correlações envolvendo coeficientes de partição e a atividade biológica. Vários efeitos biológicos do soluto, incluindo sua permeabilidade através da membrana celular, sofrem um aumento ou redução, em função de seus coeficientes de partição em octanol/água. Tais comportamentos geralmente exibem um modelo matemático parabólico, conforme a equação 7 (HANSCH & CLAYTON, 1973).

$$\log 1/C = a_0 + a_1 \log P + a_2(\log P)^2 \quad \text{Equação 7}$$

Matematicamente, tal dependência parabólica entre $\log P$ e algum tipo de atividade biológica medida através da concentração molar (C), de uma série de substâncias provocando uma resposta biológica padrão, tais como DE_{50} ou DL_{50} , podem ser obtidas assumindo que a probabilidade de um fármaco atingir o sítio ativo, é distribuída em relação ao $\log P$, em torno de um $\log P$ ideal. Se o $\log P$ ideal está fora da faixa estudada, uma relação linear pode ser freqüentemente observada, equação 8 (BRITTO, 2000).

$$\log 1/C = a_0 + a_1 \log P \quad \text{Equação 8}$$

Desta forma, a relação entre a estrutura e atividade biológica pode gerar modelos quantitativos. Por exemplo, o trabalho de Summers e colaboradores, descreveu a correlação significativa da hidrofobicidade e da natureza eletrônica dos substituintes com a potência inibitória de uma série de ácidos arilidroxâmicos (Figura 21) sobre a enzima 5-lipoxigenase (SUMMERS *et al.*, 1982).

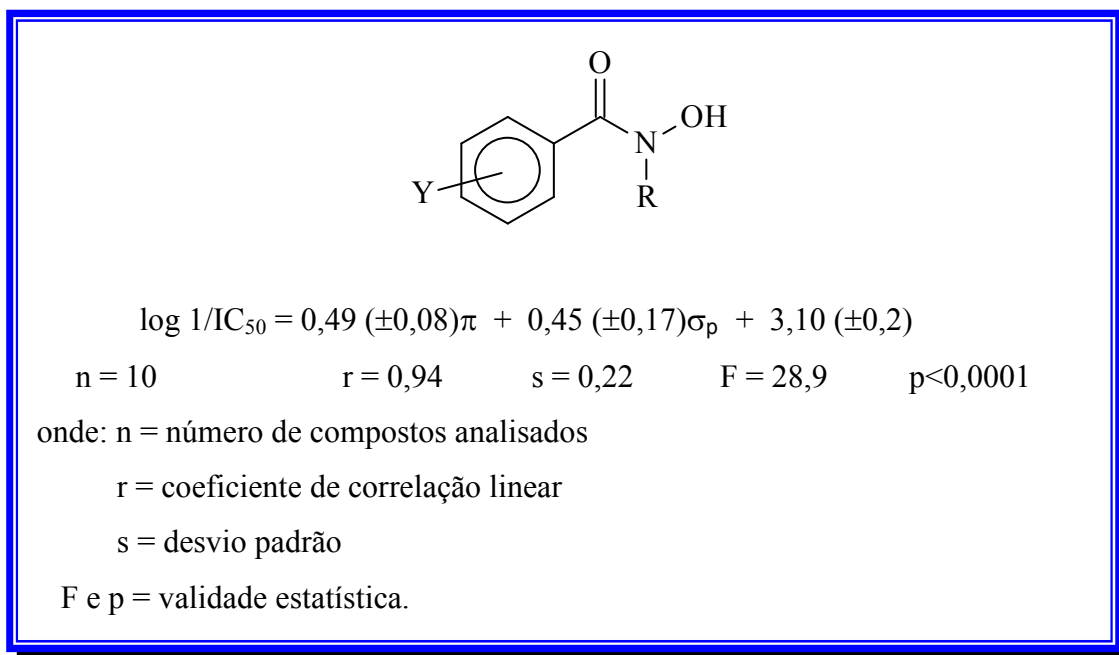


Figura 21. Modelo matemático que correlaciona a atividade de ácidos arilidroxâmicos sobre a enzima lipoxigenase.

1.4.2 Parâmetros estereoelétrônicos

A influência de um grupo nas propriedades químicas e físicas de uma molécula, considerando uma série homóloga é conhecida como efeito do substituinte que poderá ser de natureza eletrônica, estérica ou estereoelétrica. A natureza do substituinte de uma molécula bioativa influencia tanto na biodisponibilidade da droga quanto na sua interação com uma macromolécula (enzima ou receptor), pelo fato de existirem parâmetros eletrônicos e estéricos contribuindo diretamente nestes processos (FUJITA *et al.*, 1964).

O efeito eletrônico, que envolve o efeito indutivo e ressonância, devido a determinados grupos doadores ou receptores de elétrons exerce uma das principais influencias sobre o processo de partição. Grupos receptores de elétrons podem contribuir para aumentar a lipofilia da molécula, uma vez que podem diminuir a disponibilidade dos elétrons não ligantes em formar ligações de hidrogênio, resultando na redução da afinidade da molécula pela fase

aquosa e, conseqüentemente, aumentando a sua lipofilia. Por outro lado, substituintes doadores de elétrons podem contribuir para diminuir a lipofilia da molécula (BRITTO, 2000).

Na década de trinta, numa das primeiras tentativas para quantificar estes efeitos, Hammett notou que substituintes mudam sistematicamente a energia livre de dissociação protônica de ácidos benzóicos e a energia livre de hidrólise de benzoatos de etila. Destes estudos Hammett desenvolveu uma série de valores que correspondem aos efeitos eletrônicos chamados de constantes dos substituintes (σ), os quais podem ser usados como um instrumento para prever as propriedades reativas em outros compostos aromáticos substituídos (GÁUDIO, 1996).

Na equação de Hammett estão relacionadas as constantes de ionização dos ácidos benzóicos *meta* e *para* substituídos a 25°C, onde ρ é a constante de reação e σ_X é constante do substituinte que expressa o efeito eletrônico sobre o processo de ionização. A constante de ionização do ácido benzóico não substituído é representada por K_H enquanto que K_X corresponde aos respectivos ácidos *meta* e/ou *para* substituídos (equação 9).

$$\log K_X = \rho \sigma_X + \log K_H \quad \text{Equação 9}$$

O coeficiente angular da equação de Hammett, proveniente do gráfico entre $\log K$ versus σ , corresponde a constante de reação ρ que representa a sensibilidade do centro reacional aos efeitos eletrônicos exercidos pelo substituinte X. O sinal positivo de ρ indica que o centro reacional é mais susceptível a grupos retiradores de elétrons e, o sinal negativo, a grupos doadores de elétrons (ISAACS, 1985).

Examinando as tabelas da literatura que apresentam os valores de σ , fica evidente que estes se correlacionam com o conceito qualitativo sobre efeitos retiradores e doadores de elétrons de seus correspondentes substituintes, isto é, eles implicitamente contêm informações da estrutura eletrônica. Para grupos retiradores de elétrons os valores mostram $\sigma > 0$, em oposição grupos doadores de elétrons possuem $\sigma < 0$ (VEDOVA-BROOK *et al.*, 2004).

O efeito estérico de um determinado substituinte também pode provocar variações nos valores de π . Por exemplo, a proteção de um par de elétrons, susceptível a formar ligação de hidrogênio, provoca um aumento na lipofilia da molécula. As ligações de hidrogênio intramoleculares favorecidas por certas conformações ou posições dos grupos funcionais contribuem para o aumento da lipofilia de determinados compostos. No caso de compostos aromáticos, o efeito estérico pode contribuir para retirar do plano do anel, grupos que

possuam pares de elétrons capazes de formar ligação de hidrogênio, como os grupos carboxila. Com isso, os elétrons não ficam comprometidos com a ressonância favorecendo as ligações de hidrogênio e conseqüentemente reduzindo a lipofilia.

Em relação aos efeitos estéricos, Taft quantificou as propriedades estéricas dos substituintes próximas ao centro reacional, definindo a constante estérica (E_s) baseando-se na hidrólise ácida de ésteres alifáticos. A constante de Taft (E_s) é definida pela equação 10, onde k_H e k_X correspondem as constantes de velocidade da hidrólise do derivado não substituído e do substituído, respectivamente (MARTINS, 1995).

$$E_s = \log(k_X / k_H) \quad \text{Equação 10}$$

Posteriormente, uma série de estudos levou à diversas equações baseadas no trabalho de Hammett, atualmente, ainda continua a motivar a procura por outras propriedades correlacionadas aos parâmetros dos substituintes. Resultados recentes correlacionam explicitamente efeitos físicos observáveis aos valores dos parâmetros dos substituintes, incluindo medidas experimentais de: deslocamento químico de RMN, parâmetros eletroquímicos, momento dipolar, distância de ligação de hidrogênio, afinidade eletrônica e estabilidade de radicais livres aromáticos, entre outros. Cálculos teóricos também têm sido reportados e correlacionados ao efeito do substituinte como: entalpia, energia de dissociação de ligação e energias dos orbitais moleculares de fronteira (HOMO e LUMO), entre outros (VEDOVA-BROOK *et al.*, 2004).

1.4.3 Parâmetros eletrônicos teóricos

Com o melhor desempenho apresentado pelos computadores nas últimas décadas, vem crescendo o interesse por um conjunto de técnicas denominadas de modelagem molecular.

A base da modelagem molecular está em relacionar todas as propriedades moleculares importantes, ou seja, estabilidade, reatividade e propriedades eletrônicas relativas a estrutura.

Dentro da modelagem molecular, existem três principais categorias de cálculos teóricos: método de orbital molecular *ab initio*, método de orbital molecular semi-empírico e cálculo de campo de força empírico, também conhecido como mecânica molecular.

A mecânica molecular é um dos métodos que, principalmente por razões de simplicidade metodológica e eficiência, tem sido o mais utilizado para modelar estruturas

moleculares e calcular energias conformacionais em química e bioquímica (COELHO *et al.*, 1999).

O modelo da mecânica molecular considera as moléculas como uma coleção de átomos ligados entre si por forças elásticas ou harmônicas. Estas forças são descritas pelas funções de energia potencial das contribuições estruturais, como comprimento de ligação (estiramento), ângulos de ligação (deformação angular), ângulos diedro (rotação de ângulos diedros) e as interações não ligantes (interações de átomos que não estão diretamente ligados). O conjunto destas funções é conhecido como campo de força empírico, sendo que este representa a energia potencial molecular em relação a uma geometria de referência, em um determinado sistema de coordenadas.

A equação 11 mostra a energia potencial total de uma molécula em função de somatórios das contribuições de energias estruturais.

$$E^{\text{total}} = \sum_i E_i^{\text{estiramento}} + \sum_i E_i^{\text{deformação}} + \sum_i E_i^{\text{rotação interna}} + \sum_i E_i^{\text{interações não ligantes}} \quad \text{Equação 11}$$

Onde o parâmetro E^{total} é conhecido como energia total da molécula. Muitos desses campos de força encontram-se implementados em programas computacionais com interface gráfica, que facilitam a preparação dos arquivos de entrada para os cálculos de mecânica molecular. Como exemplo podem ser citados o SPARTAN, Chem-3D-MM2 e o PCModel-MMX (GAUDIO, 2006).

Os métodos *ab initio* e semi-empíricos fazem parte dos pacotes de programas quânticos. Estes métodos são eficientes com relação aos resultados obtidos, mas computacionalmente mais lentos e aplicáveis à moléculas menores. Os métodos semi-empíricos fornecem todas as propriedades possíveis de se obterem com os métodos *ab initio*, entretanto, parte dos seus parâmetros é ajustada a dados experimentais (BARREIRO *et al.*, 1997).

Nas aproximações dos métodos semi-empíricos os núcleos dos átomos são assumidos em sucessivas posições estacionárias, sobre as quais a distribuição espacial ótima dos elétrons é calculada pela resolução da equação de Schrödinger, Equação 12, na qual a função de onda Ψ é uma função das coordenadas dos núcleos R e dos elétrons r. O autovalor correspondente a energia do sistema no estado considerado é dado por E, e H é o hamiltoniano, um operador diferencial, que representa a energia cinética e potencial das partículas dos sistemas. O

processo é repetido até que a energia não mais varie dentro de um limite escolhido, ou seja, até se alcançar um ponto estacionário da superfície de energia.

$$H \Psi (R,r) = E \Psi (R,r) \quad \text{Equação 12}$$

Os métodos AM1 (Austin Model 1) e PM3 (parametric method 3), ambos semi-empíricos, são os últimos de uma série de métodos desenvolvidos, e são parte do pacote denominado MOPAC. O método PM3 apresenta as mesmas aproximações e equações que o método AM1. A diferença básica está no procedimento de parametrização, diferindo no cálculo de propriedades de substâncias hipervalentes ou contendo halogênios (DEWAR *et al.*, 1985).

1.5 Avaliação da Atividade Citotóxica por Colorimetria

A avaliação da atividade citotóxica pode ser realizada utilizando-se diversas metodologias. Neste trabalho de tese optou-se pelo método de Mosmann, por envolver ensaios relativamente rápidos, quantitativos e de fácil execução.

O método Mosmann baseia-se na utilização de um substrato sem cor (ou de cor pouco intensa), que é modificado em produto colorido (ou de cor mais intensa) frente somente a células viáveis, sendo quantificado espectrofotometricamente (MOSMANN, 1983).

Neste sentido escolheu-se como substrato o sal tetrazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), que quantifica a atividade de várias desidrogenases mitocondriais, através de sua redução originando uma formazana colorida.

O MTT é um agente oxidante passando de coloração amarelo-pálido, em solução aquosa, para violáceo-marrom quando reduzido à formazana. A alteração molecular do acceptor artificial de elétrons, após a redução, é mostrada na Figura 22.

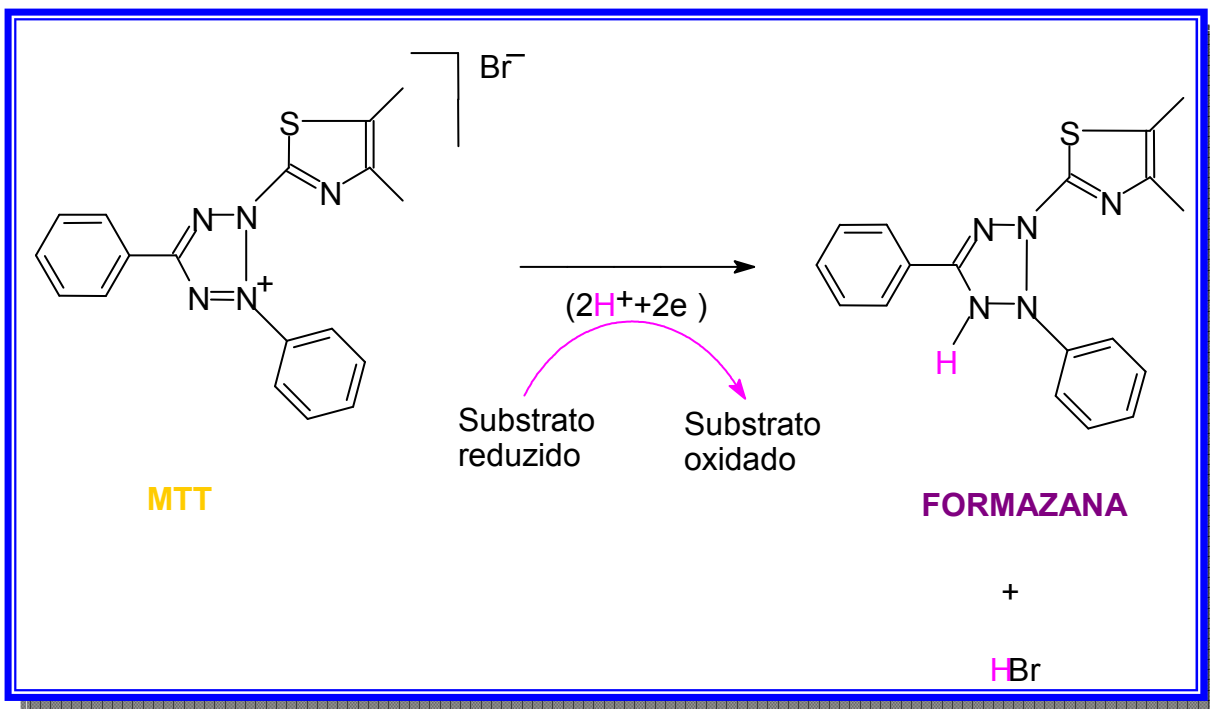


Figura 22. MTT sendo reduzido por célula viável e formando a formazana.

A concentração de formazana formada é medida através de espectroscopia na região do visível e a determinação da absorbância, a $\lambda=570$ nm, é diretamente proporcional ao número de células viáveis. O Gráfico 1 mostra esta proporcionalidade.

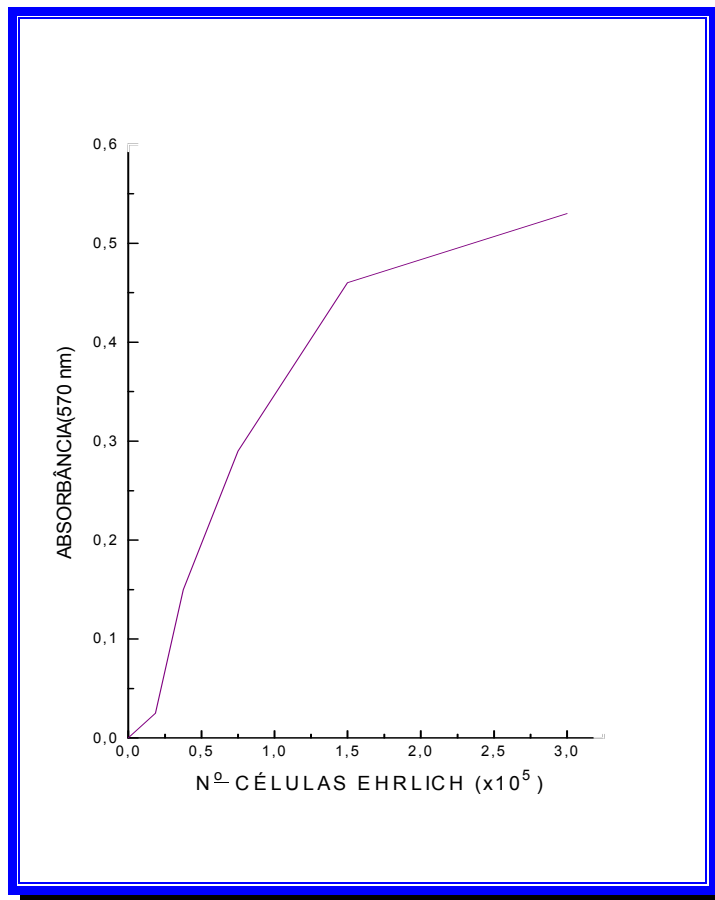
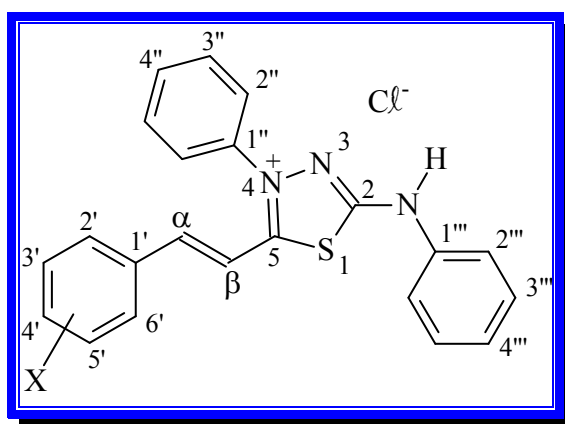


Gráfico 1: Absorbância obtida com a solução de MTT frente a células de Ehrlich.

2 OBJETIVOS

1. Sintetizar cloridratos dos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio, contendo o grupo X-cinamoíla ligado ao carbono C-5 do anel heterocíclico, onde X = hidrogênio, 4'-metil, 4'-metóxi, 4'-etóxi, 4'-nitro, 4'-flúor, 4'-cloro, 4'-bromo, 4'-ciano, 4'-hidróxi, 2',4'-diflúor, 3',4'-dicloro, 3'-metóxi, 3'-cloro, 3'-bromo e 3'-nitro.



2. Caracterizar os cloridratos mesoiônicos utilizando, principalmente, técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C .
3. Avaliar a quimiossensibilidade das células do tumor de Ehrlich frente aos mesoiônicos.
4. Avaliar a atividade antitumoral dos compostos em estudo, em ensaio *in vivo* frente ao carcinoma de Ehrlich.
5. Testar a capacidade inibitória *in vitro* dos compostos, em relação as enzimas DNA-topoisomerasas I e II- α .
6. Avaliar a atividade dos cloridratos mesoiônicos sintetizados frente à leishmania.
7. Determinar os parâmetros hidrofóbicos dos cloridratos mesoiônicos, utilizando CLAE.

8. Modelar as estruturas dos cloridratos mesoiônicos utilizando o método semi-empírico PM3, visando a determinação dos parâmetros eletrônicos teóricos..

9. Realizar o estudo das correlações entre a estrutura x atividades biológicas, em função dos parâmetros eletrônicos teóricos e hidrofóbicos determinados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Aparelhos

- i) Os espectros de RMN foram confeccionados em espectrômetro Bruker modelo AC 200 (200 MHz, ^1H e 50,3 MHz, ^{13}C) e, espectrômetro Varian modelo Unity plus-300 (299,95 MHz, ^1H e 75,42 MHz, ^{13}C);
- ii) Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer 1605 com transformada de Fourier;
- iii) Os pontos de fusão foram determinados utilizando-se o aparelho MEL-TEMP II e não foram corrigidos;
- iv) Espectrofotômetros DMS 80 da Varian e leitora de microplacas ELISA Metrolab 980 com filtro de 570nm;
- v) Autoclave;
- vi) Câmara de fluxo laminar contínuo estéril;
- vii) Câmara de CO_2 Shel Lab 2123TC;
- viii) Microscópio Carl Zeiss para contagem de células;
- ix) Balança de precisão OHAUS;
- x) Transiluminador Vilber Lourmart TFX-20;
- xi) Aparelho de eletroforese Elettrophoresis Power Supply da Pharmacia EPS 600;
- xii) Câmera fotográfica digital da Cássio;
- xiii) Cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, modelo SPD – 10A, equipado com detector de absorção no ultravioleta e visível.

3.1.2 Reagentes e solventes

- i) Pastilhas de KBr foram usadas como meio para obtenção dos espectros de Infravermelho;
- ii) Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se acetona- d_6 ou DMSO- d_6 , como solventes;

iii) Todos os solventes utilizados na determinação espectrofotométrica UV/Vis, foram de grau espectroscópico, sendo o etanol, acetonitrila, diclorometano, isopropanol e acetona da marca Vetec. Já o acetato de etila, clorofórmio, 1,4-dioxana, metanol, tolueno e 1-butanol, foram do grupo Química, enquanto o benzeno, 1,2-dicloro-etano e a N,N-dimetilformamida da Merck;

iv) Solventes utilizados nas sínteses, recristalizações e cromatografia em camada fina foram todos de grau P.A., sendo eles:

- Metanol (Vetec)
- Clorofórmio (Químex)
- 1,4-dioxano (Quimibras)
- Tolueno anidro (G. Química)
- Éter etílico (Vetec)
- Hexano (Químex)
- Etanol (G. Química)
- Acetona (Merck)

v) Reagentes utilizados nas sínteses dos intermediários e compostos mesoiônicos:

- Isotiocionato de fenila (Merck)
- Fenilidrazina (Aldrich)
- Piridina (G. Química)
- Piperidina (Merck)
- Ácido malônico (Aldrich)
- Cloreto de tionila (Merck)
- Benzaldeído (Carlo Erba)
- *p*-metoxibenzaldeído (J. T. Baker Chemical Co.)
- *p*-nitrobenzaldeído (Aldrich)
- *p*-clorobenzaldeído (Aldrich)
- *p*-fluorobenzaldeído (Aldrich)
- *p*-bromobenzaldeído (Aldrich)
- *p*-hidroxibenzaldeído (Aldrich)
- *p*-cianobenzaldeído (Aldrich)
- *p*-metilbenzaldeído (Aldrich)
- *p*-etoxibenzaldeído (Aldrich)

- *m*-bromobenzaldeído (Aldrich)
- *m*-clorobenzaldeído (Aldrich)
- *m*-metoxibenzaldeído (Aldrich)
- *o*-metoxibenzaldeído (Aldrich)
- *m,p*-diclorobenzaldeído (Aldrich)
- *o,p*-difluorobenzaldeído (Aldrich)
- *m*-nitrobenzaldeído (Aldrich)

vi) DNAs e enzimas:

- DNA do timo de bezerro – SIGMA;
- DNA de fago ϕ X174(RF-1) – SIGMA;
- DNA de plasmídeo pBR322 – Pharmacia;
- DNA – Topoisomerasas I e II- α - kit da TopoGEN, Inc.;

vii) Meio de cultura, reagentes, soluções e solventes utilizados nos ensaios biológicos, das marcas Aldrich, Merck e Sigma:

- RPMI 1640, estreptomicina e penicilina da SIGMA, soro fetal bovino (SFB) da BIO RIO;
- RPMI completo: RPMI contendo β -mercaptoetanol 50 μ M, penicilina 60 μ g/mL, estreptomicina 100 μ g/mL e SFB 5-10%;
- Dimetilsulfóxido (DMSO) da Aldrich;
- Fenol e trishidroxiaminometilmetano (Tris);
- Albumina bovina acetilada;
- Albumina bovina fração V;
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio (MTT);
- Brometo de etídio;
- Dodecilsulfato de sódio (SDS);
- Fluoreto de fenil-metil-sulfonila (PMSF);
- Óleo mineral;
- Proteinase K;
- Triton X-100;
- Etoposida;
- Campotecina;

- Azul de bromofenol;
- Glicerol
- Tampão TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M pH 8,5)
- Tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0, EDTA 1mM)
- Tampão de reação para topo I (Tris-HCl 200 mM, KCl 1000 mM, EDTA 100 mM, Albumina 3mg/mL e MgCl₂ 1000 mM)
- Solução de SDS (4 µL SDS 5%, 4 µL glicerol 50% e 4 µL azul de bromofenol)

viii) Células tumorais:

Foram utilizadas células do carcinoma de Ehrlich na forma ascítica, extraídas do peritônio de camundongos SW ou singênicos C57BL/10.

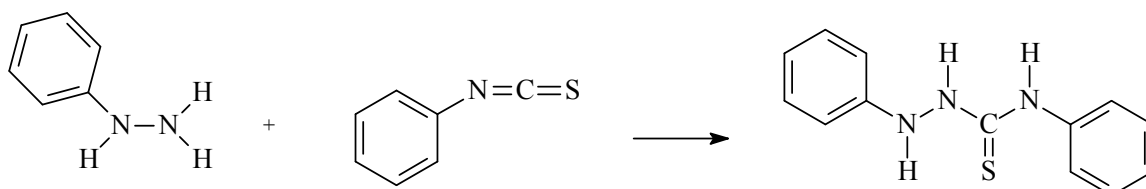
3.1.3 Animais

Camundongos suíços (SW) e camundongos singênicos C57BL/10 de ambos os sexos, sendo obtidos no Biotério do Instituto Nacional do Câncer e do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

3.2 Métodos

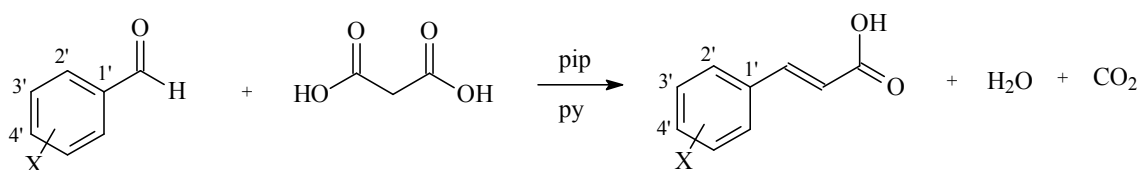
3.2.1 Síntese

3.2.1.1 Síntese da 1,4-difeniltiossemicarbazida



Foram adicionados 70 mL de tolueno anidro e 53 mmols de isotiocianato de fenila, em um balão de duas bocas de 250 mL equipado com funil de adição e condensador de refluxo com tubo de cloreto de cálcio na extremidade. Levou-se a solução ao refluxo e adicionou-se aos poucos 53 mmols de fenilidrazina, através do funil de adição. O produto formado instantaneamente, precipitou no fundo do balão em forma de flocos brancos e posteriormente foi filtrado à vácuo, sendo lavado com tolueno e éter etílico. O rendimento apresentou-se satisfatório 80% com ponto de fusão 175 – 176 °C (SANTOS, 1993).

3.2.1.2 Síntese dos ácidos E-X-cinâmicos



Em balão de fundo redondo conectado a condensador de refluxo foram adicionados 50 mmols do benzaldeído de escolha, 100 mmols do ácido malônico, 20 mL de piridina e 0,4 mL de piperidina. A mistura foi mantida a temperatura de 90°C durante duas horas, depois por mais quinze minutos sob refluxo e posteriormente acidificada por uma solução de HCl (20 %, v/v), com precipitação imediata dos cristais que foram filtrados, lavados com uma solução de HCl (20 %, v/v) e depois com água.

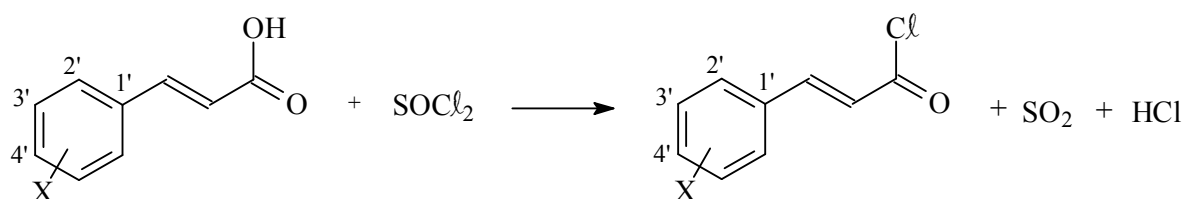
Os ácidos foram recristalizados em hexano e etanol (30:70, v/v). A Tabela 1 mostra os pontos de fusão e rendimentos obtidos.

Tabela 1. Pontos de fusão e rendimentos obtidos para os ácidos E-X-cinâmicos.

X	Ponto de Fusão (°C)	Rendimento (%)
H	132-133 (133-134) ^a	79
4'-OMe	172-173 (173,5) ^a	82
4'-NO ₂	287-288 (289) ^a	85
4'-Me	195 (196-198) ^a	91
4'-CN	254-255	87
4'-Cl	248 (248-250) ^a	85
4'-F	207 (209-210) ^a	78
4'-OH	211-213 (214) ^a	75
4'-OEt	193-195 (195-199) ^a	83
2',4'-diF	217-218 (216-218) ^a	71
3',4'-diCl	220 (218-220) ^a	68
3'-OMe	115-117 (116-119) ^a	75
3'-Cl	163-165 (161-164) ^a	79
3'-Br	175-177 (177-179) ^a	82
2'-OMe	185-187 (183-186) ^a	77
3'-NO ₂	198-199 (200-202) ^a	70

^a www.sigma-aldrich.com

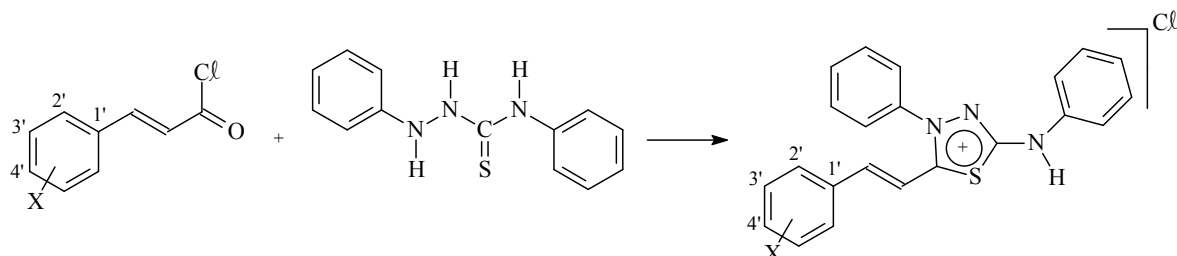
3.2.1.3 Síntese dos cloretos de cinamoíla substituídos



A 12 mmols de ácido cinâmico substituído, foram adicionados 4,5 mL (excesso) de cloreto de tionila. A reação foi mantida a uma temperatura de aproximadamente 50°C durante 4 horas. Ao balão foi adaptado um condensador de refluxo com um tubo na extremidade contendo cloreto de cálcio.

O excesso de cloreto de tionila foi destilado à pressão reduzida e o produto obtido (sólido) utilizado imediatamente sem tratamento de purificação.

3.2.1.4 Síntese dos cloretos de 4-fenil-5-[X-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina



A uma suspensão de 12 mmols de 1,4-difeniltiossemicarbazida em 15 mL de 1,4-dioxana, adicionou-se uma solução de cloreto de cinamoíla X-substituído (12 mmols) em 1,4-dioxana. Após 24 horas de agitação, deixou-se a solução em repouso por alguns instantes e em seguida filtrou-se o produto obtido. O precipitado de tom amarelo foi lavado com 1,4-dioxana anidra e em seguida com éter etílico anidro.

Os sais foram recristalizados em clorofórmio:etanol (60:40, v/v). A Tabela 2 indica os pontos de fusão e rendimentos obtidos.

Tabela 2. Pontos de fusão e rendimentos obtidos para os sais dos compostos mesoiônicos.

Sais Mesoiônicos X	Pontos de Fusão (°C)	Rendimento (%)
H	266-267	68
4'-Me	267-268	73
4'-OMe	195-196	82
4'-NO ₂	232-233	89
4'-F	252-253	85
4'-Cl	264-265	83
4'-Br	283-285 ^a	70
4'-CN	185	82
4'-OH	204-205	65
4'-OEt	148-150 ^a	85
2'-OMe	233-234 ^a	73
2',4'-diF	270-271 ^a	76
3',4'-diCl	259-260 ^a	71
3'-OMe	284-285	68
3'-Cl	261-263 ^a	72
3'-Br	263-264 ^a	80
3'-NO ₂	184-185	73

^aCompostos inéditos

3.2.1.4.1 Dados espectrométricos para os compostos mesoiônicos sintetizados

i) Cloreto de 4-fenil-5-cinamoil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 139-141)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3430 (ν N-H); 3055 (ν C-H aromático e/ou ν C-H vinílico); 2669 (ν C=NH-); 1607 (ν C=C vinílico); 1565 (ν C=N); 1536, 1498 e 1449 (ν C=C aromático); 1327 (ν C-S); 955 (δ C-H vinílico); 747 e 691 (δ_{Ar} C-H no plano-5H viz.).

RMN ^{13}C e ^1H

Tabela 3. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = H (50 MHz; DMSO- d_6).

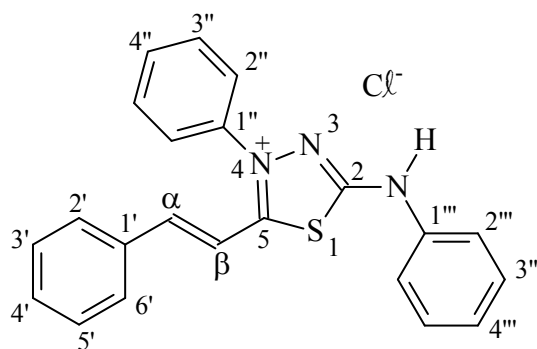
δ (ppm)	C
163,94*	5
159,24	2
147,84	α
137,04	1''
134,32	1'
133,88	4''
131,94	4'
130,50	2' e 6'
130,22	3'' e 5''
129,59	3''' e 5'''
129,27	3' e 5'
126,18	2'' e 6''
124,23	4'''
118,73	2''' e 6'''
111,62	β
n.o.	1'''

*observado em outro espectro

n.o. não observado

Tabela 4. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = H (200 MHz; DMSO- d_6).

δ (ppm)	H	J (Hz)
12,25 (s)	NH	---
8,01 (d)	α	16,1
7,83-7,43 (m)	aromático	---
7,07 (d)	β	16,3



ii) Cloreto de 4-fenil-5-(4'-metilcinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 142-144)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3423 (ν N-H); 3026 (ν C-H aromático e/ou ν C-H vinílico); 2663 (ν^+ C=NH-); 1609 (ν C=C vinílico); 1566 (ν C=N); 1539, 1511 e 1449 (ν C=C aromático); 1326 (ν C-S); 1175 (ν ArC-NH); 938 (δ =C-H vinílico); 797 (δ ArC-H no plano-2H viz.); 752 e 690 ($\delta_{\text{ArC-H}}$ no plano-5H viz.).

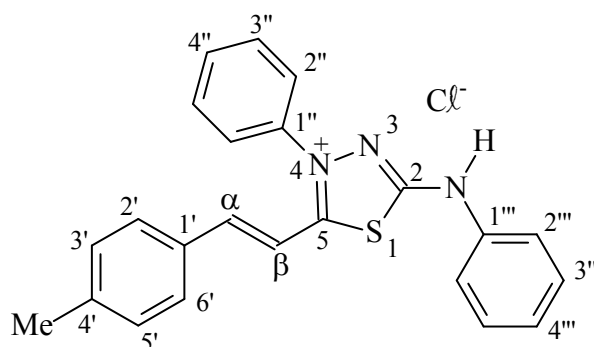
RMN ^{13}C e ^1H

Tabela 5. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 4'-Me (50 MHz; $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$).

δ (ppm)	C
162,02	5
158,36	2
149,24	α
143,64	4'
137,73	1''
136,33	1'''
131,77	4''
130,24	1'
130,03	2' e 6'
129,76	3' e 5'
128,84	3''' e 5'''
128,66	3'' e 5''
125,18	2'' e 6''
124,21	4'''
118,46	2''' e 6'''
108,63	β
21,07	Me

Tabela 6. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 4'-Me (200 MHz; DMSO-d_6).

δ (ppm)	H	J (Hz)
11,31 (s)	NH	---
7,15 (d)	α	16,2
6,99-6,32 (m)	aromático	---
6,17 (d)	β	16,2
1,5 (s)	Me	---



iii) Cloreto de 4-fenil-5-(4'-metoxicinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 145-148)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3410 (ν N-H); 3027 (ν C-H aromático e/ou ν C-H vinílico); 2969 (ν C-H alifático); 2693 (ν C=NH-); 1600, 1511 e 1450 (ν C=C aromático); 1565 (ν C=N); 1310 (ν C-S); 1253 (ν ArC-O); 1111 (ν O-CH₃); 1025 (confirmação Ar-O-R); 953 (δ =C-H vinílico); 805 (δ ArC-H no plano 2H viz.); 752 e 689 (δ ArC-H no plano 5H viz.).

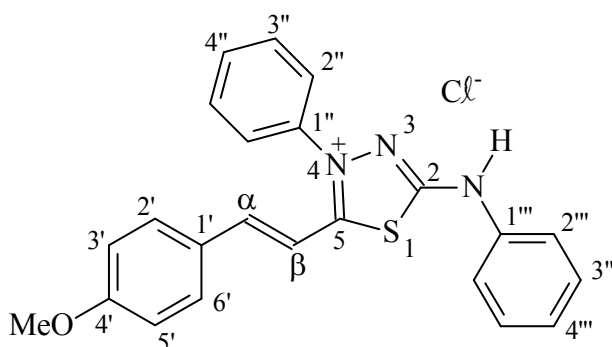
RMN ^{13}C e ^1H

Tabela 7. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 4'-OMe (50 MHz; DMSO-d₆).

δ (ppm)	C
163,28	4'
162,54	5
158,44	2
148,34	α
138,66	1''
137,05	1'''
135,22	1'
131,58	4''
130,19	3''
129,48	3'''
126,57	2'
126,21	2''
123,35	4'''
118,49	2'''
114,83	3' e 5'
108,83	β
55,66	MeO

Tabela 8. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 4'-OMe (200 MHz; DMSO-d₆).

δ (ppm)	H	J (Hz)
11,81 (s)	NH	---
7,13 (d)	α	16,0
7,01 - 6,98 (m)	Aromático	---
6,76 (d)	2' e 6'	7,8
6,55 (d)	3' e 5'	8,4
6,23 (d)	β	15,4
2,92 (s)	MeO	---



iv) Cloreto de 4-fenil-5-(4'-nitrocinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 149-153)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3410 (ν N-H); 3044 (ν C-H aromático e/ou ν C-H vinílico); 2720 (ν^+ C=NH-); 1615 (ν C=C vinílico); 1565 (ν C=N); 1522 (ν C-NO₂ e/ou C=C aromático); 1450 (ν C=C aromático); 1341 (ν simétrico N=O e ν C-S); 956 (δ =C-H vinílico); 835 (δ ArC-H no plano 2H viz.); 747 e 690 (δ ArC-H no plano 5H viz.).

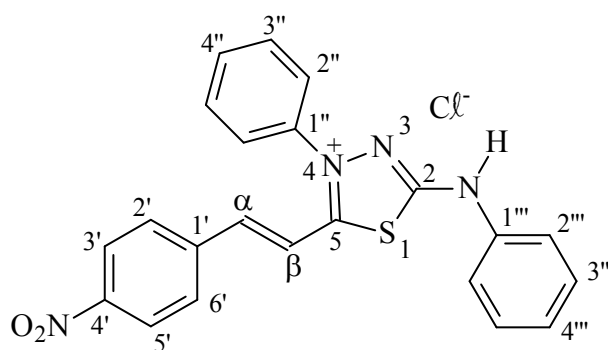
RMN ¹³C e ¹H

Tabela 9. Dados de RMN ¹³C para o mesoiônico com X = 4'-NO₂ (75 MHz; DMSO - d₆).

δ (ppm)	C
162,05	5
159,68	2
148,59	4'
144,67	α
139,99	1'
138,54	1''
137,05	1'''
131,90	4''
130,25	3'' e 5''
130,15	3''' e 5'''
129,56	2' e 6'
126,23	2'' e 6''
124,32	4'''
124,20	3' e 5'
118,71	2''' e 6'''
115,52	β

Tabela 10. Dados de RMN ¹H para o mesoiônico com X = 4'-NO₂ (300 MHz; DMSO-d₆).

δ (ppm)	H	J (Hz)
12,35 (s)	NH	---
8,396 (d)	3' e 5'	8,2
8,26 (d)	α	16,6
8,151 (d)	2' e 6'	8,3
8,00-7,87 (m)	Aromático	---
7,41 (d)	β	16,2



v) Cloreto de 4-fenil-5-(4'-fluorocinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 154-158)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3442 (ν N-H); 3007 (ν C-H aromático e/ou ν C-H vinílico); 2669 (ν^+ C=NH-); 1618 (ν C=C vinílico); 1570 (ν C=N); 1512, e 1448 (ν C=C aromático); 1315 (ν C-S); 1230 (ν ArC-F); 816 (δ ArC-H no plano-2H viz.); 742 e 686 (δ ArC-H no plano-5H viz.).

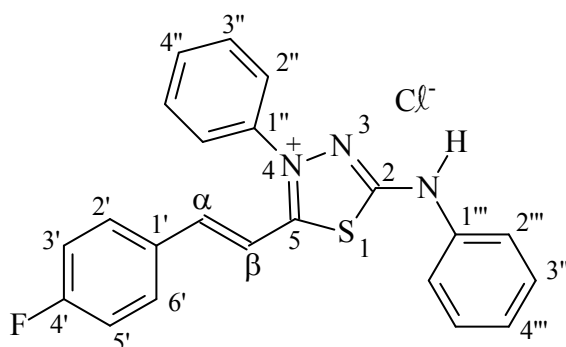
RMN ^{13}C e ^1H

Tabela 11. Dados de RMN $^{13}\text{C}^*$ para o mesoiônico com X = 4'-F (75 MHz; DMSO- d_6).

δ (ppm)	C
164,83($^1\text{J}_{\text{C-F}}=251,8$ Hz)	4'
159,04	2
146,58	α
138,69	1''
136,96	1'''
131,80	1'
131,67	4''
130,57($^3\text{J}_{\text{C-F}}=3,8$ Hz)	2' e 6'
130,16	3''' e 5'''
129,51	3'' e 5''
126,15	2'' e 6''
124,12	4'''
118,62	2''' e 6'''
116,47($^2\text{J}_{\text{C-F}}=21,9$ Hz)	3' e 5'
111,39	β
n.o.	5

Tabela 12. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 4'-F (300 MHz; DMSO- d_6).

δ (ppm)	H	J (Hz)	$^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$
12,33 (s)	NH	---	---
8,13 (d)	α	16,2	β
7,69 (d)	3' e 5'	8,4	2' e 6'
7,54 (d)	2' e 6'	8,4	---
7,99-7,25 (m)	Aromático		
7,18	β	16,2	---



*valores corrigidos, DMSO fora da escala.
n.o. não observado

vi) Cloreto de 4-fenil-5-(4'-clorocinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 159-163)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3423 (ν N-H); 3046 (ν C-H aromático e/ou ν C-H vinílico); 2653 (ν^+ C=NH-); 1615 (ν C=C vinílico); 1566 (ν C=N); 1538, 1497 e 1450 (ν C=C aromático); 1326 (ν C-S); 803 (δ ArC-H no plano-2H viz.); 755 e 690 (δ ArC-H no plano-5H viz., em 755 acrescido de ν ArC-Cl).

RMN ^{13}C e ^1H

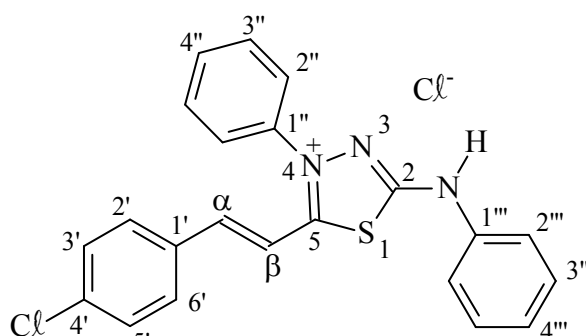
Tabela 13. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 4'-Cl (75 MHz; DMSO- d_6).

δ (ppm)	C
159,13	2
146,2	α
136,97	1'''
136,28	4'
132,76	4''
131,62	1'
130,69	3''' e 5'''
130,1	3'' e 5''
129,45	3' e 5'
129,21	2' e 6'
126,08	2'' e 6''
124,03	4'''
118,67	2'''
112,24	β
n.o.	5 e 1''

n.o. não observado

Tabela 14. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 4'-Cl (300 MHz; DMSO- d_6).

δ (ppm)	H	J (Hz)	$^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$
12,61 (s)	NH	---	---
8,11 (d)	α	16,5	β
7,91 (d)	3' e 5'	8,7	2' e 6'
7,65 (d)	2' e 6'	8,7	---
7,98-7,52 (m)	Aromático		
7,22 (d)	β	16,2	---



vii) Cloreto de 4-fenil-5-(4'-cianocinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 164-166)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3404 (ν N-H); 2932 (ν C-H aromático e/ou ν C-H vinílico); 2224 (ν C \equiv N); 1623 (ν C=C vinílico); 1564 (ν C=N); 1537, 1502 e 1420 (ν C=C aromático); 1310 (ν C-S); 980 (δ =C-H vinílico); 829 (δ ArC-H no plano-2H viz.); 760 e 689 (δ ArC-H no plano-5H viz.).

RMN ^{13}C e ^1H

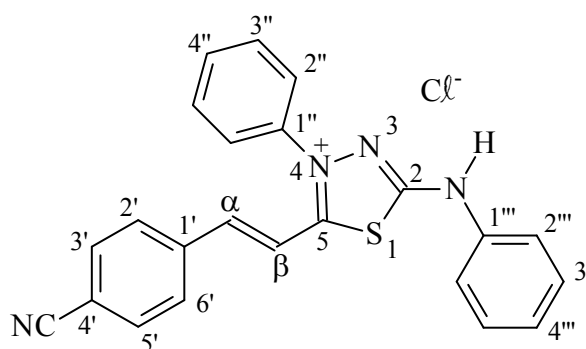
Tabela 15. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 4'-CN (50 MHz; CDCl_3 e CD_3OD).

δ (ppm)	C
161,00	5
145,38	α
137,34	1''
137,00	1'''
132,94	3' e 5'
131,54	4''
129,61	3'' e 5''
128,69	2' e 6'
128,51	3''' e 5'''
124,92	2'' e 6''
124,36	4'''
118,42	2''' e 6'''
117,3	CN
113,16	β
n.o.	2, 1' e 4'

n.o. não observado

Tabela 16. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 4'-CN (200 MHz; DMSO-d_6).

δ (ppm)	H	J (Hz)
12,741 (s)	NH	---
8,05 (d)	α	16,23
7,91-7,13(m)	Aromático	---
6,69 (d)	β	16,03



viii) Cloreto de 4-fenil-5-(4'-bromocinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 167-170)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3426 (ν N-H); 3044 (ν C-H aromático); 2923 (ν C-H vinílico); 2663 (ν $\text{C}^+=\text{NH}$ -); 1615 (ν C=C vinílico); 1566 (ν C=N); 1539 e 1497 (ν C=C aromático); 1070 (ν C-N); 801 (δ ArC-H no plano-2H viz.); 755 e 691 (δ ArC-H no plano-5H viz.).

RMN ^{13}C e ^1H

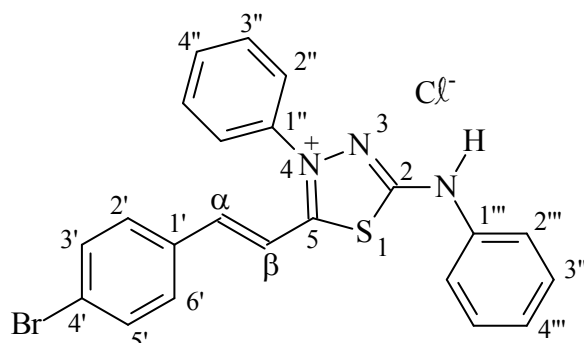
Tabela 17. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 4'-Br (50 MHz; DMSO- d_6).

δ (ppm)	C
162,63	5
159,18	2
146,42	α
136,95	1'''
133,04	1'
132,12	3' e 5'
131,68	4''
130,90	2' e 6'
130,16	3''
129,45	3'''
126,11	2''
125,46	4'''
124,16	4'
118,58	2'''
112,13	β
n.o.	1''

n.o. não observado

Tabela 18. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 4'-Br (200 MHz; DMSO- d_6).

δ (ppm)	H	J (Hz)	$^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$
12,58 (s)	NH	---	---
8,00 (d)	α	16,0	β
7,86-7,17(m)	Aromático	---	---
7,10(d)	β	15,9	---



ix) Cloreto de 4-fenil-5-(4'-etoxicinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 171-174)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3440 (ν N-H); 2928 (ν C-H vinílico/ ν C-H Arom./ ν C-H alifático); 2370⁺ (ν C=NH-); 1596 (ν C=C vinílico); 1564 (ν C=N); 1539 e 1444 (ν C=C aromático); 1258 (ν Ar-OEt); 1120 (ν O-Et 756 e 618 (δ ArC-H no plano-5H viz.).

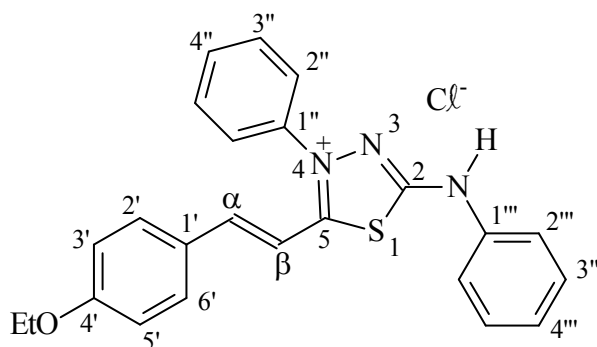
RMN ¹³C e ¹H

Tabela 19. Dados de RMN ¹³C para o mesoiônico com X = 4'-OEt (50 MHz; DMSO-d₆).

δ (ppm)	C
163,38	4'
161,93	5
158,4	2
148,08	α
139,23	1''
138,65	1'''
137,07	1'
131,54	4''
130,24	3''
128,94	3''' e 5'''
127,95	2'
125,19	2''
124,79	4'''
119,84	2'''
113,10	3'
108,57	β
63,68	CH ₂ -O
14,53	CH ₃ -CH ₂ -O

Tabela 20. Dados de RMN ¹H para o mesoiônico com X = 4'-OEt (200 MHz; DMSO-d₆).

δ (ppm)	H	J (Hz)	¹ Hx ¹ H-COSY
12,22 (s)	NH	---	---
7,96 (d)	α	15,9	β
7,85-6,97(m)	Aromático	---	---
6,90(d)	β	15,9	---
4,07(q)	CH ₃ -CH ₂ -O	7,0	---
1,31(t)	CH ₃ -CH ₂ -O	6,9	---



x) Cloreto de 4-fenil-5-(4'-hidroxicinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 175-177)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3442 (ν N-H e/ou ν O-H) ; 3056 (ν C-H aromático); 2905 (ν C-H vinílico / ν C-H alifático); 2847 (ν C=NH-); 1613 (ν C=C vinílico); 1568 (ν C=N); 1538, 1495 e 1448 (ν C=C aromático); 1290 (ν C-O) ;1210 (ν C-N); 1170 (ν C-N); 946 (δ =C-H vinílico); 835 ($\delta_{\text{Ar}}\text{C-H}$ no plano 2H viz.); 753 e 688 ($\delta_{\text{Ar}}\text{C-H}$ no plano-5H viz.).

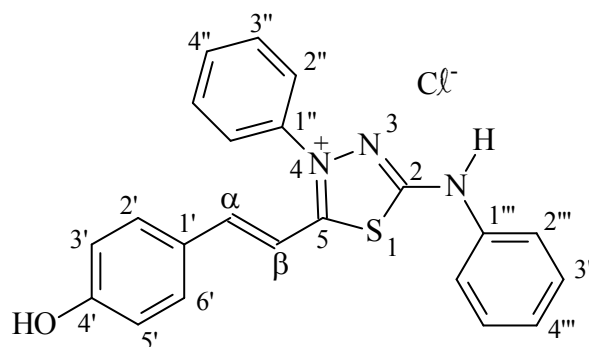
RMN ^{13}C e ^1H

Tabela 21. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 4'-OH (50 MHz; $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$).

δ (ppm)	C
162,58	5
159,00	4'
157,94	2
149,93	α
139,49	1''
138,07	1'''
131,67	4''
131,45	2' e 6'
130,18	3'''
129,00	3''
125,42	2''
124,24	4'''
124,72	1'
118,85	2'''
116,42	3' e 5'
105,86	β

Tabela 22. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 4'-OH (200 MHz; DMSO-d_6).

δ (ppm)	H	J (Hz)
11,38 (s)	NH	---
9,7 (s)	OH	
7,07 (d)	α	16,21
6,96-5,94 (m)	aromático	---



xi) Cloreto de 4-fenil-5-(3'-metoxicinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 178-180)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3443 (ν N-H) ; 3026 (ν C-H aromático e/ou C-H vinílico); 2773 (ν $\text{C}=\text{NH}^+$); 1614 (ν C=C vinílico); 1566 (ν C=N); 1528, 1497 e 1451 (ν C=C aromático); 1348 (ν C-S); 1284 (ν C-OMe) ;1202 (ν C-N); 1113 (ν C-N); 987 (δ ArC-H no plano 1H isolado e/ou δ =C-H vinílico); 839 (δ ArC-H no plano 3H viz.); 756 e 682 (δ ArC-H no plano-5H viz.).

RMN ^{13}C e ^1H

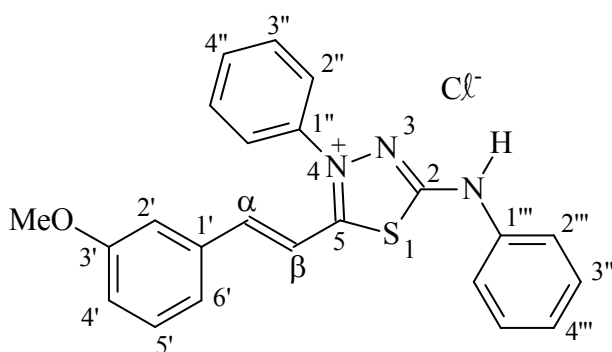
Tabela 23. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 3'-OMe (50 MHz; DMSO- d_6).

δ (ppm)	C
162,82	3'
159,66	5
159,15	2
147,96	α
138,55	1''
137,02	1'''
135,22	1'
131,74	4''
130,19	3''
129,54	3'''
126,16	2''
124,22	4'''
121,12	2'
111,89	β
118,64	2'''
117,62	6'
114,49	4'
55,38	$\text{CH}_3\text{-O}$
n.o.	5'

n.o. não observado

Tabela 24. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 3'-OMe (200 MHz; DMSO- d_6).

δ (ppm)	H	J (Hz)
12,38 (s)	NH	---
7,92 (d)	α	16,1
7,86-7,31(m)	aromático	---
7,06(d)	β	16,0
3,76(s)	$\text{CH}_3\text{-O}$	---



xii) Cloreto de 4-fenil-5-(3'-nitrocinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 181-182)

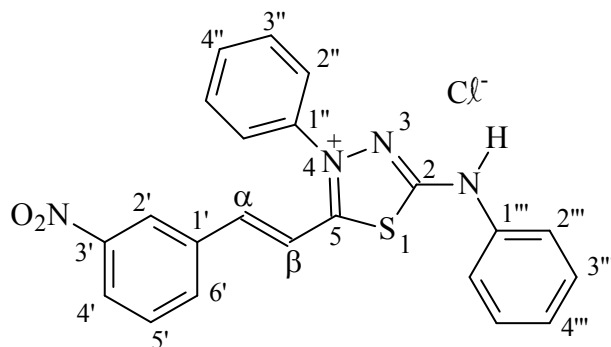
Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3437 (ν N-H); 3025 (ν C-H aromático); 2925 (ν C-H vinílico); 2689 (ν $\text{C}^+=\text{NH}^-$); 1600 (ν C=C vinílico); 1563 (ν C=N/ou ν N=O assim.); 1510 (ν C=C aromático); 1308 (ν N=O sim./ou ν C-S); 1253 (ν C-N); 1169 (ν C-N arom.) 953 (δ ArC-H no plano-1H isolado.); 813 (δ ArC-H no plano-3H viz.); 752 e 687 (δ ArC-H no plano-5H viz.).

RMN ^{13}C

Tabela 25. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 3'-NO₂ (75 MHz; $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$).

δ (ppm)	C
145,17	α
137,40	1''
136,30	1'''
134,50	1'
133,42	6'
131,58	4''
129,75	3''
128,69	3'''
125,21	5'
124,96	2''
125,21	2'
124,36	4'''
122,70	4'
118,44	2'''
112,79	β
n.o.	2
n.o.	5
n.o.	3'



n.o. não observado

xiii) Cloreto de 4-fenil-5-(3'-clorocinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 183-186)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3404 (ν N-H); 3059 (ν C-H aromático); 2775 (ν $\text{C}=\text{NH}^+$); 1615 (ν C=C vinílico); 1566 (ν C=N); 1544 e 1495 (ν C=C aromático); 1207 (ν C-N arom.); 1110 (ν C-N); 787 (δ ArC-H no plano-3H viz.); 750 e 690 (δ ArC-H no plano-5H viz.).

RMN ^{13}C e ^1H

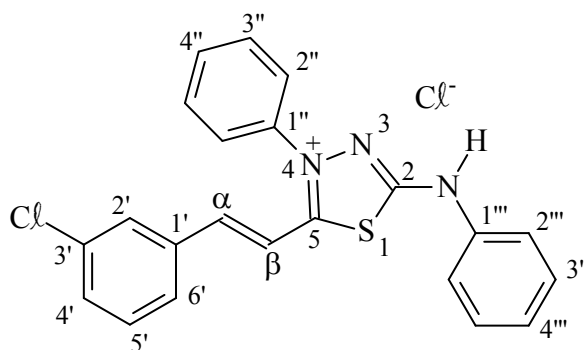
Tabela 26. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 3'-Cl (50 MHz; DMSO- d_6).

δ (ppm)	C
162,45	5
159,12	2
145,94	α
138,55	1''
137,02	1'''
133,91	3'
131,71	4''
130,94	5'
130,15	3''
129,43	3'''
128,52	2'
127,73	2''
126,16	4' e 6'
124,09	4'''
118,55	2'''
113,21	β
135,99	1'
n.o.	4'

n.o. não observado

Tabela 27. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 3'-Cl (200 MHz; DMSO- d_6).

δ (ppm)	H	J (Hz)
12,79 (s)	NH	---
7,98 (d)	α	16,4
7,92-7,36(m)	aromático	---
7,19 (d)	β	15,5



xiv) Cloreto de 4-fenil-5-(3'-bromocinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 187-189)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3399 (ν N-H); 3059 (ν C-H aromático); 3002 (ν C-H vinílico); 2782 (ν $\text{C}^{\ddagger}=\text{NH}$ -); 1614 (ν C=C vinílico); 1566 (ν C=N); 1544 e 1496 (ν C=C aromático); 1207 (ν C-N arom.); 786 ($\delta_{\text{ArC-H}}$ no plano-3H viz.); 751 e 684 ($\delta_{\text{ArC-H}}$ no plano-5H viz.).

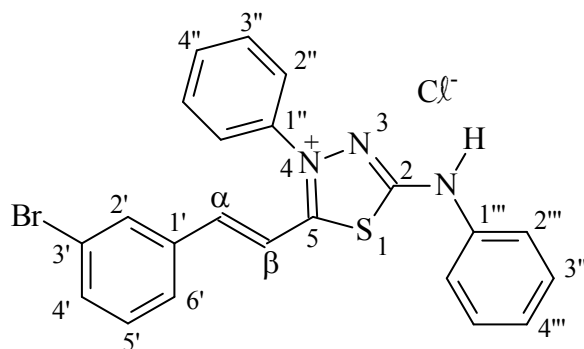
RMN ^{13}C e ^1H

Tabela 28. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 3'-Br (50 MHz; DMSO- d_6).

δ (ppm)	C
162,46	5
159,13	2
145,90	α
138,59	1''
137,05	1'''
136,26	1'
134,17	4'
131,73	4''
131,29	2'
130,19	5'
130,19	3''
129,43	3'''
128,00	6'
126,28	2''
124,09	3'
122,46	4'''
118,56	2'''
113,17	β

Tabela 29. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 3'-Br (200 MHz; DMSO- d_6).

δ (ppm)	H	J (Hz)
12,84 (s)	NH	---
7,98 (d)	α	16,1
7,87-7,27(m)	aromático	---
7,19(d)	β	16,2



xv) Cloreto de 4-fenil-5-(2'-metoxicinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 190-191)

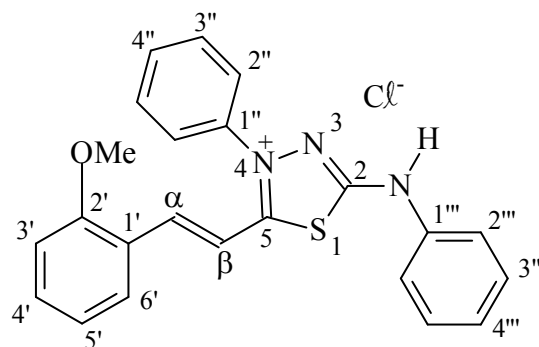
RMN ^{13}C e ^1H

Tabela 30. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 2'-OMe (50 MHz; CDCl_3 e DMSO-d_6).

δ (ppm)	C
162,29	2'
159,15	5
158,57	2
144,58	α
138,26	1''
136,87	1'''
133,94	6'
131,70	4'
130,51	4''
130,07	3''
128,89	3'''
125,56	2''
124,04	4'''
122,11	1'
121,07	5'
118,96	3'
118,89	2'''
111,40	β
55,46	OMe

Tabela 31. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 2'-OMe (200 MHz; CDCl_3).

δ (ppm)	H	J (Hz)
12,49 (s)	NH	---
7,39 (d)	α	16,01
7,29-6,45 (m)	aromático	---
6,73 (d)	β	16,01
3,39 (s)	OMe	---



xvi) Cloreto de 4-fenil-5-(2',4'-difluorocinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 192-194)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3430 (ν N-H); 3022 (ν C-H aromático e/ou ν C-H vinílico); 2675 (ν^+ C=NH-); 1617 (ν C=C vinílico); 1570 (ν C=N); 1530, e 1505 (ν C=C aromático); 1278 (ν ArC-N); 967 (δ ArC-H no plano-1H isolado.); 802 (δ ArC-H no plano-2H viz.); 755 e 688 (δ ArC-H no plano-5H viz.).

RMN ^{13}C e ^1H

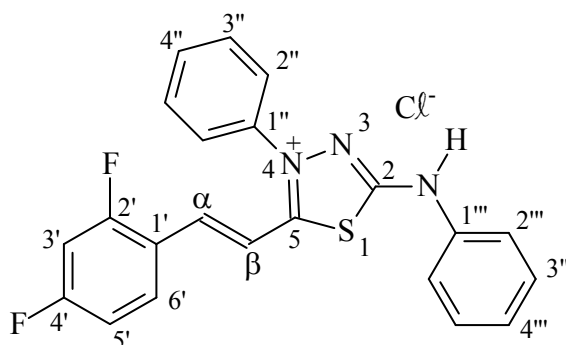
Tabela 32. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 2',4'-diF (50 MHz; $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$).

δ (ppm)	C
161,61	5
159,05	2
141,11	α
137,89	1''
136,55	1'''
n.o.	4'
132,02	4''
132,77	6'
105,06	3'
130,22	3''
129,02	3'''
n.o.	2'
125,37	2''
112,60	5'
124,47	4'''
118,83	2'''
113,04	β
n.o.	1'

n.o. não observado

Tabela 33. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 2',4'-diF (200 MHz; CDCl_3).

δ (ppm)	H
13,05 (s)	NH
7,74-6,82 (m)	aromático



xvii) Cloreto de 4-fenil-5-(3',4'-diclorocinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (p. 195-197)

Infravermelho (KBr; ν cm^{-1})

3401 (ν N-H); 3054 (ν C-H aromático e/ou ν C-H vinílico); 2693 (ν^+ C=NH-); 1616 (ν C=C vinílico); 1569 (ν C=N); 1532, e 1497 (ν C=C aromático); 1200 (ν ArC-N); 1123 (ν ArC-N) 944 (δ ArC-H no plano-1H isolado.); 805 (δ ArC-H no plano-2H viz.); 756 e 686 (δ ArC-H no plano-5H viz.).

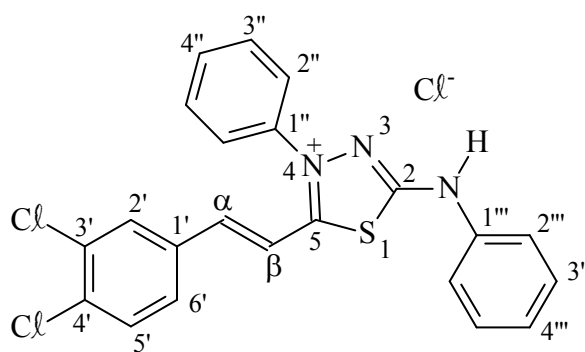
RMN ^{13}C e ^1H

Tabela 34. Dados de RMN ^{13}C para o mesoiônico com X = 3',4'-diCl (50 MHz; CDCl_3 e CD_3OD).

δ (ppm)	C
n.o.	5
159,08	2
145,64	α
137,89	1''
136,66	1'''
136,54	1'
136,34	4'
133,58	3'
133,04	2'
132,12	6'
131,30	4''
130,41	3''
129,87	5'
129,04	3'''
124,43	4'''
125,77	2''
119,01	2'''
111,95	β

Tabela 35. Dados de RMN ^1H para o mesoiônico com X = 3',4'-diCl (200 MHz; CDCl_3 e CD_3OD).

δ (ppm)	H
12,29 (s)	NH
---	---
7,68-7,0 (m)	aromático
---	---



3.2.2 Ensaio com as DNA-topoisomerasas

3.2.2.1 DNA-topoisomerase II α

O experimento foi realizado com 2 unidades (1 μ L) de topoisomerase II- α (kit da TopoGEN), para 0,125 μ g de kDNA anelado (DNA do cinetoplasto anelado), com várias concentrações da droga (30 – 120 μ M) em uma mistura de reação com volume total de 10 μ L/ependorf, contendo 50 mM de Tris-HCl (pH=8,0), 120mM de KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM ATP e 0,5 mM ditioneitol (DTT), conforme Tabela 36. As amostras foram incubadas por 30 min a 37^oC e as reações finalizadas com 1 μ L de tampão de término (SDS 5%, azul de bromofenol, glicerol 50% (v/v) - 1:1:1). Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão de corrida TAE (Tris-acetato-EDTA). Os géis foram corados em brometo de etídio (0,5 μ g/mL), sendo a revelação feita por irradiação em transiluminador UV e imediatamente registrados em máquina fotográfica digital (fotos apresentadas no capítulo de Resultados e Discussão). A Tabela 36 mostra o esquema das soluções utilizadas para os ensaios frente às topoisomerasas I e II α .

Tabela 36. Preparação de soluções em *ependorf* para análise em gel de agarose.

	<i>kDNA</i> (0,125 μ g/mL)	Tampão Assay (TopoGEN)	ATP	H ₂ O	Droga	TOPO II α (2U)
Etoposida ^a	1 μ L	2 μ L	1 μ L	4 μ L	1 μ L	1 μ L
kDNA puro	1 μ L	2 μ L	1 μ L	6 μ L	-	-
kDNA +enz	1 μ L	2 μ L	1 μ L	5 μ L	-	1 μ L
Composto 1	1 μ L	2 μ L	1 μ L	4 μ L	1 μ L	1 μ L
Composto 2	1 μ L	2 μ L	1 μ L	4 μ L	1 μ L	1 μ L
Composto 3	1 μ L	2 μ L	1 μ L	4 μ L	1 μ L	1 μ L

^aEtoposida é o controle positivo da Topo II

3.2.2.2 DNA-topoisomerase I

Os ensaios com a topo I, foram realizados utilizando o mesmo procedimento que nos ensaios com a topo II, diferenciando apenas no material genético que foi o DNA de fago

ϕ X174 super-helicoidal, no controle positivo (campotecina) e não houve adição de ATP, conforme a Tabela 37.

Tabela 37. Preparação de soluções em *ependorf* para análise em gel de agarose.

	ϕ X (0,125 μ g)	Tampão de reação	H ₂ O	Droga	TOPO I (2U)
Campotecina ^a	1 μ L	2 μ L	5 μ L	1 μ L	1 μ L
ϕ X puro	1 μ L	2 μ L	7 μ L	-	-
ϕ X +enz	1 μ L	2 μ L	6 μ L	-	1 μ L
Composto 1	1 μ L	2 μ L	5 μ L	1 μ L	1 μ L
Composto 2	1 μ L	2 μ L	5 μ L	1 μ L	1 μ L
Composto 3	1 μ L	2 μ L	5 μ L	1 μ L	1 μ L

^aCampotecina é o controle positivo da Topo I

3.2.3 Ensaio colorimétrico para atividade citotóxica *in vitro* (MTT)

Células ascíticas (5×10^5 células/mL) de carcinoma de Ehrlich obtidas de camundongos portadores do tumor com 7 a 9 dias de crescimento, foram mantidas em cultura prévia de uma passagem pelo menos antes do início da experiência. Os ensaios foram feitos em microplacas em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, 50 μ M de 2-mercaptoetanol, 100 IU/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina, na ausência ou presença de doses crescentes da droga em estudo.

Os compostos (Figura 23) foram dissolvidas em DMSO. A concentração final em DMSO foi ajustada a 0,3% para os ensaios com células tratadas e controle.

As culturas foram mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C por 24 horas. A seguir as culturas foram incubadas por 3 horas com 10 μ L de solução de MTT (5 mg/mL), dissolvido em solução salina tamponada com fosfato de sódio a pH=7,2 e posteriormente solubilizadas em 300 μ L de isopropanol acidificado/poço. Após alguns minutos realizou-se a leitura da absorbância a 570 nm (MOSSMAN, 1983) em espectrofotômetro do tipo ELISA. A partir dos valores de percentagem de inibição de desidrogenases nas células tratadas com drogas em relação às células tratadas com o solvente foram obtidos os valores de IC₅₀ (a concentração da droga que inibe em 50% a atividade enzimática).

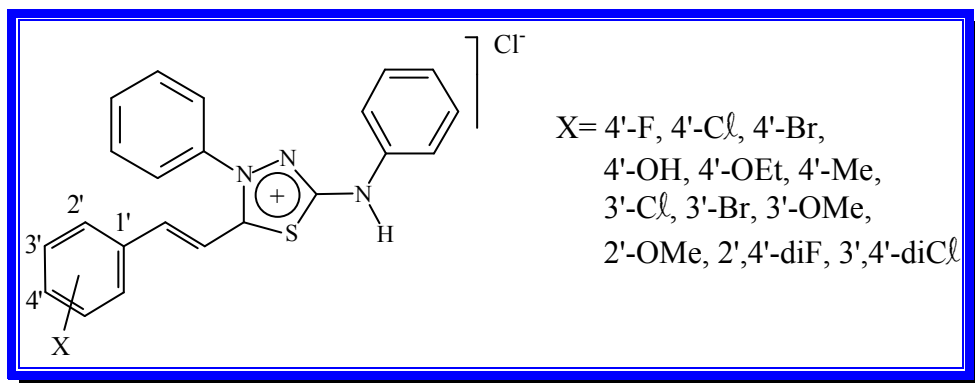


Figura 23. Compostos testados no ensaio colorimétrico.

Os ensaios foram realizados em triplicata e/ou sextuplicata e indicaram boa reprodutibilidade.

As tabelas 38 a 48 mostram os valores encontrados para os ensaios descritos acima.

Tabela 38. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=4'-OEt

X	DOSE (μM)	logDOSE	% INIBIÇÃO (\pm dp) ^a
4'-OEt	50	1,699	80,01 \pm 1,00
	25	1,398	70,53 \pm 5,53
	12,5	1,097	28,73 \pm 4,44
	6,25	0,796	16,54 \pm 0,79
	3,125	0,495	8,97 \pm 2,63

^adesvio padrão

Tabela 39. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=4'-F

X	DOSE (μM)	logDOSE	% INIBIÇÃO (\pm dp) ^a
4'-F	100	2	71,23 \pm 3,22
	50	1,699	43,11 \pm 2,64
	25	1,398	16,09 \pm 2,73
	12,5	1,097	8,15 \pm 1,13

^adesvio padrão

Tabela 40. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=4'-Cl

X	DOSE (μM)	logDOSE	% INIBIÇÃO (\pm dp) ^a
4'-Cl	100	2	77,67 \pm 2,87
	50	1,699	40,33 \pm 1,02
	25	1,398	14,77 \pm 0,22
	12,5	1,097	14,48 \pm 2,35

^adesvio padrão

Tabela 41. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=4'-Br

X	DOSE (μM)	logDOSE	% INIBIÇÃO (\pm dp) ^a
4'-Br	100	2	63,81 \pm 4,83
	50	1,699	30,32 \pm 2,21
	25	1,398	8,23 \pm 1,54
	12,5	1,097	9,47 \pm 0,44

^adesvio padrão

Tabela 42. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=3',4'-diCl

X	DOSE (μM)	logDOSE	% INIBIÇÃO (\pm dp) ^a
3',4'-diCl	100	2	51,70 \pm 1,90
	50	1,699	36,38 \pm 3,17
	25	1,398	18 \pm 1,54
	12,5	1,097	16,47 \pm 1,45

^adesvio padrão

Tabela 43. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=2',4'-diF

X	DOSE (μM)	logDOSE	% INIBIÇÃO (\pm dp) ^a
2',4'-diF	100	2	63,90 \pm 4,43
	50	1,699	43,35 \pm 3,23
	25	1,398	37,20 \pm 2,45
	12,5	1,097	30,65 \pm 4,36

^adesvio padrão

Tabela 44. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=2'-OMe

X	DOSE (μM)	logDOSE	% INIBIÇÃO (\pm dp) ^a
2'-OMe	50	1,699	75,26 \pm 4,85
	25	1,398	42,63 \pm 3,73
	12,5	1,097	25,35 \pm 2,66
	6,25	0,796	8,97 \pm 2,31
	3,125	0,495	6,15 \pm 0,68

^adesvio padrão

Tabela 45. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=3'-Br

X	DOSE (μM)	logDOSE	% INIBIÇÃO (\pm dp) ^a
3'-Br	50	1,699	82,25 \pm 1,17
	25	1,398	37,02 \pm 2,42
	12,5	1,097	14,43 \pm 0,56
	6,25	0,796	10,67 \pm 0,28
	3,125	0,495	11,59 \pm 0,89

^adesvio padrão

Tabela 46. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=3'-Cl

X	DOSE (μM)	logDOSE	% INIBIÇÃO (\pm dp) ^a
3'-Cl	50	1,699	69,59 \pm 0,30
	25	1,398	31,48 \pm 3,51
	12,5	1,097	14,89 \pm 1,12
	6,25	0,796	10,38 \pm 2,65
	3,125	0,495	9,49 \pm 0,83

^adesvio padrão

Tabela 47. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=4'-OH

X	DOSE (μM)	logDOSE	% INIBIÇÃO (\pm dp) ^a
4'-OH	329,04	2,52	91,39 \pm 1,57
	164,52	2,22	84,71 \pm 5,05
	82,26	1,92	41,01 \pm 3,35
	41,13	1,61	29,25 \pm 4,28
	20,57	1,31	b
	10,28	1,01	13,73 \pm 5,77

^adesvio padrão, ^bvalor inconsistente

Tabela 48. Valores de percentual de inibição observados no ensaio colorimétrico para o derivado X=3'-OMe

X	DOSE (μM)	logDOSE	% INIBIÇÃO (\pm dp) ^a
3'-OMe	50	1,699	66,71 \pm 3,36
	25	1,398	27,17 \pm 2,33
	12,5	1,097	b
	6,25	0,796	b
	3,125	0,495	b

^adesvio padrão, ^bvalor inconsistente

O derivado substituído com o grupo *para*-metil apresentou uma porcentagem de inibição inferior a cinquenta por cento.

X=4'-Me (sextuplicata), média = 48,00% ± 0,92

Com os dados obtidos acima, foram realizados os gráficos a seguir para a determinação dos valores de IC₅₀ (inibição de cinquenta por cento do crescimento celular), sendo adotado o modelo de regressão sigmoidal como análise mais adequada.

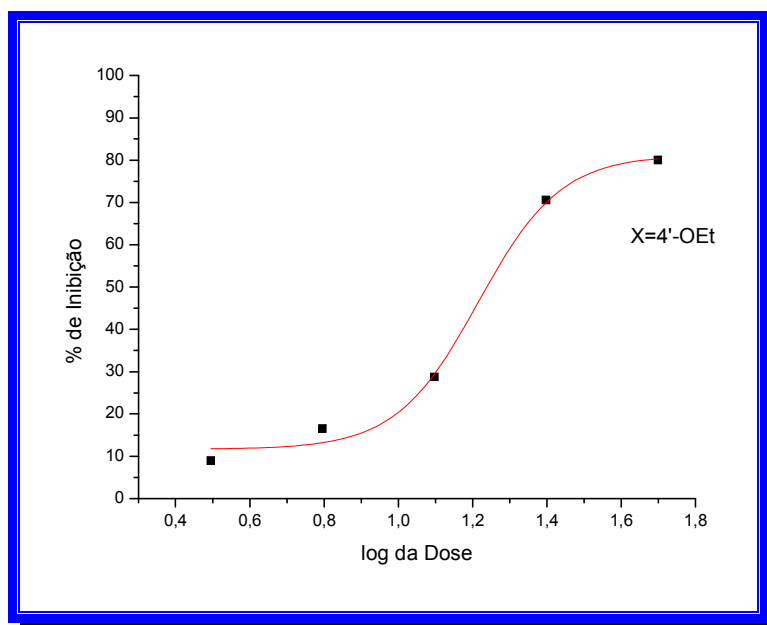


Gráfico 2. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 4'-OEt.

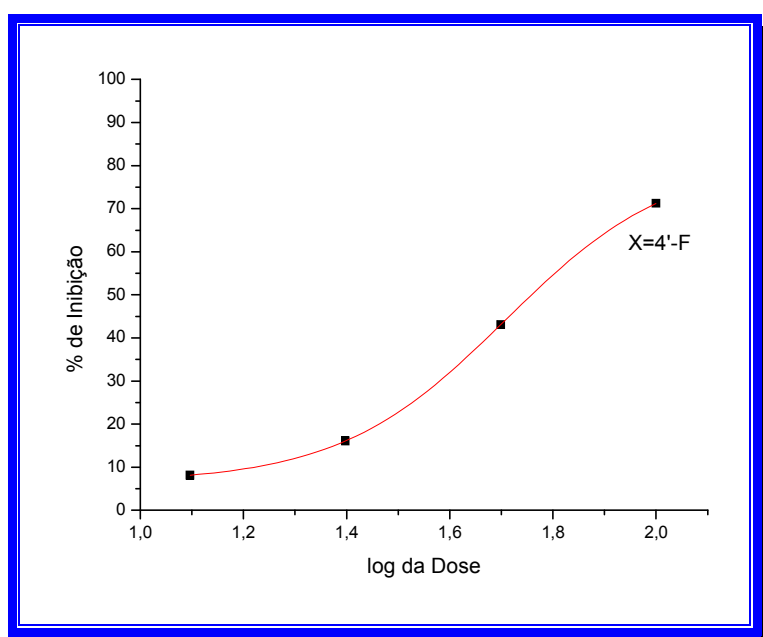


Gráfico 3. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 4'-F.

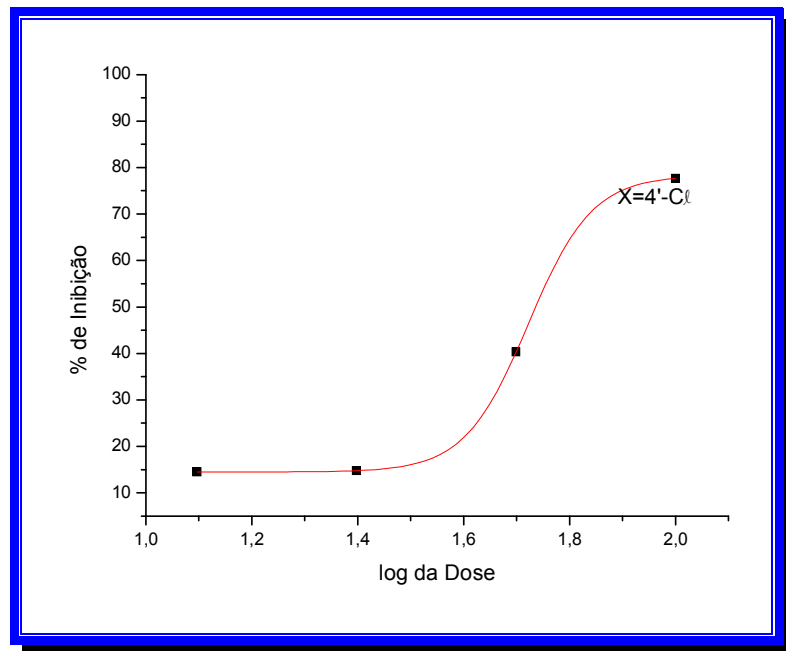


Gráfico 4. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 4'-Cl.

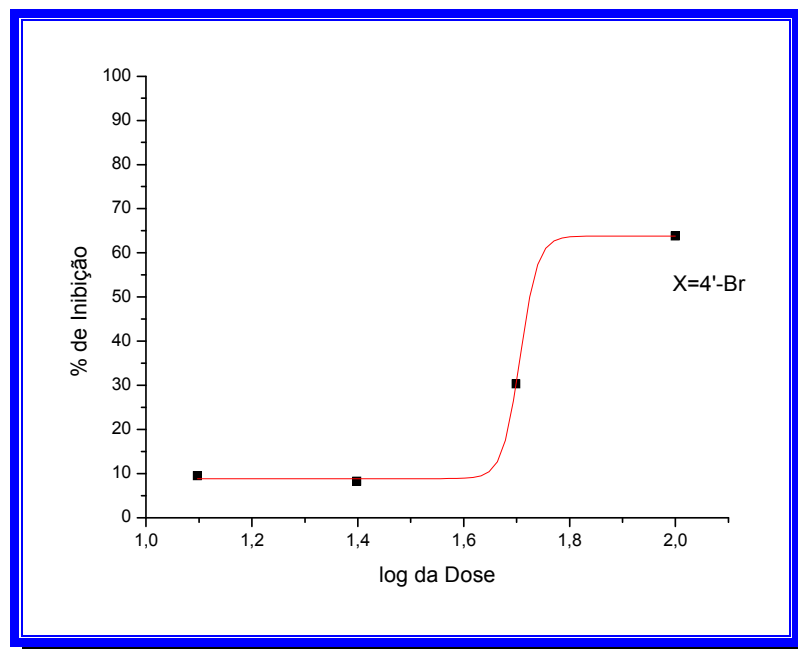


Gráfico 5. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 4'-Br.

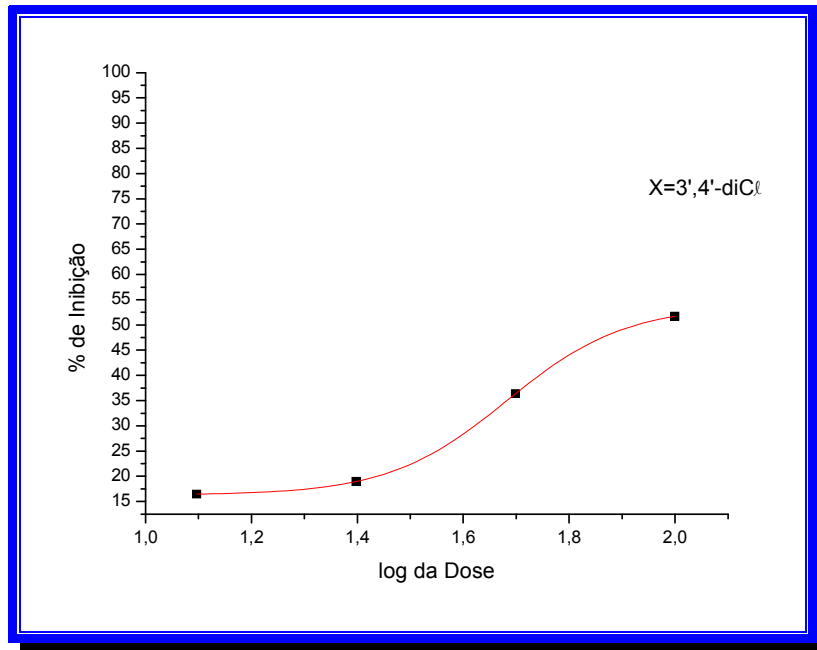


Gráfico 6. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 3',4'-diCl.

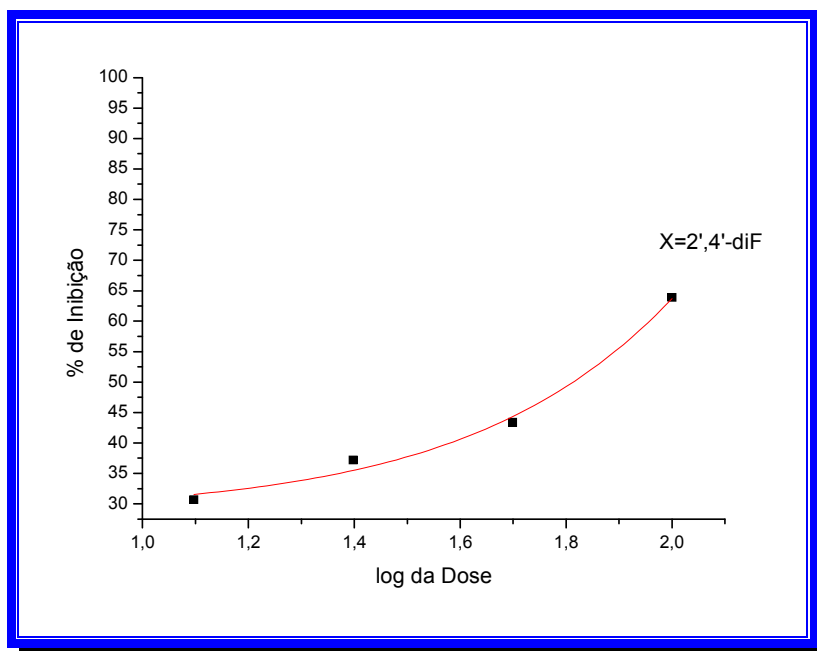


Gráfico 7. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 2',4'-diF.

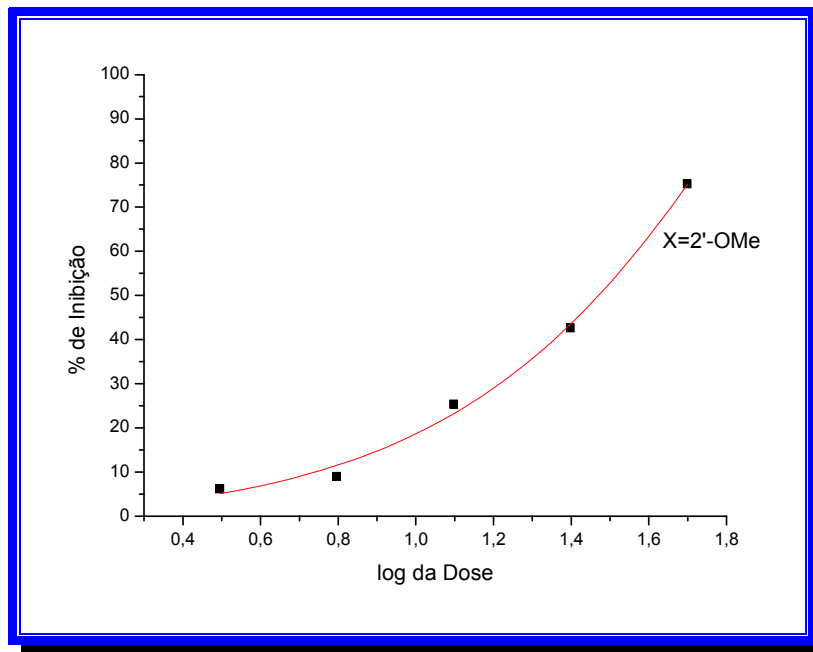


Gráfico 8. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 2'-OMe.

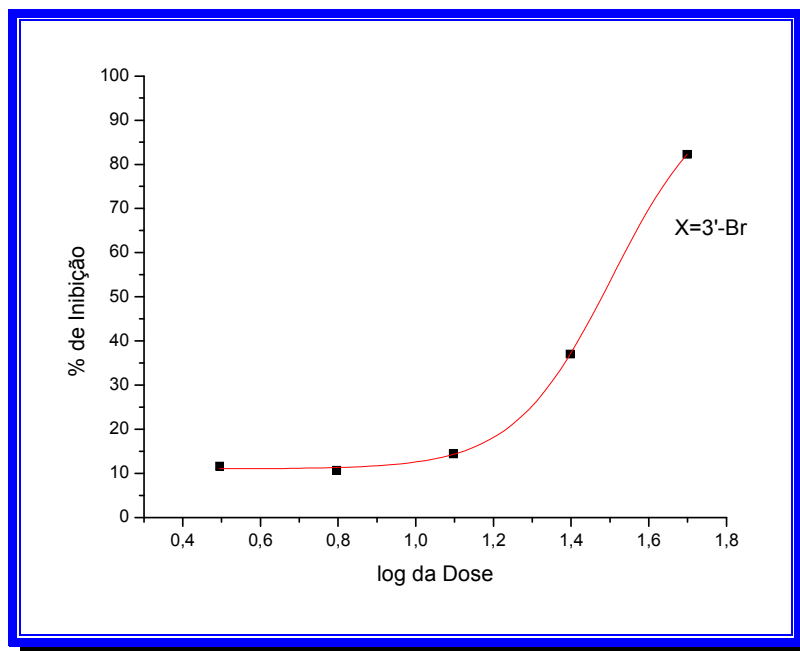


Gráfico 9. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 3'-Br.

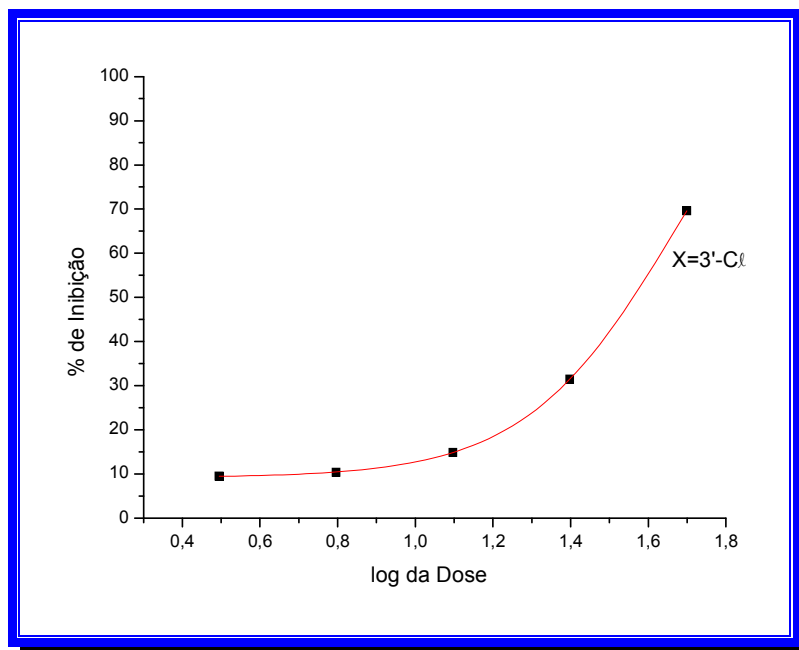


Gráfico 10. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 3'-Cl.

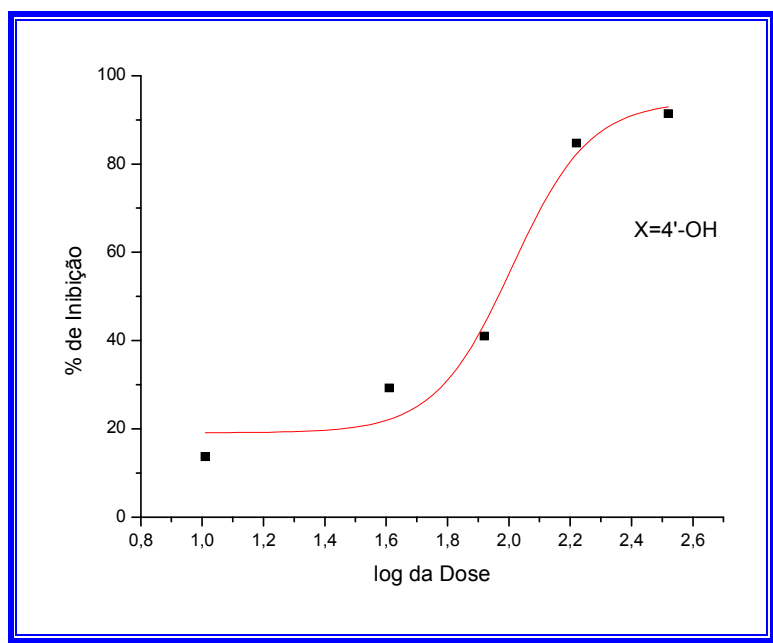


Gráfico 11. Gráfico do log da dose x porcentagem de inibição celular para o derivado 4'-OH.

3.2.4 Ensaio para atividade antitumoral *in vivo*

Em camundongos SW ou singênicos C57BL/10 foram inoculadas, via intraperitoneal, 5×10^5 células ascíticas do carcinoma de Ehrlich. Após 24 horas da inoculação do tumor nos animais, iniciou-se o tratamento com os compostos de escolha. Injetou-se por via ip (intra-peritoneal) em cada animal 0,06 mL da droga em DMSO a 80% em salina (v/v), nos esquemas indicados nas tabelas. Em cada animal controle foi injetado 0,06 mL de DMSO a 80% em salina, via ip, no mesmo esquema de tratamento com as drogas. Foi utilizado um total de 5 ou 6 animais por grupo. O efeito máximo dos derivados foi obtido anotando-se a sobrevida, em dias, dos animais sobreviventes em relação aos animais mortos, no tempo total de 70 dias. A eficiência do tratamento com o tumor ascítico *in vivo* foi verificada pela análise do aumento da sobrevida dos animais tratados (T) em comparação com a sobrevida dos animais controle (C) usando-se a expressão:

$$\% T/C = [\text{sobrevida em dias dos animais tratados (T) com drogas}] / [\text{sobrevida em dias dos animais controle (C)}] \times 100$$

A atividade antitumoral é considerada significativa quando o valor de % T/C é maior ou igual que 125 (GERAN *et al.*, 1972).

3.2.5 Determinação do k' através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para obter os valores do fator de capacidade (k'), se fez necessário as determinações dos tempos de retenção (t_R), utilizando-se cromatógrafo de fase líquida equipado com detector de absorção na faixa do UV/Vis, acoplado a um registrador.

Utilizou-se uma pré-coluna C-18 (fase reversa) como fase estacionária e uma mistura de metanol e solução tampão fosfato (0,01 M; pH \cong 7,4) como fase móvel, em sistema isocrático.

As soluções das amostras foram preparadas em acetonitrila em concentrações adequadas à análise, sendo previamente filtradas em micro-filtros.

A solução tampão fosfato foi preparada em balão de 500 mL, onde foram adicionados 19,4 mL de solução de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1M, 30,6 mL de solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1M e o volume completado com água deionizada. O pH da solução final foi então determinado em potenciômetro.

As amostras foram injetadas no cromatógrafo através do sistema composto de metanol e solução tampão fosfato em proporções de 25 a 75% de solvente orgânico (v/v), com velocidade de fluxo de 1,0 mL/min., e o tempo de retenção de cada amostra foi determinado (Tabela 49).

Tabela 49. Tempos de retenção para os sais derivados dos mesoiônicos obtidos por CLAE.

t_R (min.)								
Metanol : Tampão fosfato (% v/v)								
Derivado								
X	25:75	35:65	45:55	55:45	60:40	65:35	70:30	75:25
4'-NO₂	n.o.	18,56	3,87	1,00	-	0,37	-	0,24
2',4'-diF	n.o.	10,55	2,26	0,62	-	0,29	-	0,21
3',4'-diCl	n.o.	86,82	12,37	2,50	-	0,65	-	0,28
4'-Cl	n.o.	41,63	8,16	1,91	-	0,58	-	0,29
3'-Cl	n.o.	n.o	22,02	3,86	-	0,86	-	0,34
4'-Br	n.o.	73,77	15,34	3,19	-	0,87	-	0,36
H	139,94	24,88	5,08	1,24	0,76	0,53	0,38	0,29
4'-OEt	n.o.	57,66	8,77	2,54	-	0,76	-	0,35
4'-OMe	n.o.	24,58	5,25	1,37	-	0,49	-	0,27
2'-OMe	n.o	59,62	10,27	2,24	-	0,68	-	0,33
3'-OMe	n.o.	23,25	4,69	1,22	-	0,49	-	0,29
4'-Me	n.o.	62,81	8,27	1,87	-	0,63	-	0,31

n.o. não observado

3.2.6 Determinação dos parâmetros eletrônicos teóricos

Partindo-se das geometrias otimizadas dos cloretos de 4-fenil-5-[X-cinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, através de cálculos de mecânica molecular em programa PCModel, pôde-se obter os parâmetros eletrônicos teóricos por meio do programa MOPAC 6.0.

Utilizou-se o método semi-empírico de mecânica quântica PM3, e todas as palavras chaves na matriz inicial foram as mesmas para o conjunto de compostos em estudo. As palavras chaves foram:

PM3	define o hamiltoniano
NOINTER	não relatar distância inter-atômica
NOLOG	suprime arquivos não relevantes
PRECISE	eleva os critérios de otimização da geometria
GRAD	para que todos os gradientes sejam listados
XYZ	converte a geometria em coordenadas cartesianas
EF	abaixa o gradiente de otimização da geometria
HESS=1	abaixa o gradiente de otimização da geometria
CHARGE=1	devido a carga na molécula

3.2.7 Análise estatística

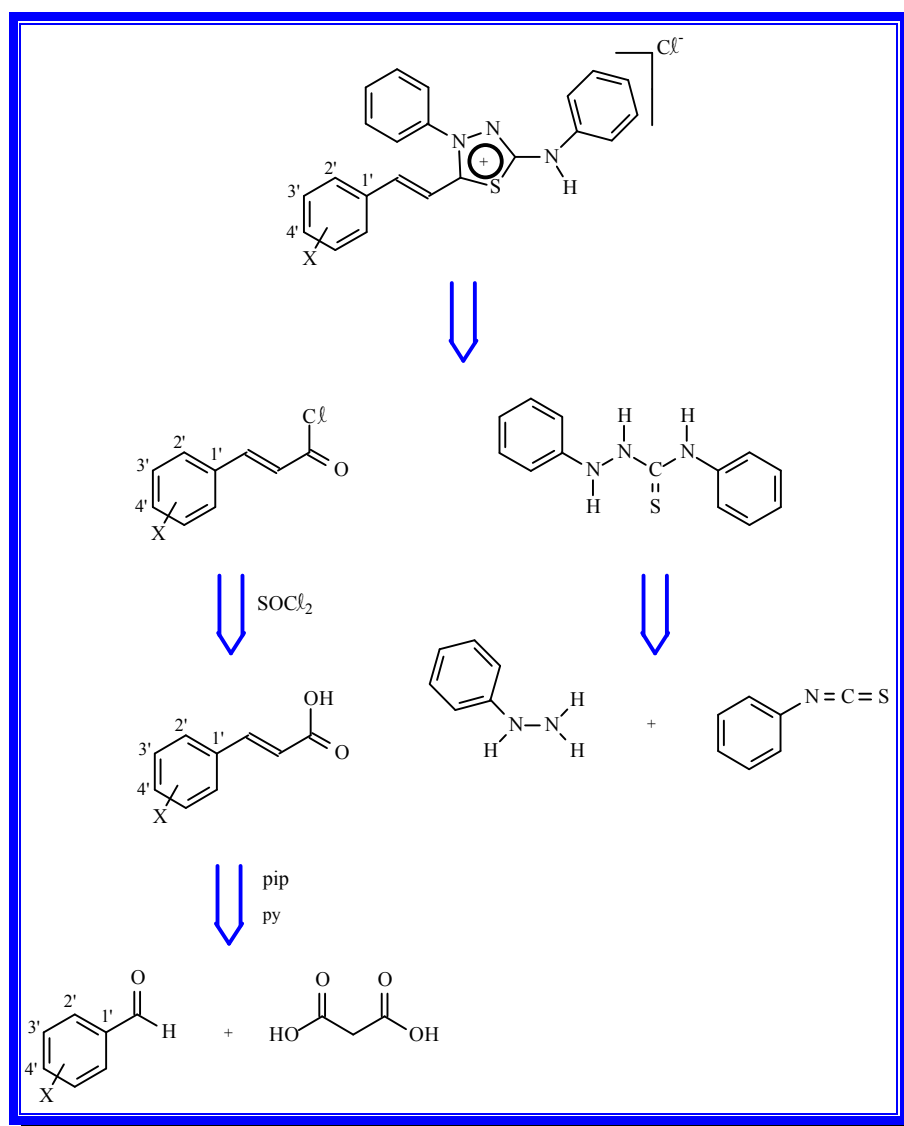
O tratamento estatístico foi realizado utilizando o programa Origin 6.0, através das funções de regressão linear e múltipla com os parâmetros P (probabilidade), R (correlação linear), R^2 (correlação múltipla), F (significância) e dp (desvio padrão).

Para os ensaios de avaliação anti-tumoral in vivo, foi utilizado a metodologia estatística segundo a literatura (GERAN, 1972).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e Caracterização

Foram sintetizados neste trabalho de tese 17 cloretos de 4-fenil-5-[4' ou 3' ou 2'-X-cinamoil]-1,3,4-tiadiazolio-2-fenilaminas, onde 7 (X=2'-OMe, 4'-OEt, 3'-Cl, 3'-Br, 4'-Br, 2',4'-diF e 3',4'-diCl) pela primeira vez relatados na literatura. A estratégia de síntese envolveu uma rota convergente tendo com última etapa uma reação de acilação anidra entre a 1,4-difeniltiosemicarbazida e os cloretos dos ácidos cinâmicos substituídos, conforme indicado no Esquema 4.



Esquema 4. Retrossíntese para os sais dos compostos mesoiônicos.

Os ácidos cinâmicos foram obtidos através da condensação de Knoevenagel-Hans, a partir dos benzaldeídos adequadamente substituídos, ácido malônico, piperidina como catalisador em piridina como solvente e, posteriormente, com tratamento em meio de HCl (SANTOS *et al*, 2001). Os rendimentos para os ácidos cinâmicos substituídos preparados foram na faixa de 68 a 91%, as purezas determinadas por cromatografia em camada fina, e caracterizados através da comparação dos pontos de fusão com os correspondentes da literatura (site da Sigma-Aldrich, 2007). A Tabela 1, na seção de Materiais e Métodos mostra os rendimentos e pontos de fusão obtidos para os ácidos cinâmicos substituídos. A Figura 24 mostra o mecanismo sugerido na obtenção dos ácidos cinâmicos.

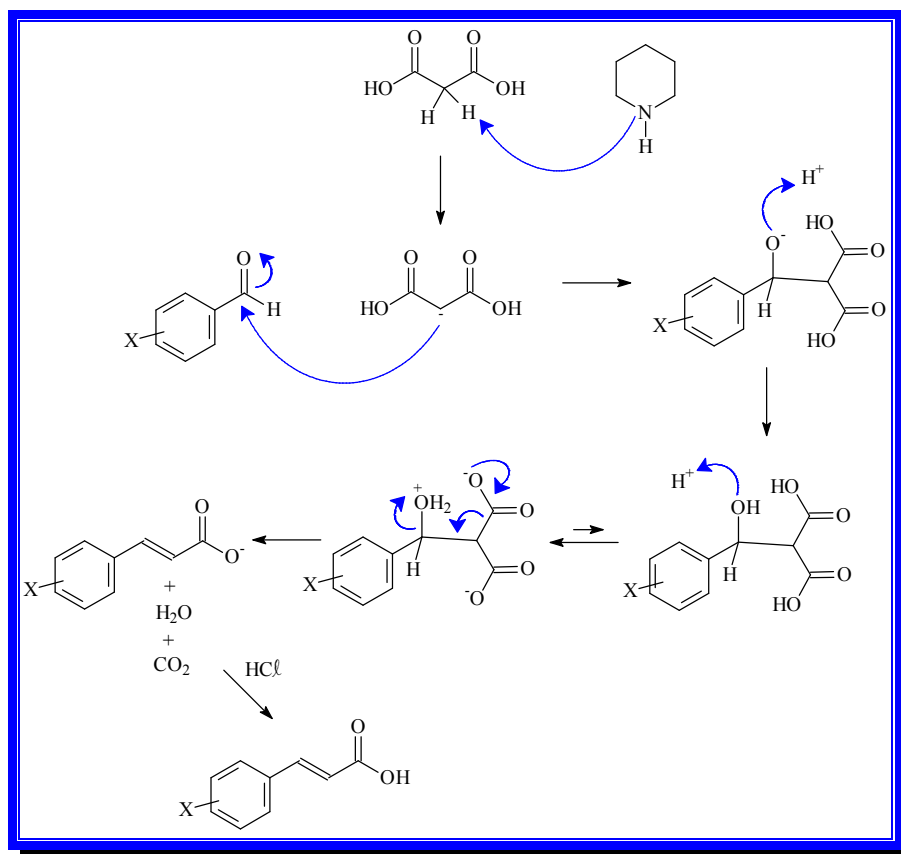


Figura 24. Mecanismo de reação sugerido para a obtenção dos ácidos cinâmicos.

Os cloretos de ácido correspondentes foram obtidos utilizando-se cloreto de tionila como agente halogenante que foram empregados na etapa seguinte sem purificação previa para evitar suas decomposições.

A 1,4-difeniltiosemicarbazida foi preparada a partir da fenil-hidrazina e o isotiocianato de fenila (Figura 25), em tolueno como solvente, com 80% de rendimento e alto grau de pureza, após lavar com tolueno e éter etílico anidros (SANTOS, 1993).

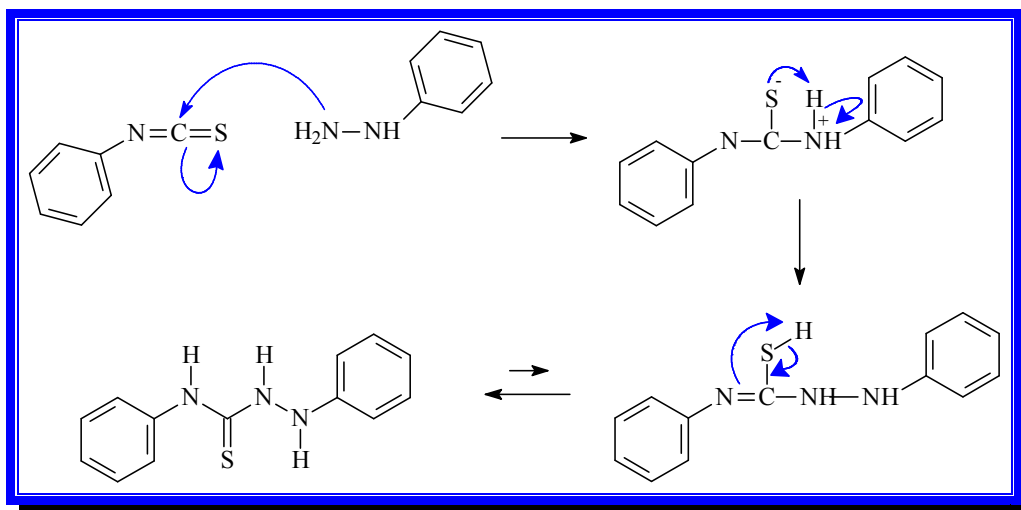


Figura 25. Mecanismo de reação sugerido para a obtenção da 1,4-difeniltiosemicarbazida.

Os cloretos de 4-fenil-5-[4' ou 3' ou 2'-X-cinamoil]-1,3,4-tiadiazolio-2-fenilaminas, onde X = H, 4'-Me, 4'-Br, 4'-Cl, 4'-F, 4'-OH, 4'-OMe, 4'-NO₂, 4'-CN', 4'-OEt, 3'-Cl, 3'-Br, 3'-OMe, 3'-NO₂, 2'-OMe, 2',4'-diF e 3',4'-diCl, foram sintetizados a partir da 1,4-difeniltiosemicarbazida e os correspondentes cloretos de ácido, em 1,4-dioxana como solvente, à temperatura ambiente na faixa de rendimento bruto de 65 a 89%. Os sais dos mesoiônicos foram recristalizados em clorofórmio: metanol (60:40), após terem sido lavados com 1,4-dioxana e éter etílico anidros (SANTOS & ECHEVARRIA, 2001). A Tabela 2, em Materiais e Métodos, mostra os pontos de fusão e rendimentos obtidos para cada composto.

O mecanismo sugerido para a etapa final de obtenção dos sais mesoiônicos envolve inicialmente o ataque nucleofílico da 1,4-difeniltiosemicarbazida ao carbono carbonílico do cloreto de ácido formando um intermediário N-acilado que posteriormente é atacado pelo átomo de enxofre do grupo tiocarbonila. A seguir, ocorre a aromatização do heterociclo com saída de uma molécula de ácido clorídrico, que pode ser observado durante o decorrer da reação. A presença do ácido clorídrico causa a protonação do átomo de nitrogênio exocíclico levando a formação do cloridrato do mesoiônico. A Figura 26 mostra o mecanismo de reação sugerido para a última etapa de obtenção dos sais dos compostos mesoiônicos.

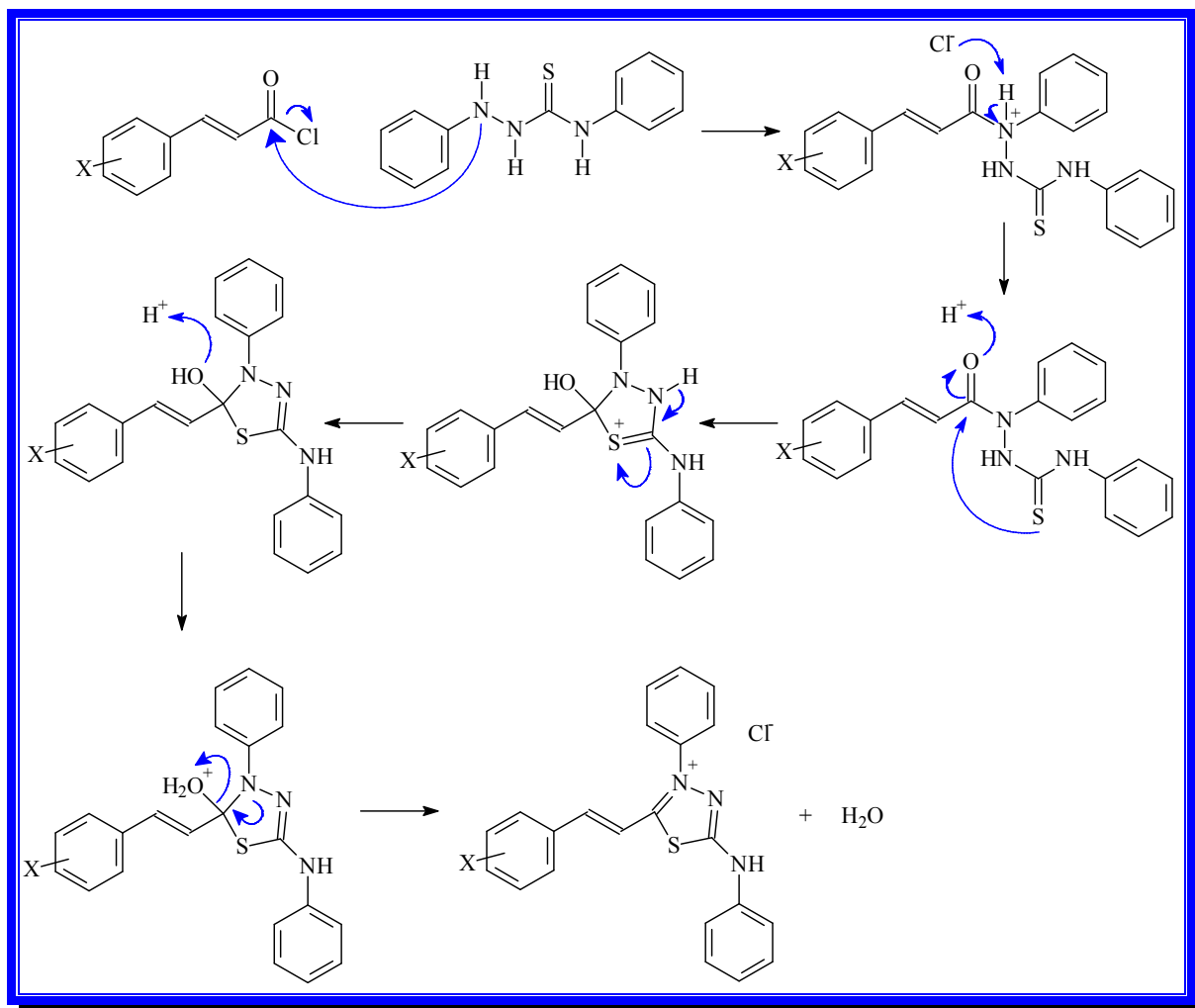


Figura 26. Mecanismo de reação sugerido para a obtenção do cloreto de 4,5-difenil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina.

Os compostos mesoiônicos foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C .

Os espectros de infravermelho indicaram absorções características aproximadas dos grupos N-H em 3400cm^{-1} , $\text{C}=\text{NH}^+$ em 2600cm^{-1} , $\text{C}=\text{C}$ vinílico em 1600cm^{-1} e $\text{C}=\text{N}$ em 1560cm^{-1} , além das absorções típicas referentes às ligações C-H e C=C aromáticas indicando o perfil de substituição. A atribuição para cada composto está descrita no tópico **3.2.1.4.1** de Materiais e Métodos e os respectivos espectros no Anexo.

Os espectros de RMN de hidrogênio para os sais dos compostos mesoiônicos, em sua maioria, não apresentaram resolução suficiente que permitisse a atribuição dos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos. No entanto, puderam ser observados os deslocamentos

químicos característicos dos hidrogênios olefínicos entre δ 7,07 a 8,26 para H α , e δ 6,17 e 7,41 para H β (com exceção dos derivados 2',4'-diF e 3',4'-diCl substituídos) e, do hidrogênio ligado ao nitrogênio exocíclico na faixa de δ 11,31 a 13,05 (espectros no Anexo). A Tabela 50 mostra os deslocamentos químicos dos hidrogênios H α , H β e H-N para os compostos analisados.

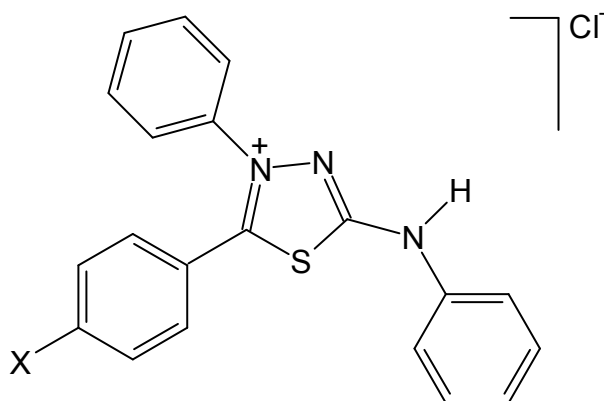
Tabela 50. Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ¹H dos sais mesoiônicos.

Derivados	NH	α	β	Aromáticos
4'-H	12,25	8,01	7,07	7,83-7,43
4'-Me	11,31	7,15	6,17	6,99-6,32
4'-OH	11,38	7,07	no.	6,96-5,94
4'-OMe	11,81	7,13	6,23	7,01-6,55
4'-OEt	12,22	7,96	6,90	7,85-6,97
2'-OMe	12,49	7,39	6,37	7,29-6,45
3'-OMe	12,38	7,92	7,06	7,86-7,31
3'-Cl	12,79	7,98	7,19	7,92-7,36
3'-Br	12,84	7,98	7,19	7,87-7,27
3', 4'-diCl	12,29	no.	no.	7,68-7,0
2', 4'-diF	13,05	no.	no.	7,74-6,82
4'-F	12,33	8,13	7,18	7,99-7,25
4'-Cl	12,61	8,11	7,22	7,98-7,52
4'-Br	12,58	8,00	7,10	7,86-7,17
4'-CN	12,74	8,05	6,69	7,91-7,13
4'-NO ₂	12,35	8,26	7,41	8,40-7,87

no. não observado

Os espectros de RMN de ^{13}C (Anexo) dos cloridratos dos compostos mesoiônicos foram atribuídos por etapas, ou seja, consideraram-se os átomos de carbono dos anéis aromáticos ligados ao N-exocíclico e ao N-4 do anel heterocíclico na primeira etapa e, posteriormente o anel cinamoíla substituído comparando-se com os espectros dos correspondentes ácidos cinâmicos.

As atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos dos anéis aromáticos ligados ao N-exocíclico e ao N-4 do anel heterocíclico, foram realizadas por comparação com valores da literatura para moléculas análogas da série dos cloretos de 4-fenil-5-(*p*-X-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminas (**45**) (MONTANARI *et al.*, 1994; SANTOS & ECHEVARRIA, 2001). Essas atribuições foram realizadas considerando-se resultados de difração de raios-X e cálculos teóricos (ECHEVARRIA, 1992) e experimentos com RMN de ^{15}N (MONTANARI *et al.*, 1994).

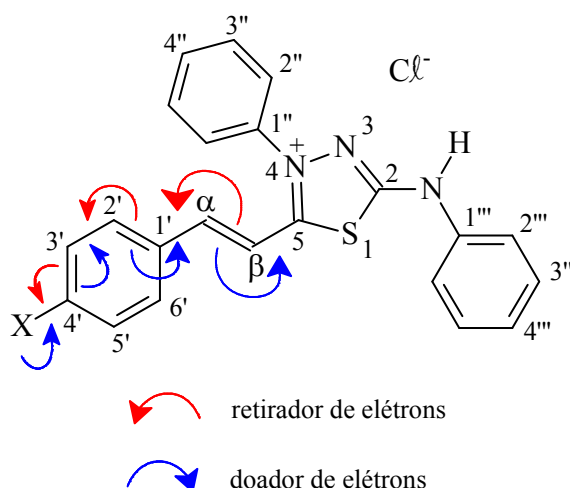


X = H, MeO, NO₂

45

Os átomos de carbono do anel heterocíclico foram assinalados com os maiores deslocamentos químicos, $\delta 163,94 - 159,15$ para C-5 e $\delta 159,68 - 157,94$ para C-2, com exceção dos compostos com substituintes OMe, que apresentaram os maiores valores para os carbonos em posição *ipso* ao grupo substituinte. O C-2 apresenta-se com os menores valores de deslocamento químico, fato este indicado por estudos de RMN de ^{15}N (MONTANARI, 1994).

Os carbonos C- α e C- β apresentaram deslocamentos químicos refletindo o efeito retirador de elétrons do anel heterocíclico, ou seja, o C α mostra-se sempre mais desprotegido na faixa de δ 141,11 a 149,93, enquanto que o C β mais protegido na faixa de δ 105,8 a 115,52. Essas variações foram coerentes, também, com a natureza dos efeitos eletrônicos dos substituintes, por exemplo, no caso do derivado 4'-NO₂ δ C β 115,52, enquanto que para 4'-OH δ 105,8 e, para o δ C α observou-se 149,93 para o derivado 4'-OH, sendo que para o 4'-NO₂ δ 144,67. A estrutura abaixo mostra os efeitos de ressonância envolvendo a presença de grupos retiradores e doadores de elétrons no grupo cinamoíla.



As atribuições dos carbonos do anel aromático ligado ao N-4 apresentaram, de maneira geral, maiores deslocamentos químicos quando comparados aos correspondentes do anel aromático ligado ao N-exocíclico devido, em parte, ao maior caráter positivo do N-4.

Os carbonos do anel cinamoíla X-substituído foram atribuídos por comparação dos deslocamentos químicos das moléculas análogas estudadas por Santos (SANTOS & ECHEVARRIA, 2001). Estes átomos mostraram deslocamentos químicos coerentes com a presença dos substituintes em função de sua natureza eletrônica considerando os efeitos de ressonância e indutivo. A Tabela 51 mostra os deslocamentos dos carbonos dos sais mesoiônicos.

Tabela 51. Deslocamentos químicos (ppm) de RMN ¹³C dos sais mesoiônicos.

C	4'-H	4'-Me	4'-OH	4'-OMe	4'-OEt	2'- OMe	3'- OMe	3'-Cl	3'-Br	3',4'- diCl	2',4'- diF	4'-F	4'-Cl	4'-Br	4'-CN	4'-NO ₂	3'-NO ₂
5	163,94	162,02	162,58	162,54	161,93	159,15	159,66	162,45	162,46	n.o	161,61	n.o	n.o.	162,3	161,00	162,05	n.o.
2	159,24	158,36	157,94	158,44	158,40	158,57	159,15	159,12	159,13	159,08	159,05	159,04	159,13	159,18	n.o.	159,68	n.o.
α	147,84	149,24	149,93	148,34	148,08	144,58	147,96	145,94	145,90	145,64	141,11	146,58	146,2	146,42	145,38	144,67	145,17
β	111,62	108,63	105,86	108,83	108,57	111,40	111,89	113,21	113,17	111,95	113,04	111,39	112,24	112,13	113,16	115,52	112,79
1'	134,32	130,24	124,72	135,22	137,07	122,11	135,22	135,99	136,26	136,54	n.o.	131,80	131,62	133,04	n.o.	139,99	134,50
2'	130,50	130,03	131,45	126,57	127,95	162,29	121,12	128,52	131,29	133,04	n.o.	130,57	129,21	130,90	128,69	129,56	125,21.
6'	130,50	130,03	131,45	126,57	127,95	133,94	117,62	126,16	128,00	132,12	132,77	130,57	129,21	130,90	128,69	129,56	133,42
3'	129,27	129,76	116,42	114,83	113,10	118,96	162,82	133,91	124,09	133,58	105,06	116,47	129,45	132,12	132,94	124,20	n.o.
5'	129,27	129,76	116,42	114,83	113,10	121,07	n.o.	130,94	130,19	129,87	112,60	116,47	129,45	132,12	132,94	124,20	129,75
4'	131,94	143,64	159,00	163,28	163,38	131,70	114,49	n.o.	134,17	136,34	n.o.	164,83	136,28	124,16	n.o.	148,59	122,70
1''	137,04	137,73	138,07	138,66	139,23	138,26	138,55	138,55	138,59	137,89	137,89	138,69	n.o.	n.o.	137,34	138,54	137,40
2'' e 6''	126,18	125,18	125,42	126,21	125,19	125,56	126,16	127,73	126,28	125,77	125,37	126,15	126,08	126,11	124,92	126,23	124,96
3'' e 5''	130,22	128,66	129,00	130,19	130,24	130,07	130,19	130,15	130,19	130,41	130,22	129,51	130,1	130,16	129,61	130,25	128,69
4''	133,88	131,77	131,67	131,58	131,54	130,51	131,74	131,71	131,73	131,30	132,02	131,67	132,76	131,68	131,54	131,90	131,58
1'''	n.o	136,33	139,49	137,05	138,65	136,87	137,02	137,02	137,05	136,66	136,55	136,96	136,97	136,95	137,00	137,05	136,30
2''' e 6'''	118,73	118,46	118,85	118,49	119,84	118,89	118,64	118,55	118,56	119,01	118,83	118,62	118,67	118,58	118,42	118,71	118,44
3''' e 5'''	129,59	128,84	130,18	129,48	128,94	128,89	129,54	129,43	129,43	129,04	129,02	130,16	130,69	129,45	128,51	130,15	124,63
4'''	124,23	124,21	124,24	123,35	124,79	124,04	124,22	124,09	122,46	124,43	124,47	124,12	124,03	125,46	124,36	124,32	124,36
<u>CH</u> ₃ CH ₂	-	-	-	-	14,53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>CH</u> ₂ O	-	-	-	-	63,68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeO	-	-	-	55,66	-	55,46	55,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH ₃	-	21,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

n.o. Não observado.

4.2 Estudo do Efeito Hidrofóbico

O estudo do efeito hidrofóbico foi realizado através da determinação do parâmetro $\log k_w$ que pode ser utilizado para quantificar a hidrofobicidade de uma substância.

Os valores de $\log k_w$ foram obtidos a partir da determinação dos tempos de retenção (t_R) dos derivados mesoiônicos, usando-se a técnica de CLAE. Na determinação foi utilizada, como fase estacionária, uma coluna C-18 de fase reversa, e como fase móvel uma mistura de metanol e solução tampão fosfato (pH \cong 7,4), nas proporções de 25 a 75% (v/v) de solvente orgânico em sistema isocrático.

Os valores de k' foram obtidos a partir dos dados de t_R da Tabela 49 (sessão de Material e Métodos), utilizando-se para tal cálculo a Equação 13. A Tabela 52 mostra os valores obtidos para $\log k'$.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

Equação 13

Tabela 52. Valores de $\log k'$ calculados em diferentes proporções da fase aquosa:tampão para os compostos mesoiônicos em estudo.

log k'								
Metanol :Tampão fosfato (%v/v)								
Derivado								
X	25:75	35:65	45:55	55:45	60:40	65:35	70:30	75:25
4'-NO₂	n.o	2,05	1,34	0,67	-	-0,08	-	-0,63
2',4'-diF	n.o	1,85	1,16	0,54	-	0,24	-	0,02
3',4'-diCl	n.o	2,72	1,92	1,2	-	0,33	-	0,25
4'-Cl	n.o	2,40	1,54	0,90	-	0,20	-	-0,54
3'-Cl	n.o	n.o	2,16	1,32	-	0,59	-	-0,10
4'-Br	n.o	2,61	1,89	1,08	-	0,34	-	-0,45
H	2,86	2,12	1,41	0,73	0,45	0,20	-0,08	0,32
4'-OEt	n.o	2,37	1,64	1,07	-	0,43	-	0,40
4'-OMe	n.o	2,19	1,70	1,10	-	0,58	-	0,24
2'-OMe	n.o	2,50	1,74	1,27	-	-0,17	-	-0,48
3'-OMe	n.o	2,09	1,38	1,01	-	-0,01	-	-0,53
4'-Me	n.o	2,41	1,73	0,89	-	0,39	-	-0,51

n.o não observado

Uma vez calculados os valores de k' , foram construídos os gráficos de $\log k'$ versus porcentagem de tampão (v/v), que deram origem as equações das retas obtidas por regressão linear mostradas na Tabela 53.

Tabela 53. Equações obtidas por regressão linear dos gráficos $\log k'$ versus % tampão para os derivados mesoiônicos.

Derivados X	Equações
4'-NO ₂	$\log k' = -2,38 (\pm 0,082) + 0,068 (\pm 0,002) \% \text{tampão}$ $r^a = 0,999 \quad dp^b = 0,055 \quad N^c = 5 \quad P^d < 0,0001$
2',4'-diF	$\log k' = -1,30 (\pm 0,29) + 0,046 (\pm 0,006) \% \text{tampão}$ $r = 0,973 \quad dp = 0,197 \quad N = 5 \quad P = 0,0052$
3',4'-diCl	$\log k' = -1,65 (\pm 0,37) + 0,065 (\pm 0,008) \% \text{tampão}$ $r = 0,979 \quad dp = 0,251 \quad N = 5 \quad P = 0,00375$
4'-Cl	$\log k' = -2,35 (\pm 0,088) + 0,072 (\pm 0,002) \% \text{tampão}$ $r = 0,999 \quad dp = 0,059 \quad N = 5 \quad P < 0,0001$
3'-Cl	$\log k' = -2,012 (\pm 0,101) + 0,075 (\pm 0,002) \% \text{tampão}$ $r = 0,999 \quad dp = 0,054 \quad N = 4 \quad P = 0,00104$
4'-Br	$\log k' = -2,36 (\pm 0,035) + 0,077 (\pm 0,001) \% \text{tampão}$ $r = 0,999 \quad dp = 0,023 \quad N = 5 \quad P < 0,0001$
H	$\log k' = -2,13 (\pm 0,096) + 0,066 (\pm 0,002) \% \text{tampão}$ $r = 0,998 \quad dp = 0,075 \quad N = 7 \quad P < 0,0001$
4'-OEt	$\log k' = -1,14 (\pm 0,34) + 0,052 (\pm 0,007) \% \text{tampão}$ $r = 0,971 \quad dp = 0,2298 \quad N = 5 \quad P = 0,00578$
4'-OMe	$\log k' = -1,097 (\pm 0,118) + 0,050 (\pm 0,003) \% \text{tampão}$ $r = 0,996 \quad dp = 0,079 \quad N = 5 \quad P = 2,72 \times 10^{-4}$
2'-OMe	$\log k' = -2,57 (\pm 0,415) + 0,079 (\pm 0,009) \% \text{tampão}$ $r = 0,982 \quad dp = 0,278 \quad N = 5 \quad P = 0,00295$
3'-OMe	$\log k' = -2,196 (\pm 0,233) + 0,066 (\pm 0,005) \% \text{tampão}$ $r = 0,992 \quad dp = 0,1562 \quad N = 5 \quad P = 8,94 \times 10^{-4}$
4'-Me	$\log k' = -2,25 (\pm 0,15) + 0,072 (\pm 0,003) \% \text{tampão}$ $r = 0,997 \quad dp = 0,1006 \quad N = 5 \quad P = 1,9 \times 10^{-4}$

^ar = coeficiente de correlação, ^bdp = desvio padrão, ^cN = número de pontos, ^dP = probabilidade.

Com as equações anteriormente obtidas, extrapolou-se à 100% da fase aquosa, e assim conseguiu-se estimar os valores de $\log k_w$ para os derivados em estudo (Tabela 54).

Tabela 54. Valores de $\log k_w$ obtidos por extrapolação para 100% da fase aquosa, utilizando-se as equações da Tabela 53, para os derivados mesoiônicos.

Derivados X	$\log k_w$	r^a
4'-NO₂	4,42	0,99
2',4'-diF	3,30	0,97
3',4'-diCl	4,85	0,98
4'-Cl	4,85	0,99
3'-Cl	5,49	0,99
4'-Br	5,34	0,99
H	4,47	0,99
4'-OEt	4,06	0,97
4'-OMe	3,90	0,99
2'-OMe	5,3	0,98
3'-OMe	4,43	0,99
4'-Me	4,95	0,99

^a coeficiente de correlação linear

Os valores de $\log k_w$ foram correlacionados com os resultados obtidos para as atividades biológicas e serão apresentados no tópico 4.5 deste trabalho.

4.3 Cálculos Teóricos

As estruturas dos 17 cloridratos mesoiônicos sintetizados foram modeladas e otimizadas utilizando-se o método semi-empírico através do programa MOPAC 6.0 e o hamiltoniano PM3. Os resultados dos cálculos teóricos possibilitaram a determinação dos parâmetros eletrônicos ΔH_f (calor de formação), μ (momento dipolar), HOMO (energia do orbital de fronteira ocupado de mais alta energia), LUMO (energia do orbital de fronteira desocupado de mais baixa energia) e P. I. (potencial de ionização). A Tabela 55 mostra os valores obtidos para os parâmetros eletrônicos da série de cloretos mesoiônicos preparados neste trabalho.

Tabela 55. Valores obtidos de cálculos semi-empíricos, utilizando o hamiltoniano PM3, para os sais dos mesoiônicos.

Compostos	gradiente	ΔH_f (kcal/mol)	μ (D)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	P. I. (eV)
4'-H	0,00869	313,50	1,67	-11,81	-5,22	11,81
4'-Me	0,00969	303,34	1,96	-11,60	-5,19	11,60
4'-OH	0,00932	267,24	2,77	-11,42	-5,18	11,42
4'-OMe	0,00627	273,90	2,09	-11,33	-5,07	11,33
4'-OEt	0,00891	267,84	3,26	-11,26	-5,04	11,26
2'-OMe	0,00714	273,97	1,22	-11,46	-5,15	11,46
3'-OMe	0,00993	276,22	4,34	-11,50	-5,24	11,50
3'-Cl	0,00917	308,01	4,60	-11,63	-5,27	11,63
3'-Br	0,00772	322,62	8,10	-11,89	-5,28	11,89
3', 4'-diCl	0,00849	303,04	7,88	-11,37	-5,29	11,37
2', 4'-diF	0,00779	231,68	6,42	-12,06	-5,28	12,06
4'-F	0,00954	271,58	4,79	-11,85	-5,30	11,85
4'-Cl	0,00900	307,68	5,17	-11,47	-5,26	11,47
4'-Br	0,00891	322,82	9,76	-11,72	-5,25	11,72
4'-NO ₂	0,00863	311,12	12,50	-12,05	-5,49	12,05
4'-CN	0,00981	352,35	7,91	-11,99	-5,38	11,99
3'-NO ₂	0,00693	309,46	9,43	-12,19	-5,42	12,19

Visando a comparação dos resultados dos cálculos teóricos para as estruturas dos sais dos mesoiônicos com as correspondentes bases livres (mesoiônicos), modelou-se os derivados não-substituído 4'-NO₂ e 4'-OEt-substituídos utilizando a mesma metodologia. A Tabela 56 indica os resultados obtidos para os mesoiônicos livres.

Tabela 56. Valores obtidos de cálculos semi-empíricos, utilizando o hamiltoniano PM3, para os mesoiônicos (bases livres -BL).

Compostos	gradiente	ΔH_f (kcal/mol)	μ (D)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	P. I. (eV)
BL4'-H	0,00928	179,12	6,78	-8,12	-1,49	8,12
BL4'-OEt	0,00989	137,36	8,15	-8,14	-1,28	8,14
BL4'-NO₂	0,00805	171,73	5,42	-8,49	-1,90	8,49

Analisando-se os resultados obtidos podem ser observadas características que expressam, especialmente, a importância dos efeitos eletrônicos dos substituintes. Considerando-se, por exemplo, o momento dipolar, observa-se que os sais dos compostos mesoiônicos com substituintes retiradores de elétrons apresentam os maiores valores, sempre acima de 4 D (Tabela 55)

No entanto, considerando-se as bases livres deve ser destacado a presença de dois pólos com cargas opostas e grande separação de cargas dentro da mesma molécula levando, de maneira geral, a um aumento na magnitude do momento dipolar. Entre as 3 bases livres modeladas, a 4'-NO₂-substituída apresentou uma diminuição do momento dipolar devido a maior eficiência do efeito de ressonância envolvendo a carga negativa da cadeia lateral para o anel heterocíclico, diminuindo assim, a separação de cargas. Esta diminuição, também pode estar relacionada à presença de duas cargas negativas na molécula, uma do átomo N-exocíclico e a outra do grupo nitro (Tabela 56).

Os potenciais de ionização apresentaram valores na faixa de 11,30 a 12,29 eV, enquanto que para as bases livres dos derivados não-substituído, 4'-NO₂ e 4'-OEt os valores se apresentam em torno de 8 eV indicando, como esperado, a maior facilidade na retirada de um elétron da camada de valência.

As energias calculadas para os orbitais HOMO mostraram-se, em geral, mais negativos quando há grupos retiradores de elétrons, do que quando sem substituinte. Da

mesma forma, são menos negativos quando há grupos doadores de elétrons. Esta tendência também é observada nas energias para os orbitais LUMO.

Os cloridratos mesoiônicos que apresentaram os melhores resultados para a atividade antitumoral e de inibição frente às enzimas DNA-topoisomerasas, bem como quanto à sua atividade antileishmania, tiveram suas estruturas otimizadas destacadas nas Figuras 27, 28, 29, 30, 31 e 32. As estruturas mostram uma quase planaridade entre o grupo cinamoíla e o anel heterocíclico, com exceção do derivado difluor-substituído. De fato, estudos anteriores mostraram o efeito de intercalação no DNA do timo de bezerro para os sais 4'-NO₂ e 4'-OH-substituídos (GRYNBERG, 1999). A planariedade observada pode ser um dos fatores que favorecem a interação dos mesoiônicos com o DNA, levando aos efeitos biológicos observados.



Figura 27. Estrutura tridimensional otimizada do sal do composto mesoiônico não substituído.

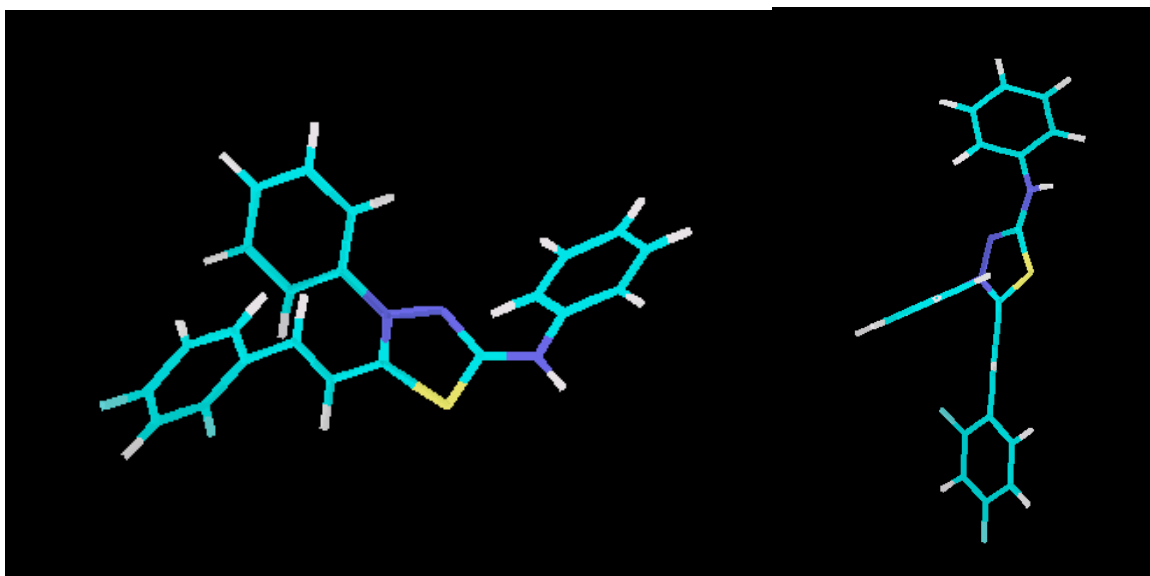


Figura 28. Estrutura tridimensional otimizada do sal do composto mesoiônico 2',4'-diF.

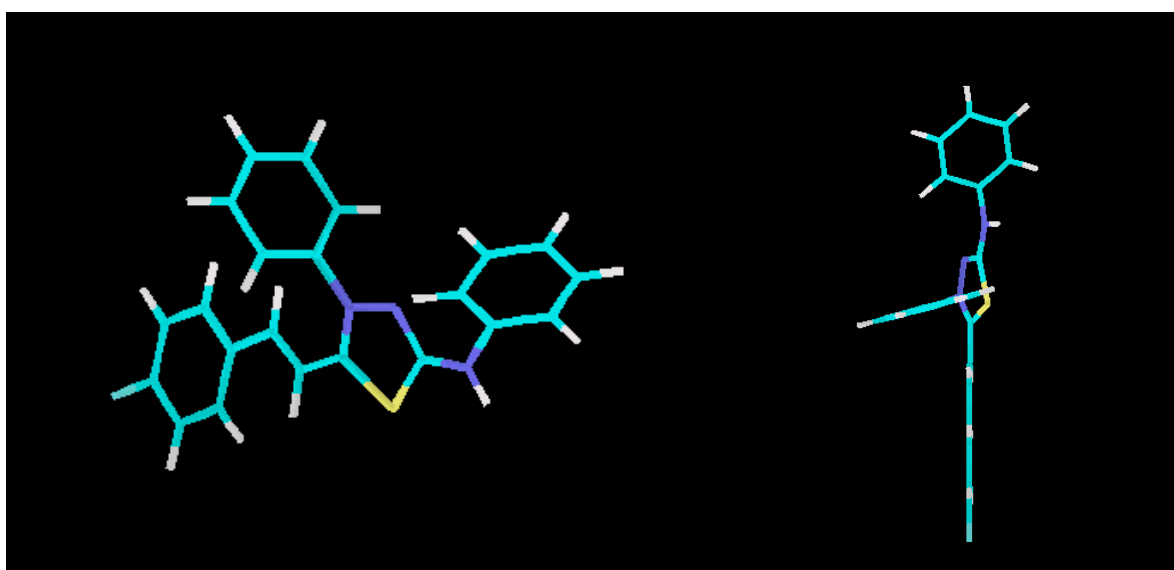


Figura 29. Estrutura tridimensional otimizada do sal do composto mesoiônico 4'-F.

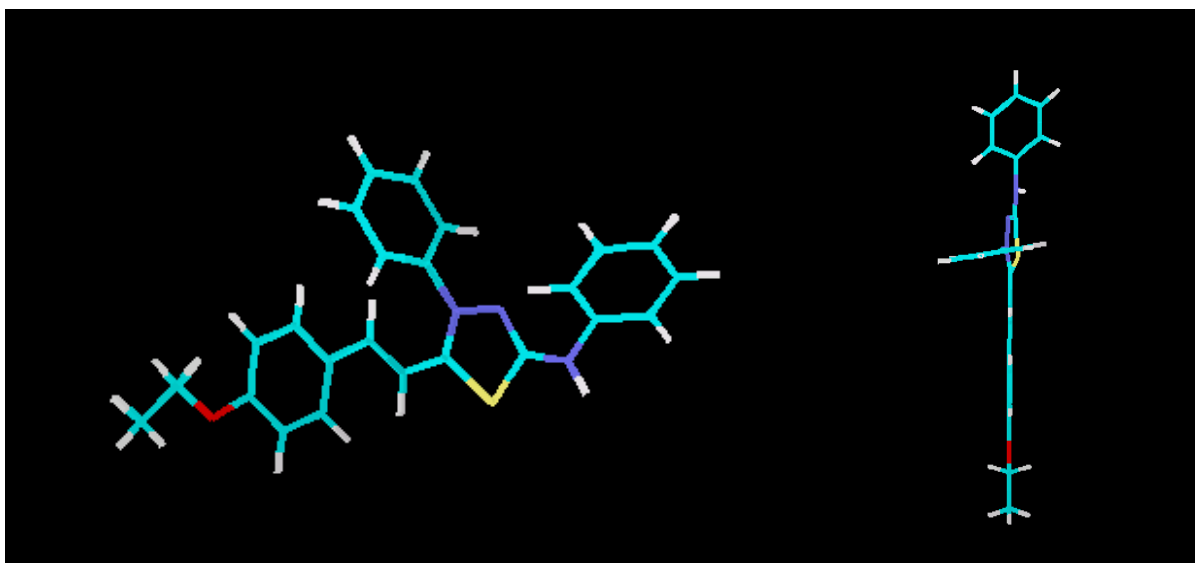


Figura 30. Estrutura tridimensional otimizada do sal do composto mesoiônico 4'-OEt.

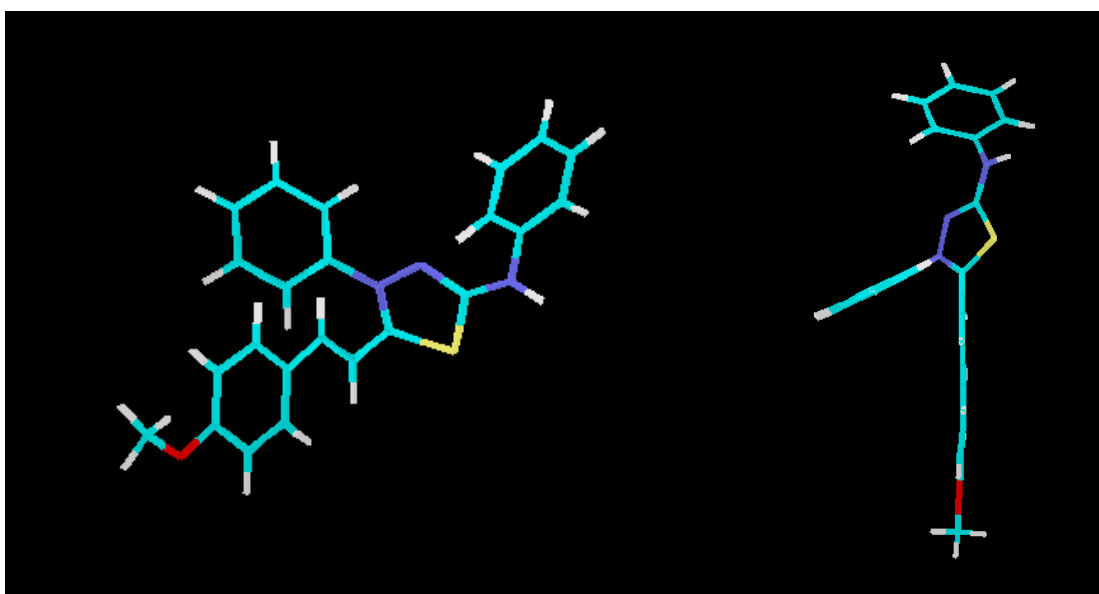


Figura 31. Estrutura tridimensional otimizada do sal do composto mesoiônico 4'-OMe.



Figura 32. Estrutura tridimensional otimizada do sal do composto mesoiônico 4'-NO₂.

4.4 Atividade Biológica

4.4.1 Atividades *in vitro*

4.4.1.1 Atividade citotóxica *in vitro* frente ao carcinoma de Ehrlich

Os sais dos compostos mesoiônicos sintetizados neste trabalho de tese foram submetidos a ensaios *in vitro* frente a células do carcinoma de Ehrlich. Foram ensaiados 11 derivados sendo que destes apenas o 4'-Me substituído não possibilitou a obtenção do valor de IC₅₀, sendo ensaiado até a concentração de 100µM.

O método utilizado para investigar a atividade biológica dos derivados mesoiônicos frente ao crescimento das células de Ehrlich foi o de Mosmann (1983), devido a sua sensibilidade e rapidez possibilitando a análise de grande número de amostras. O método está baseado na quantificação do efeito de redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) causado pelas enzimas desidrogenases presentes nas células viáveis. O MTT apresenta cor amarela e, quando reduzido à correspondente formazana insolúvel, posteriormente solubilizada em isopropanol acidificado, passa a cor violeta, Figura 33. A concentração de formazana formada é proporcional a quantidade de desidrogenases

presentes nas células vivas, sendo determinada através do valor de absorvância em $\lambda = 570$ nm.

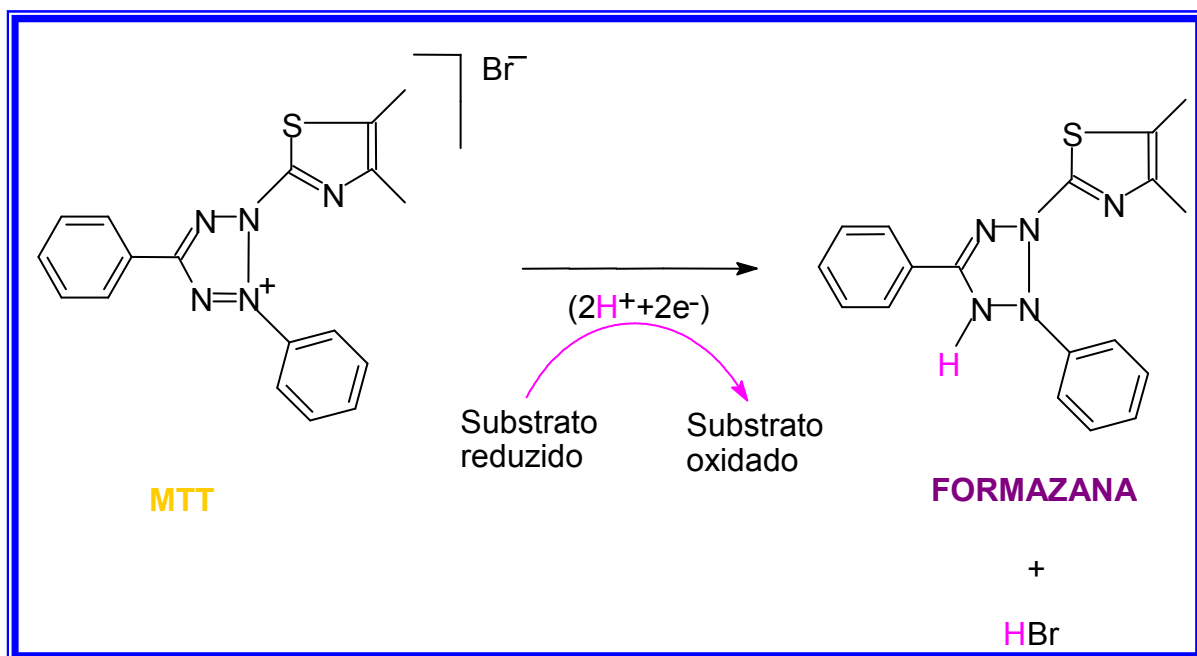


Figura 33. Biorredução do MTT na presença das enzimas desidrogenases para produzir a formazana.

Os cloretos dos derivados mesoiônicos apresentaram atividade *in vitro* contra células do carcinoma de Ehrlich, em cultura de 24 horas, sendo utilizado como controle positivo a etoposida que apresentou apenas $44,61 \pm 1,67$ na inibição do crescimento na dose de $100 \mu\text{M}$. Os valores dos IC_{50} obtidos para os sais mesoiônicos estão mostrados na Tabela 57, incluindo valores obtidos anteriormente para o derivado não substituído, $4'$ - NO_2 e $4'$ - OME substituídos (GRYNBERG, 1999).

Tabela 57. Valores dos coeficientes de correlação das equações para obtenção dos IC₅₀ (μM) dos sais dos mesoiônicos frente a células do carcinoma de Ehrlich.

Compostos	IC ₅₀ (μM)	R ^{2a}
4'-F	57,31	1
4'-Cl	54,03	1
4'-Br	53,09	0,9996
3'-Cl	36,39	1
3'-Br	30,07	0,9998
2',4'-diF	65,06	0,9924
2',4'-diCl	84,88	1
4'-OH	92,00	0,9797
2'-OMe	29,53	0,9961
4'-OEt	17,29	0,9952
4'-Me	b	-
H	17,9	c
4'-OMe	34,1	c
4'-NO ₂	7,8	c

^aCoefficiente de correlação cruzada. ^b48% de inibição a 100μM. ^cGrynberg, 1999.

A Figura 34 mostra o gráfico de barras com os valores de IC₅₀ (μM) dos sais dos mesoiônicos frente a células do carcinoma de Ehrlich ilustrando comparativamente o efeito antiproliferativo investigado neste trabalho.

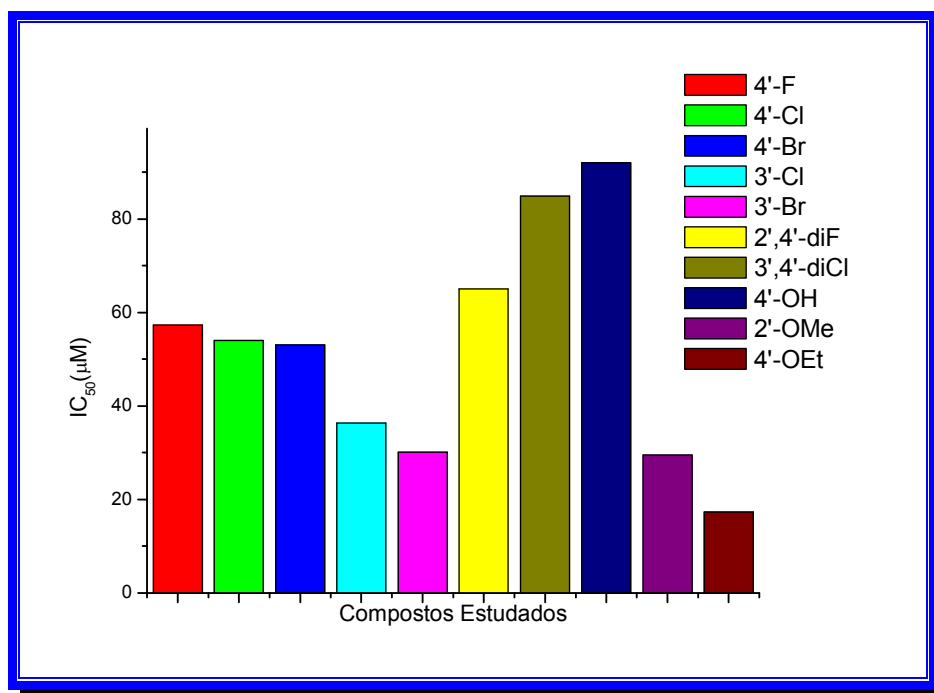


Figura 34. Gráfico ilustrando a comparação entre os valores de IC₅₀ (µM) dos sais mesoiônicos frente a células do carcinoma de Ehrlich.

O efeito citotóxico dos derivados mesoiônicos observado frente a células do carcinoma de Ehrlich não apresenta dependência apenas do efeito eletrônico, pois verificando-se a correlação linear entre os valores de IC₅₀ e das constantes de Hammett (σ , σ_R e σ_I), não foi observada linearidade significativa.

Os composto mesoiônico 4'-NO₂-substituído foi estudado quanto a mecanismo de ação citotóxica e esta foi relacionada à sua atuação como desacoplador da fosforilação oxidativa (CADENA *et al*, 1998).

4.4.1.2 Ensaios *in vitro* frente a DNA-topoisomerase II α

As DNA-topoisomerasas são enzimas nucleares importantes e necessárias para a viabilidade de todos os organismos vivos e se apresentam com elevada expressão na maioria dos cânceres humanos, tornando-se o alvo de vários agentes anti-câncer como, por exemplo, a campotecina, actinomicina D e a morfolinodoxorrubicina, entre outros (POMMIER *et al*, 1998, KELLNER *et al*, 2000).

A atividade da topoisomerase II é necessária em presença de DNA em espiral durante as etapas de replicação e transcrição e, quando a forma do DNA é linear, esta é essencial na condensação cromossômica e na segregação. Por estas razões, a topo II é altamente expressa durante as fases S, G₂ e M do ciclo celular (CHEN & LIU, 1994; VALKOV & SULLIVAN, 2003).

Neste trabalho de tese, foi estudada a ação, pela primeira vez, dos sais derivados de compostos mesoiônicos cloreto de 4-fenil-5-[2',3' ou 4'-X-fenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, onde X = 4'-Cl, 4'-F, 4'-Br, 4'-H, 4'-Me, 4'-OMe, 4'-NO₂, 4'-OH, 4'-OEt, 4'-CN, 2'-OMe, 2',4'-diF, 3'-Cl, 3'-OMe, 3'-Br, 3',4'-diCl, frente a topoisomerase II humana tipo α , no ensaio de relaxamento ou desencadeamento sobre o DNA circular anelado do plasmídeo kDNA.

Os produtos das reações envolvendo os compostos mesoiônicos, a enzima (topo II α) e o DNA super-helicoidal foram avaliados através de eletroforese em agarose, revelados na presença de brometo de etídio, de acordo com a seção de Material e Métodos, sendo posteriormente fotografados por câmara digital. Os mesoiônicos foram incubados em diferentes concentrações na faixa de 120 a 30 μ M e, como controle positivo, foi utilizada a etoposida, inibidor específico da topo II (Figura 35).

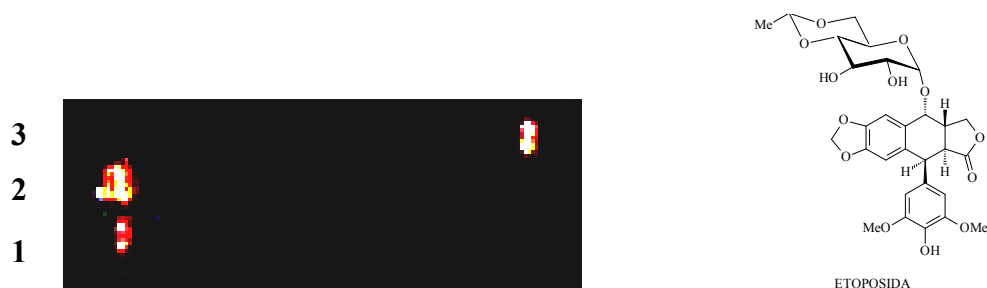


Figura 35. Eletroforese em gel de agarose mostrando o ensaio com a topo II α e etoposida no relaxamento do kDNA. 1. kDNA, topo II e etoposida (100 μ M); 2. kDNA puro; 3. kDNA e topo II.

A Figura 36 indica os compostos ensaiados e a Tabela 58 mostra os resultados obtidos para os derivados mesoiônicos que apresentaram atividade sobre a topo II α .

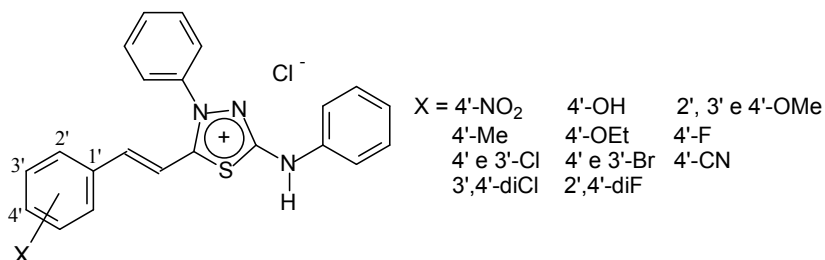


Figura 36. Sais dos mesoiônicos ensaiados frente a topo II α .

Tabela 58. Resultados da ação dos mesoiônicos sobre a topoisomerase II- α .

Concentrações (μ M)	Sais dos compostos mesoiônicos						
	4'-Me	2',4'-diF	4'-OMe	3'-OMe	4'-OEt	4'-F	2'-OMe
120	+	+	+	+	+	----	----
60	----	+	+	+	+	+	----
30	----	+	+	----	----	+	+

O sinal + indica inibição do relaxamento do DNA circular anelado.

A Figura 37 mostra o resultado da eletroforese dos produtos de reação utilizando-se os derivados mesoiônicos fluorados 4'-F e 2',4'-diF, que nas concentrações de 30 e 60 μ M inibiram a atividade da topo II α , conforme as linhas de 7 a 11, onde pode ser observado apenas a revelação do DNA circular indicando que não houve seu relaxamento.

A Figura 38 mostra a eletroforese dos produtos das reações com diversos dos derivados mesoiônicos frente a topo II α na concentração de 120 μ M. Dentre esses resultados pode ser observado que apenas os derivados 4'-Me e 4'-OMe apresentaram efeito inibitório da relaxação do DNA circular, como mostrado nas linhas 6 e 7.

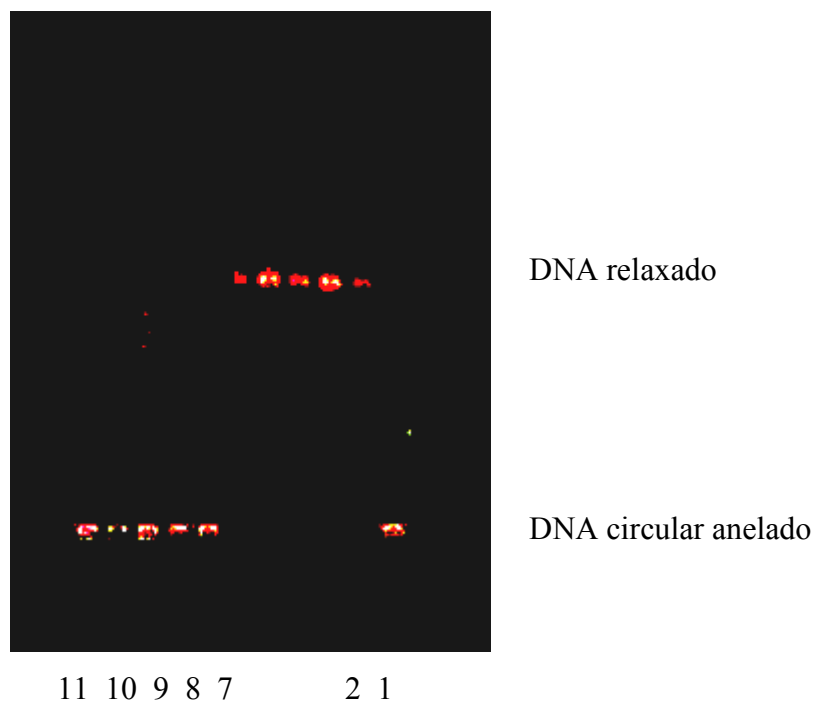


Figura 37. Eletroforese do ensaio com a topo II α : 1. kDNA puro; 2. kDNA e topo II α ; 7. kDNA, topo II e 4'-F (60 μ M); 8. kDNA, topo II e 4'-F (30 μ M); 9. kDNA, topo II e 2',4'-diF (120 μ M); 10. kDNA, topo II e 2',4'-diF (60 μ M); 11. kDNA, topo II e 2',4'-diF (30 μ M).

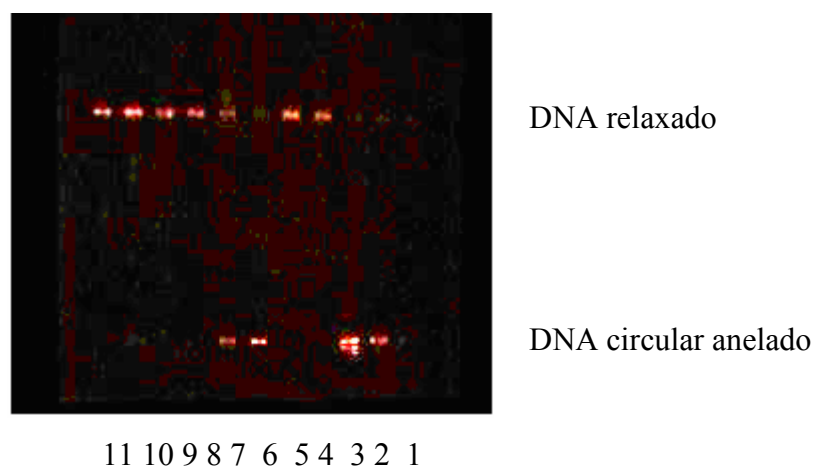


Figura 38. Eletroforese do ensaio com topo II α : 1. kDNA + etoposida (50 μ M) + topo II (não apareceu); 2. kDNA + etoposida (100 μ M) + topo II; 3. kDNA puro; 4. kDNA + topo II; 5. H + kDNA + topo II; 6. 4'-Me + kDNA + topo II; 7. 4'-OMe + kDNA + topo II; 8. 4'-NO₂ + kDNA + topo II; 9. 4'-OH + kDNA + topo II; 10. 3'-OMe + kDNA + topo II; 11. 3'-Br + kDNA + topo II.

As Figuras 39 e 40 apresentam os resultados da eletroforese para os derivados 3'-OMe e 4'-OEt, respectivamente, que também apresentaram inibição da topo II α . Esses derivados apresentaram atividade sobre a enzima nas concentrações de 60 e 120 μ M, conforme é observado nas linhas 9 e 10 para o derivado 4'-OMe (Figura 37), e nas linhas 5 e 6 para 4'-OEt (Figura 38).

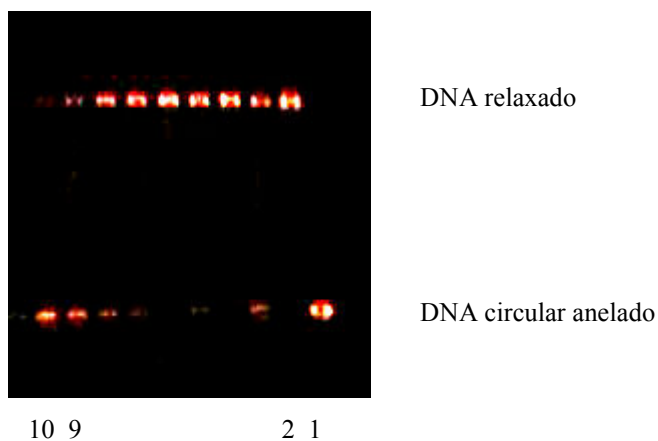


Figura 39. Eletroforese do ensaio com a topo II α : 1. kDNA puro; 2. kDNA + topo II α ; 9. kDNA, topo II e 3'-OMe (60 μ M); 10. kDNA, topo II e 3'-OMe (30 μ M).

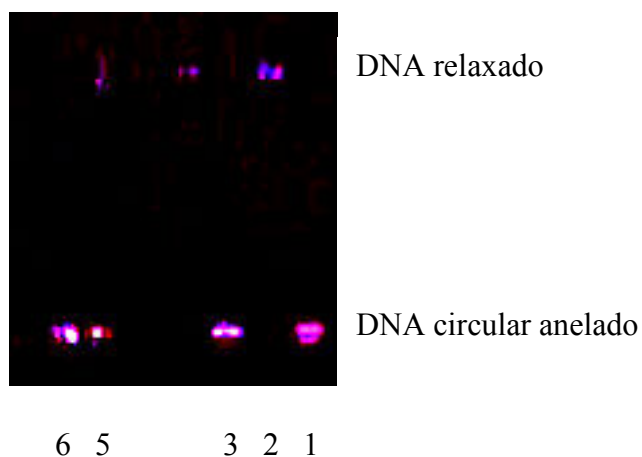


Figura 40. Eletroforese do ensaio com a topo II α : 1. kDNA puro; 2. kDNA + topo II α ; 3. 2',4'-diF (120mM), kDNA e topo II; 5. kDNA, topo II e 4'-OEt (120 μ M); 6. kDNA, topo II e 4'-OEt (60 μ M).

Finalmente, a Figura 41 mostra os resultados de outro ensaio com a topo II α onde o derivado 3'-OMe apresenta atividade inibitória nas concentrações de 30 a 120 μ M, linhas 9 – 11 e, a Figura 42 apresenta os demais mesoiônicos ensaiados, onde a maioria não apresentou atividade inibitória.

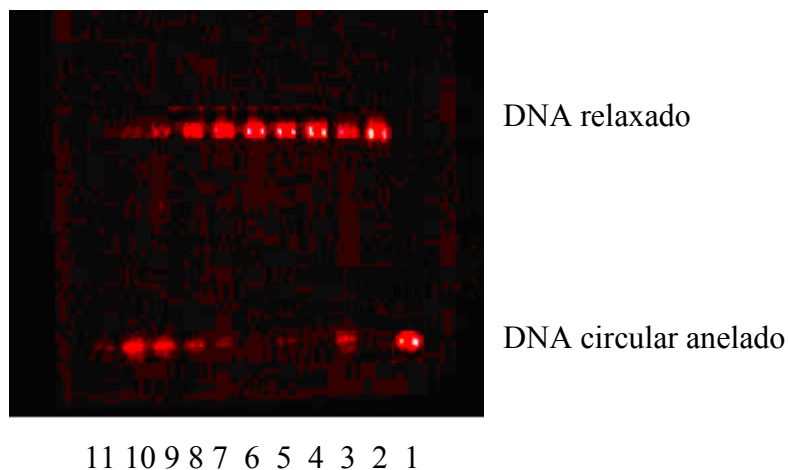
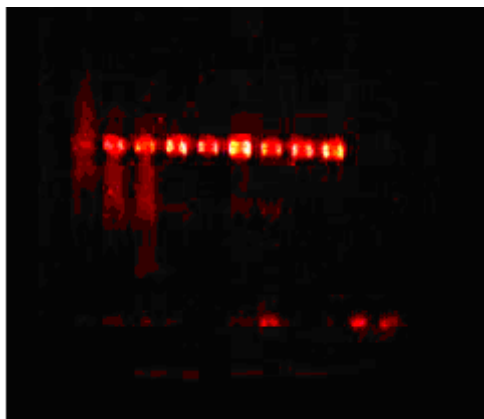


Figura 41. Eletroforese do ensaio com a topo II α : 1. kDNA puro (com ATP); 2. kDNA + topo II; 3. 4'-Me (120 μ M) + kDNA + topo II; 4. 4'-Me (60 μ M) + kDNA + topo II; 5. 4'-Me (30 μ M) + kDNA + topo II; 6. 4'-OMe (120 μ M) + kDNA + topo II; 7. 4'-OMe (60 μ M) + kDNA + topo II; 8. 4'-OMe (30 μ M) + kDNA + topo II; 9. 3'-OMe (120 μ M) + kDNA + topo II; 10. 3'-OMe (60 μ M) + kDNA + topo II; 11. 3'-OMe (30 μ M) + kDNA + topo II.



11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

Figura 42. Eletroforese do ensaio com a topo II α : 1. kDNA puro (com ATP); 2. kDNA + topo II; 3. 2'-OMe (120 μ M) + kDNA + topo II; 4. 2'-OMe (60 μ M) + kDNA + topo II; 5. 2'-OMe (30 μ M) + kDNA + topo II; 6. 4'-CN (120 μ M) + kDNA + topo II; 7. 4'-CN (60 μ M) + kDNA + topo II; 8. 4'-CN (30 μ M) + kDNA + topo II; 9. 4'-OEt (120 μ M) + kDNA + topo II; 10. 4'-OEt (60 μ M) + kDNA + topo II; 11. 4'-OEt (30 μ M) + kDNA + topo II.

Os resultados observados para os ensaios envolvendo a ação dos derivados mesoiônicos com a DNA topoisomerase II α não indicaram inibição seletiva em função dos efeitos eletrônicos dos substituintes, ou seja, tanto derivados substituídos com grupos doadores como retiradores de elétrons, apresentaram atividade nos ensaios de relaxamento do kDNA circular anelado.

Notou-se que, com exceção do grupo metila, os que apresentaram atividade possuem átomos aceptores de ligação de hidrogênio (O ou F), ligados diretamente ao anel. Pode ser então, que para estes derivados, a atividade esteja relacionada com uma interação do tipo ligação de hidrogênio, com a enzima ou com o kDNA.

4.4.1.3 Ensaios *in vitro* frente a DNA topoisomerase I

A DNA topoisomerase I também se apresenta como um importante alvo para a quimioterapia do câncer. A regulação da topoisomerase I ocorre na etapa de transcrição e

tradução que envolve o DNA. Diversos trabalhos da literatura também indicam o alto nível de expressão da topo I em tumores malignos (VAN DER ZEE *et al*, 1991).

Os derivados mesoiônicos sintetizados neste trabalho de tese também foram ensaiados frente a topoisomerase I mostrando resultados muito interessantes.

Os produtos das reações envolvendo os compostos mesoiônicos, a enzima topo I e o DNA super-helicoidal do plasmídeo Φx foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose, revelados na presença de brometo de etídio, de acordo com a seção de Material e Métodos, sendo posteriormente fotografados por câmara digital. Os mesoiônicos foram incubados em diferentes concentrações na faixa de 120 a 30 μM e como controle positivo foi utilizada a campotecina, inibidor específico da topo I.

A Figura 43 mostra os resultados das reações de alguns derivados mesoiônicos com o DNA super-helicoidal do plasmídeo Φx e a topo I. Pode ser observado que apenas o derivado mesoiônico 2',4'-diF substituído inibiu fracamente a ação da topo I através do ensaio de relaxamento, pois a banda do DNA super-helicoidal pode ser observada. Neste ensaio, a campotecina, inibidor específico da topo I, também não funcionou na inibição do relaxamento do DNA.

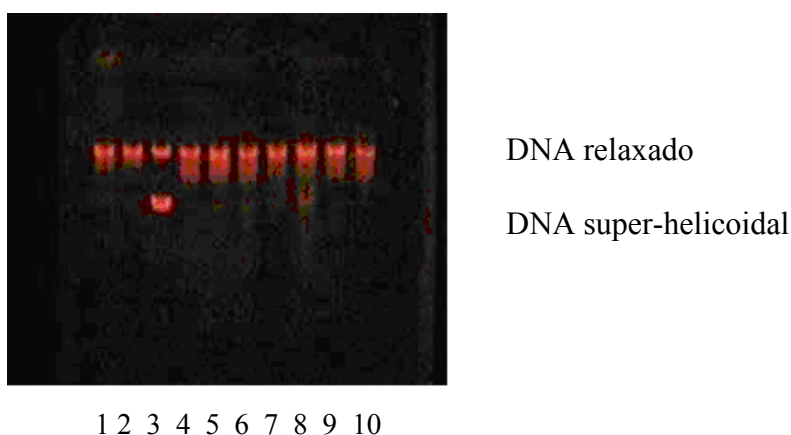


Figura 43. Eletroforese do ensaio com a topo I: 1. Campotecina (25 μM) + Φx + topo I; 2. derivado não estudado nesta tese (120 μM) + Φx + topo I; 3. Φx puro; 4. Φx + topo I; 5. 4'-Cl (120 μM) + Φx + topo I; 6. 4'-F (120 μM) + Φx + topo I; 7. 4'-Br (120 μM) + Φx + topo I; 8. 2',4'-diF (120 μM) + Φx + topo I; 9. 3',4'-diCl (120 μM) + Φx + topo I; 10. 3'-Cl (120 μM) + Φx + topo I.

A Figura 44 apresenta a eletroforese correspondente ao ensaio com os derivados não-substituído, 4'-Me, 4' OMe, 4'-NO₂, 4'-OH, 3'-Br e 3'-OMe e a campotecina como controle

positivo. O resultado do ensaio permite observar que os derivados 4'-OMe, 4'-OH e 3'-Br inibiram parcialmente a ação da topo I sobre o DNA super-helicoidal do plasmídeo Φ x. A eletroforese dos produtos de reação possibilitaram, também, a observação dos topoisômeros do DNA relaxado.

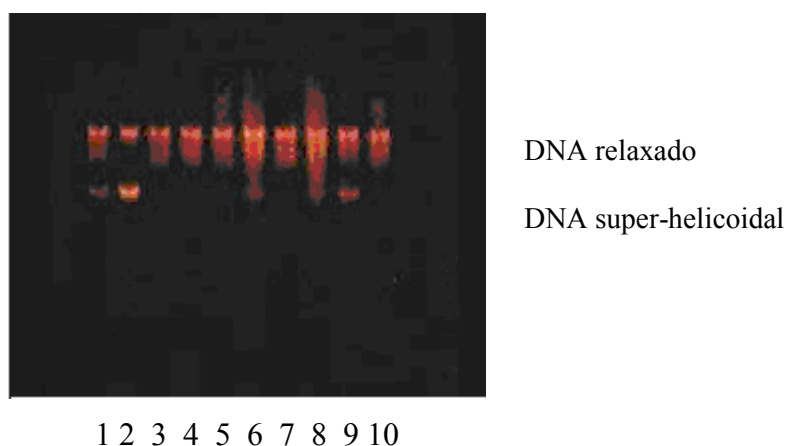
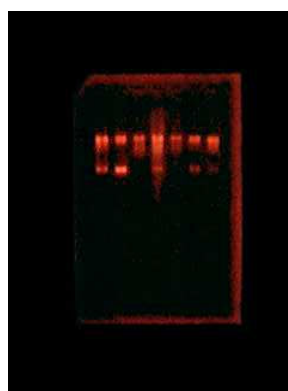


Figura 44. Eletroforese do ensaio com a topo I: 1. Campotecina (25 μ M) + Φ x + topo I; 2. Φ x puro; 3. Φ x + topo I; 4. H (120 μ M) + Φ x + topo I; 5. 4'-Me (120 μ M) + Φ x + topo I; 6. 4'-OMe (120 μ M) + Φ x + topo I; 7. 4'-NO₂ (120 μ M) + Φ x + topo I; 8. 3'-Br (120 μ M) + Φ x + topo I; 9. 4'-OH (120 μ M) + Φ x + topo I; 10. 3'-OMe (120 μ M) + Φ x + topo I.

Os resultados indicados na eletroforese mostrada na Figura 45 destacam a ação inibitória sobre a topo I dos derivados 4'-OEt e 2'-OMe, na concentração de 120 μ M, observada pela manutenção da banda do DNA super-helicoidal, linhas 4 e 6, de forma similar a linha 2 onde pode ser vista a banda correspondente ao plasmídeo Φ x, ou seja, DNA super-helicoidal, além, do resultado a ação da campotecina, inibidor específico bem conhecido.

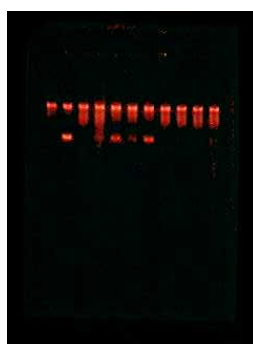


DNA relaxado
DNA super-helicoidal

1 2 3 4 5 6

Figura 45. Eletroforese do ensaio com a topo I: 1. Campotecina ($25\mu\text{M}$) + Φx ($0,125\mu\text{g}$) + topo I; 2. Φx puro; 3. Φx + topo I; 4. $4'\text{-OEt}$ ($120\mu\text{M}$) + Φx + topo I; 5. $4'\text{-CN}$ ($120\mu\text{M}$) + Φx + topo I; 6. $2'\text{-OMe}$ ($120\mu\text{M}$) + Φx + topo I.

Finalmente, a Figura 46 mostra os resultados da eletroforese dos produtos das reações da topo I com os derivados $4'\text{-OEt}$ ($120\mu\text{M}$) e, devido à ação mais intensa do $2'\text{-OMe}$ (Figura 45), nas concentrações de 30, 60 e $120\mu\text{M}$. Observa-se que esses derivados, em todas as concentrações ensaiadas, atuaram sobre a topo I inibindo o relaxamento parcial do DNA Φx .



DNA relaxado
DNA super-helicoidal

1 2 3 4 5 6 7

Figura 46. Eletroforese do ensaio com a topo I: 1. Campotecina ($25\mu\text{M}$) + Φx ($0,125\mu\text{g}$) + topo I; 2. Φx puro; 3. Φx + topo I; 4. $4'\text{-OEt}$ ($120\mu\text{M}$) + Φx + topo I; 5. $2'\text{-OMe}$ ($120\mu\text{M}$) + Φx + topo I; 6. $2'\text{-OMe}$ ($60\mu\text{M}$) + Φx + topo I; 7. $2'\text{-OMe}$ ($30\mu\text{M}$) + Φx + topo I.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios com a DNA topoisomerase I, observou-se que os derivados mesoiônicos com grupos doadores de elétrons atuaram sobre a enzima inibindo sua ação no relaxamento do DNA super-helicoidal utilizado nos testes. Dentre os ensaios realizados, o derivado que apresentou maior ação inibitória frente a topo I, após avaliação qualitativa, foi o 2'-OMe substituído.

4.4.2 Atividade antitumoral *in vivo* frente ao carcinoma de Ehrlich

A atividade antitumoral dos derivados mesoiônicos 4'-F, 4'-Cl, 4'-Br, 2',4'-diF e 2',4'-diCl substituídos foi avaliada frente ao carcinoma de Ehrlich via ip, inicialmente com a dose total de 8 mg/kg.

A utilização, inicialmente, da dose total de 8 mg/kg foi baseada em resultados anteriores para outros seis mesoiônicos que indicaram atividade significativa contra o carcinoma de Ehrlich e o Sarcoma 180 com o tratamento que utilizava de 10 a 25mg/kg (GRYNBERG *et al*, 1997).

Assim, os ensaios iniciais foram realizados com a dose total de 8 mg/kg sendo que a maioria dos mesoiônicos testados mostraram atividade antitumoral significativa, com exceção dos derivados 4'-Br e 2',4'-diCl, sendo que com valores de %T/C = 104,72 e 117,32, respectivamente, ou seja, justificando novos ensaios com aumento da dose total.

Posteriormente, novos ensaios foram realizados utilizando-se o mesmo esquema de tratamento, ou seja, doses dos derivados mesoiônicos inoculadas via ip nos dias 1, 2 e 4, após a inoculação do tumor (dia 0), com as doses totais de 4 e 16 mg/kg. Os mesoiônicos foram dissolvidos em DMSO:salina na proporção de 80:20 sendo o veículo utilizado como controle negativo. Os ensaios foram realizados com grupos de 6 animais SW ou singênicos C57BL/10 machos. O parâmetro utilizado para a avaliação da atividade antitumoral foi o aumento da sobrevivência em comparação ao controle através da expressão citada na seção de Material e Métodos (GERAN, 1972).

Os resultados observados mostraram atividade antitumoral significativa para a maioria dos derivados ensaiados, sendo o derivado 4'-Cl substituído apresentou maior valor de %T/C = 174,43 (valor significativo quando %T/C \geq 125) na dose total de 16 mg/kg e o derivado 2',4'-diF que mostrou atividade significativa com todas as doses totais testadas, ou seja, 4 mg/kg levou a % T/C = 155,36; 8 mg/kg a %T/C = 166,14 e com a dose de 16 mg/kg

observou-se um valor de %T/C = 160,59. O controle positivo foi realizado com o 5-fluouracil, agente quimioterápico bem conhecido, que não mostrou atividade anti-tumoral no esquema de tratamento utilizado na dose total de 8 mg/kg.

A Tabela 59 reúne os resultados obtidos para a atividade antitumoral dos sais dos mesoiônicos frente ao carcinoma de Ehrlich *in vivo*.

Tabela 59. Resultados da atividade antitumoral *in vivo* dos derivados mesoiônicos frente ao carcinoma de Ehrlich.

X	Dose total (mg/kg)	% T/C^a	N^o de animais vivos^b
4'-Cl	4	108,91	0
	8	142,52	1
	16	174,43	0
3',4'-diCl	4	108,44	0
	8	117,32	0
	16	124,60	0
4'-F	4	98,45	0
	8	125,98	1
	16	156,90	0
2',4'-diF	4	155,36	0
	8	166,14	1
	16	160,59	1
4'-Br	8	104,72	0
	16	143,05	0
salina		86,61	0
Fluorouracil	8	96,85	0

^a %T/C ≥ 125 indica atividade anti-tumoral significativa. ^b no dia 70.

Observando-se os resultados obtidos pode ser sugerida uma correlação com os resultados *in vitro*, ou seja, a atividade antitumoral *in vivo* também não parece depender apenas do efeito eletrônico devendo estar conjuntamente envolvido o efeito hidrofóbico. Como pode ser observado, o número de grupos retiradores de elétrons, por exemplo, não corresponde ao aumento da atividade antitumoral, ou seja, para o derivado 4'-Cl o valor de %T/C foi de 142,52 enquanto que para o derivado 2',4'-diCl %T/C = 117,32, indicando uma não dependência somente do efeito eletrônico, pois o contrario foi observado para os derivados fluorados, ou seja, 4'-F %T/C = 125,98 e para o 2',4'-diF %T/C = 166,14, para a dose total de 8mg/kg para todos os casos.

Os resultados observados foram muito interessantes, sendo que confirmaram a atividade antitumoral dos compostos mesoiônicos já observada para outros derivados da série dos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas cinamoil-substituídos, na forma de cloridratos, como os 4'-NO₂ e 4'-OH substituídos que apresentaram atividade antitumoral *in vivo* frente ao carcinoma de Ehrlich e ao Sarcoma 180 (GRYNBERG *et al*, 1997).

Recentemente, em trabalhos com a colaboração do grupo de pesquisa da Profa. Maria Benigna de Oliveira do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, uma série de atividades biológicas relacionadas à atividade anticâncer tem sido desenvolvidas com os mesoiônicos sintetizados neste trabalho de tese. Um dos trabalhos mostrou a ação dos mesoiônicos 4'-NO₂, 4'-OH, 2',4'-diF, e 4'-F substituídos na atividade anticâncer frente ao melanoma murino B16-F10 em ensaios *in vitro* e *in vivo*, sendo que destes apenas o 4'-OH substituído não apresentou atividade significativa na concentração de 50 µM. Além disso, o mais ativo foi o 4'-NO₂ substituído, inibindo significativamente o crescimento celular do melanoma na concentração de apenas 10µM. Dentre os mesoiônicos ensaiados *in vivo* o 4'-NO₂ substituído foi o mais eficiente, apresentando inibição de 77% do crescimento do melanoma (SEFFF-RIBEIRO *et al*, 2004). A ação do referido mesoiônico nitro-substituído foi comparada a dos agentes quimioterápicos usados em clínica no tratamento de melanomas humanos, fotemustine e dacarbazine, tendo apresentado 85% da inibição do crescimento tumoral quando administrado ip em única dose de 57µmol/kg, indicado importante resultado de sua possível utilização como agente anticâncer (SEFFF-RIBEIRO, *et al*, 2003).

4.4.3 Atividade anti-*Leishmania*

Os estudos de atividade anti-*Leishmania* foram realizados *in vitro* com uma série de 14 sais de compostos mesoiônicos (**5**), mostrando-se bastante promissores contra *L. amazonensis*, quando comparados com a droga de referência, pentamidina (Tabela 60).

Estes estudos foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos do Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz, coordenados pelas Dra. Leonor Leon e Dra. Marilene Canto-Cavalheiro. Os ensaios foram realizados frente às formas evolutivas promastigotas e amastigotas cultivadas na forma axênica.

Os derivados mesoiônicos com substituintes 4'-OMe ($IC_{50} = 0,17 \mu M$) e 3'-OMe ($IC_{50} = 0,04 \mu M$) foram mais ativos do que a pentamidina ($IC_{50} = 0,46 \mu M$), quando ensaiados contra a forma promastigota do parasita. O derivado não substituído e os derivados 4'-OMe, 4'-NO₂, 4'-F, 4'-CN, 4'-Br, 4'-OEt, 4'-OH, 3'-OMe e 3'-Br, demonstraram maior atividade do que a Pentamidina ($IC_{50} = 118 \mu M$) frente a forma amastigota do parasita, conforme indicado na Tabela 60.

Tabela 60. Valores de IC₅₀^a (μM) dos sais de compostos mesoiônicos contra *L. amazonensis*.

X	Promastigotas		Amastigotas	
	IC ₅₀ ± dp ^b		IC ₅₀ ± dp	
	μg/mL	μM	μg/mL	μM
H	0,18±0,01	0,47±0,03	40,97±4,68	104,54±11,95
4'-Me	0,40±0,02	0,98±0,05	116,69±1,17	287,46±20,15
4'-OMe	0,07±0,01	0,17±0,01	10,10±2,06	23,93±4,88
4'-NO ₂	0,44±0,05	1,00±0,12	23,12±2,58	52,92±5,92
4'-F	0,38±0,03	0,92±0,06	2,20±0,12	5,37±0,28
4'-Cl	0,64±0,09	1,51±0,22	79,46±7,72	186,34±18,11
4'-CN	11,59±3,54	27,80±8,48	33,29±2,62	79,85±6,28
4'-Br	0,41±0,05	0,87±0,10	15,66±1,12	33,26±2,38
4'-OEt	0,65±0,09	1,49±0,20	33,43±2,02	76,68±4,64
4'-OH	3,09±0,01	7,58±0,03	46,18±2,18	113,21±5,33
3'-OMe	0,02±0,01	0,04±0,01	17,67±1,19	41,88±2,83
3'-NO ₂	0,69±0,13	1,58±0,29	84,49±6,24	193,38±14,27
3'-Cl	0,21±0,01	0,48±0,05	75,94±6,56	178,11±15,39
3'-Br	0,25±0,03	0,52±0,05	2,58±0,17	5,48±0,04
Pentamidina	0,28±0,05	0,46±0,08	67,00±4,33	118,00±7,31

^aConcentração do composto requerida para matar 50% dos parasitas nas formas promastigotas ou amastigotas de *L. amazonensis*. ^b dp: desvio padrão, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A grande diferença observada na sensibilidade da forma evolutiva dos parasitas aos compostos mesoiônicos também tem sido observada para outras classes de substâncias (CALLAHAN *et al*, 1997; CANTO-CAVALHEIRO *et al*, 2000). As amastigotas axênicas mostraram menor sensibilidade a todos os mesoiônicos testado,s indicando uma possível diferença no mecanismo de ação entre as duas formas, considerando-se a natureza distinta de suas membranas lipídicas (TURCO e SACKS, 1991).

Os compostos mesoiônicos são muito sensíveis à mudança de pH podendo ser observado muito claramente, pois ocorre mudança na coloração das soluções nas quais estão dissolvidos. Os ensaios com os parasitas na forma de promastigotas foram realizados em pH

7,2 levando os sais dos mesoiônicos às respectivas bases livres, enquanto que no caso das amastigotas os testes ocorreram em pH ácido de 5,5, mantendo os mesoiônicos em sua forma de sais.

Assim, podemos sugerir que a forma do mesoiônico poderá estar interferindo na menor sensibilidade destes aos parasitas na forma de amastigotas, pois nesta cultura, que ocorre em meio ácido, haverá maior interação dos cloridratos mesoiônicos com as proteínas do soro diminuindo a biodisponibilidade das drogas. Este fato também é observado para a pentamidina, que também estará protonada em meio ácido, provocando maior valor de IC₅₀ (da SILVA *et al*, 2002).

4.5 Relação entre a Estrutura Química e Atividade Biológica

Na tentativa de encontrar relações matemáticas que relacionassem a atividade biológica com os parâmetros físico-químicos, foram correlacionados os valores de IC₅₀ obtidos para a atividade citotóxica e antileishmania com os valores de experimentais e teóricos que quantificam o efeito hidrofóbico e os efeitos eletrônicos.

Assim, foram correlacionados os valores de log k_w (determinados neste trabalho), π (constante de hidrofobicidade de Hansch), σ_{p/m} (constante de Hammett), R e F (constantes de Swain-Lupton) e Es (constante estérica de Taft) obtidos da literatura (MARTIN, 1978). Além disso, foram também correlacionados os valores dos parâmetros eletrônicos teóricos calculados através da modelagem molecular, HOMO, LUMO, μ e potencial de ionização.

Os resultados não indicaram nenhuma correlação linear significativa quando relacionado apenas um parâmetro com a atividade citotóxica ou antileishmania. No entanto, utilizando-se o modelo matemático da regressão múltipla, foram observadas correlações entre a atividade citotóxica e os parâmetros hidrofóbicos (log k_w e π) e eletrônico empírico (R). As equações a seguir mostram os modelos mais significativos.

$$1/\log IC_{50} = (1,7937 \pm 0,2948) + (0,8297 \pm 0,1595) R - (0,2026 \pm 0,0591) \log k_w$$
$$R^2 = 0,8452 \quad dp = 0,0921 \quad F = 13,65$$

$$1/\log IC_{50} = (0,8564 \pm 0,048) - (0,1477 \pm 0,0497)\pi + (0,5542 \pm 0,1159) R$$
$$R^2 = 0,7731 \quad dp = 0,0935 \quad F = 13,63$$

As equações obtidas indicaram a importância dos efeitos hidrofóbico e eletrônico de ressonância na atividade citotóxica, sendo que o eletrônico apresentou maior contribuição. De fato, a combinação entre os dois efeitos, eletrônico de ressonância e hidrofóbico, leva ao gradiente de atividade citotóxica observado, tanto considerando, no caso do hidrofóbico, apenas a natureza do substituinte (π), como a molécula como um todo ($\log k_w$).

5 CONCLUSÃO

- Os derivados da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina sintetizados e caracterizados neste trabalho de tese apresentaram um imenso potencial a ser explorado na busca de substâncias com atividade citotóxica e antiparasitária, especialmente antileishmania;
- A rota de síntese possibilitou a obtenção dos sais dos mesoiônicos em bons rendimentos e as técnicas espectroscópicas utilizadas confirmaram as estruturas esperadas;
- Os ensaios *in vitro* frente a células do carcinoma de Ehrlich indicaram o derivado 4'-OEt como o de maior atividade citotóxica, dentre aqueles sintetizados neste trabalho;
- Os ensaios *in vivo* permitiram observar o aumento significativo da sobrevivência dos animais tratados, especialmente com os derivados cloro e flúor-substituídos;
- O mecanismo de ação desses derivados via inibição das enzimas DNA-topoisomerasas mostrou-se possível, especialmente em relação a topoisomerase II;
- Os parâmetros físico-químicos determinados experimentalmente, $\log k_w$, e teoricamente, foram correlacionados com os resultados quantitativos da ação citotóxica e antileishmania indicando correlação satisfatória quando incluídos o fator hidrofóbico e o eletrônico de ressonância, indicando a importância da natureza dos grupos substituintes.
- O modelo matemático bilinear está sendo sugerido para a correlação entre a estrutura e a atividade citotóxica dos sais derivados de mesoiônicos da classe dos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**, 3ª edição, Ed. Artes Médica, p. 261, 1997.

ARAKI, S., MIZUYA, J., AOYAMA, N., BUTSUGAN, Y. Tripolar mesoionic compounds, **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, Iss 16, p. 1989-1991, 1995.

ARAÚJO, C. A. C. Estudo *in vitro* e *in vivo* da Ação de Diarilheptanóides, **Dissertação de Mestrado**, Instituto Oswaldo Cruz, 1999.

AVERY, M. A., MURALEEDHARAN, K. M., DESAI, P. V., BANDYOPADHYAYA, A. K. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 8. Design, synthesis, and CoMFA studies toward the development of Artemisinin-based drugs against leishmaniasis and malaria, **J. Med. Chem.**, v. 46, p. 4244-4258, 2003.

BAKER, W., OLLIS, W. D. **Quart. Ver.**, v. 11, p. 15, 1957.

BARREIRO, E. J., RODRIGUES, C. R., ALBUQUERQUE, M. G., SANT'ANNA, C. M., ALENCASTRO, R. B. **Química Nova**, v. 20, 3, p. 300, 1997.

BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, Ed. Artmed, p. 30, 2001.

BERGER, J. M. Structure of DNA topoisomerases, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1400, p. 3-18, 1998.

BONFANTE, C. R., GARRIDO, R. B., GRIMALDI, G., MOMEN, H., CUPOLILLO, E., Genotypically distinct *Leishmania colombiensis* isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans., **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, p. 119-124, 2003.

BOYER, K. L., FORD, M. B., JUDKINS, A. F., LEVIN, B. **Oncologia na Clínica Geral**, 1ª edição, Ed. Guanabara Koogan S.A., p. 2, 2000.

BRAUMANN, T., GRIMME, L. H. Determination of hydrophobic parameters for pyridazinone herbicides by liquid-liquid partition and reversed-phase high-performance liquid chromatography, **Journal of Chromatography**, v. 206, p. 7-15, 1981.

BRITTO, M. M. Síntese e avaliação da lipofilia e da atividade antitumoral de compostos mesoiônicos do tipo 1,3,4-tiadiazólio-2-aminada, **Tese de Doutorado**, UFMG-ICE, dez., 2000, p. 214.

CADENA, S. M. S. C., CARNIERI, E. G. S., ECHEVARRIA, A., OLIVEIRA, M. B. M. Effect of MI-D, a new mesoionic compound, on energy-linked functions of rat liver mitochondria, **FEBS Letters**, v. 440, p. 46-50, 1998.

CALDAS, A. J. M., COSTA, J. M. L., GAMA, M. E. A., RAMOS, E. A. G., BARRAL, A. Visceral Leishmaniasis in pregnancy: a case report, **Acta Tropica**, v. 88, p. 39-43, 2003.

CALLAHAN, H. L., PORTAL, A. C., DEVEREAUX, R., GROGL, M., **Antimicrob. Ag. Chemother.**, v. 41, p. 1-5, 1997.

CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ECHEVARRIA, A.; ARAÚJO, C. A. C.; BRAVO, M. F.; SANTOS, L. H. S.; JANSEN, A. M.; LEON, L. L. The potential effects of new synthetic drugs against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Microbios**, v. 90, 51-60, 1997.

CANTO-CAVALHEIRO, M. M., ECHEVARRIA, A., SOUZA, M. A. S., CYSNE-FINKELSTEIN, L., TORRES, M. A. D., LEON, L. L. **Arznein.-Forsch./Drug Res.**, v. 50, p. 925-928, 2000.

CAPRANICO, G., BINASCHI, M., BORGNETTO, M. E., ZUNINO, F., PALUMBO, M. A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons, **TIPS**, v. 18, p. 323-329, 1997.

CAPRANICO, G., BINASCHI, M. DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons, **Biochimica et biophysica Acta**, v. 1400, p. 185-194, 1998.

CARVALHO, A. S. Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Compostos Azólicos como Candidatos a Agentes Tripanomicidas, **Tese de Doutorado**, UFRJ-IQ, jul., 2000.185p.

CAWKILL, E., OLLIS, W. D., RAMSDEN, C. A., ROWSON, G. P. Mesoionic 1,3,4-thiadiazolium and 1,3,4-triazolium-2-benzylidenehydrazinides, **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, p. 439-441, 1976.

CHAMPOUX, J. J. DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism, **Ann. Biochem.**, v. 70, p. 369-413, 2001.

CHAN, W. L., YANA, H., SZETO, Y. S. Synthesis of mesoionic side-chain liquid crystal poly(siloxane)s, **Materials Letters**, v. 58, p. 882-884, 2004.

CHEN, A. Y., LIU, L. F. Topoisomerases: Essential Enzymes and lethal targets, **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 34, p. 191-218, 1994.

COELHO, L. W., JUNQUEIRA, G. M. A., HERRERA, J. O. M., MACHADO, S. P. Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica, **Química Nova**, v. 22, 3, p. 396-404, 1999.

DA SILVA, E. F., CANTO-CAVALHEIRO, M. M., BRAZ, V. R., CYSNE-FINKELSTEIN, L., LEON, L. L., ECHEVARRIA, A. Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotas e amastigotas, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 979-984, 2002.

DE CARVALHO, P. B., ARRIBAS, M. A. D. G., FERREIRA, E. I. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy?, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, Apr/Jun, p. 69-96, 2000.

DEWAR, M. J. S., ZOEBISCH, E. G., HEALEY, E. F., STEWART, J. J. P. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 107, p. 3902, 1985.

DIPERSIO, J. R. Old World Leishmaniasis, **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 23:4, p. 29-31, 2001

DONOVAN, S. F., PESCATORE, M. C. Method for measuring the logarithm of the octanol-water partition coefficient by using short octadecyl-poly(vinyl alcohol) high-performance liquid chromatography columns, **Journal of Chromatography A**, v. 952, p. 47-61, 2002.

DUNKLEY, C.S., THOMAN, C.J. Synthesis and biological evaluation of a novel phenyl substituted sydnone series as potential antitumor agents, **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 2899-2901, 2003.

ECHEVARRIA, A., CHEUNG, K.-K., GALEMBECK, S., MACIEL, M. A. M., MILLER, J., RUNJANEK, V. M., SIMAS, A. M. Mesoionic compound.3. Structure of the hydrochloride of 5-(4-methoxyphenyl)-4-phenyl-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylaminide, **Acta Cryst.**, v. 48, p. 1471-1474, 1992.

ECHEVARRIA, A., GALEMBECK, S., MACIEL, M. A. M., MILLER, J., RUNJANEK, V. M., MONTANARI, C. A., SANDALL, J. P. B., SIMAS, A. M. Reaction of aroyl chlorides with 1,4-diphenylthiosemicarbazide: formation of both 1,3,4-thiadiazolium-2-aminides and 1,3,4-triazolium-2-thiolate, **Heterocyclic Comm.**, v. 1, nov. 2-3, p. 129-136, 1995.

ECHEVARRIA, A., MILLER, J. Reactivity in S_NAr Reactions of 2-(4-chloro-3-nitrophenyl)-1,3-diphenyl-1,3,4-triazol-1-ium-5-thiolate with some Anionic and Neutral Nucleophiles, **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2**, p. 1425-1428, 1989.

EDWARD, J. T., SHEFFLER, R. H. **ACS/CSJ Chemical Congress**, Abstract ORGN-168, Homolulu, Hawaii, 1979.

ERNST, S., SCHULZE, K. On the reaction of isothiosemicarbazides with heterocumulenes. Part I, **J. HETEROCYCLIC CHEM.**, v. 33, p. 203-208, 1996.

E SILVA, M. R., JACQUES, C. M. C. Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brazil, **Clinics in Dermatology**, v. 20, p. 122-134, 2002.

ETIÉVANT, C., KRUCZYNSKI, A., BARRET, J., PERRIN, D., HILL, B. T. Apoptotic cell death induction by F 11782 a novel dual catalytic inhibitor of topoisomerases I and II., **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 755-763, 2003.

FERREIRA, E. I., KOROLKOVAS, A., Pró-fármacos e latenciação, **Química Nova**, julho, p. 113-128, 1980.

FUJITA, T., IWASA, J., HANSH, C. A new substituent Constant, derived from partition coefficients, **J. Am. Chem. Soc.**, v. 86, p. 5175-5180, 1964.

GAUDIO, A. C. Modelos clássicos de estudo quantitativo das relações entre estrutura química e atividade biológica, **Química Nova**, v. 19, 3, p. 278-289, 1996.

GAUDIO, A. C. <http://www.cce.ufes.br/anderson>, 2006.

GENESTRA, M. S. Óxido Nítrico Sintase e Proteína Quinase A Como alvos de Derivados Amidínicos anti-*Leishmania*. **Tese de Doutorado**, Instituto Oswaldo cruz, dez, 280p, 2002.

GERAN, R. I., GREENBERG, N. H., MACDONALD, M. M., SCHUMACHER, A. M., ABBOTT, R. J. Protocols for screening chemical agents and natural products against animals tumors and other biological systems, **Cancer Chemotherapy Rep.**, v. 3, p. 1-103, 1972.

GILBERT, I. H. Inhibitors of Dihydrofolate Reductase in *Leishmania* and Trypanosomes. **Biochimica et Biophysica Act.**, v. 1587, p. 246-257, 2002.

GILMAN, A. G., GOODMAN, L. S., RALL, T. W., MURAD, F., **As bases farmacológicas da terapêutica**, 7^a ed., Ed. Guanabara, p. 816, 1987.

GOMES, D. C. F. Síntese e Modificações Estruturais de Derivados Curcuminóides e Avaliação de Suas Atividades anti-*Leishmania*. **Tese de doutorado**, UFRRJ-ICE, 2000.187p.

GOODWIN, L. G. Pentostam (sodium stibogluconate); a 50-years personal reminiscence. **Trans. R Soc. Trop. Med.**, v. 89, p. 339-341, 1995.

GRYNBERG, N., GOMES, R., SCHINZATO, T., ECHEVARRIA, A., MILLER, J. Some new aryl-sydnonones: effects on murine tumours, **Anticancer Research**, v. 12, p. 1025-1028, 1992.

GRYNBERG, N., SANTOS, A. C., ECHEVARRIA, A. Synthesis and in vivo antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class, **Anticancer Drugs**, v. 8, p. 88-91, 1997.

HAMAGUCHI, M., TOMIDA, N., MOCHIZUKI, E., OSHIMA, T. Fast ring opening of unstable mesoionic 1,3-dioxolium-4-olates to acyloxyketenes: formation of [2+2] cycloadducts of acyloxyketene with several ketenophiles., **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 7945-7948, 2003.

HANSCH, C., CLAYTON, J. M., **J. Pharm. Sci.**, v. 62, 1973.

HANSH, C. MUIR, R. M., FUJITA, T., MALONEY, P. P., GEIGER, F., STREICH, M. The correlation of biological activity of plant growth regulators and chloromycetin derivatives with Hammett constants and coefficients, **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, p. 2817-2824, 1963.

HARDMAN, J. G., GILMAN, A. G., LIMBIRD, L. E., **Goodman & Gilman's-The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9th ed., Ed. The McGraw-Hill Companies, 1996. (CD-ROM)

HILAIRE, P. M., ALVES, L. C., HERRERA, F., RENIL, M., SANDERSON, S. J. Solid-phase library synthesis, screening and selection of tight-binding reduced peptide bond inhibitors of a recombinant *Leishmania mexicana* Cysteine Protease B., **J. Med. Chem.**, v. 45, p. 1971-1982, 2002.

HIREMATH, U. S., YELAMAGGAD, C. V., BADAMI, B. V., PURANIK, G. S. Synthetic utility of 3-[4-(hydrazinocarbonyl)]phenyl-sydnone: synthesis and antimicrobial activity of 3-[4-(2,5-dimethylpyrrol-1-ylaminocarbonyl)]-, 3-[4-(5-amino-4-athoxycarbonyl-3-methylsulfanylpyrazol-1-ylcarbonyl)]- and 3-[4-(1,3,4-oxadiazol-2-yl)]-phenylsydnones, **J. Chem. Research(s)**, p. 502-503, 1994.

ISAACS, N. S., **Physical Organic Chemistry**, 3rd edition, John Wiley e Sons, New York, 1985.

JAZWINSKI, J., STASZEWSKA-KRAJEWSKA, O. Synthesis and multinuclear NMR investigation of some mesoionic 3-phenyl-5-imino-1,2,3,4-oxatriazole imines, **Journal of Molecular Structure**, v. 687, p. 23-33, 2004.

KAWA, H., SABROZA, P. C. Espacialização da leishmaniose tegumentar na cidade do Rio de Janeiro, **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18(3), p. 853-865, mai-jun, 2002.

KELLNER, U., RUDOLPH, P., PARWARESCH, R. Human DNA-topoisomerases – diagnostic and therapeutic implications for cancer, **Oncologie**, v. 23, p. 424-430, 2000.

KIER, L. B., ROCHE, E. B. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds, **J. Pharm. Sci.**, v. 56, 2, 149-168, 1967.

KOROKOLVAS, A., BURCKHALTER, J. H., **Química Farmacêutica**, Ed. Guanabara dois, Rio de Janeiro, 1982.

LIRA, B. F., FILHO, P. F. A, MILLER, J., SIMAS, A. M., DIAS, A. F., VIEIRA, M. J. Synthesis and characterization of some new mesoionic 1,3-thiazolium-5-olates via cyclodehydration and in situ 1,3-dipolar cycloaddition/cycloreversion, **Molecules**, v. 7, p. 791-800, 2002.

MARTIN, Y. C., **Quantitative Drug Design – A critical Introduction In Medicinal Research Series**, v. 8, Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 1978.

MARTINS, R. C. A. Determinação da lipofilicidade e correlação quantitativa entre estrutura e atividade (QSAR) de derivados 4-acilidrazono-pirazólicos, **Tese de Mestrado**, UFRJ-IQ, jul., 1995, p.86.

MARZOCHI, K. B. F., MARZOCHI, M. C. A., SILVA, A. F., GRAVITOL, N., DUARTE, R., CONFORT, E. M., MODABBER, F. Phase 1 Study of na Inactivated vaccine Against American Tegumentary Leishmaniasis in Normal Volunteers in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93(2), p. 205-212, Mar/Apr, 1998.

MERCK. **The Merck Index**, 12^{sd} ed., Merck e Co. INC, p. 3896, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Estimativas da incidência e mortalidade por câncer, **Instituto Nacional de Câncer – INCA**, Rio de Janeiro, 92 p., 2003. <http://www.inca.gov.br>

MONTANARI, C. A., SANDALL, J. P. B., MIYATA, Y., KYIAN, N. Z., MILLER, J. Algumas Propriedades Espectroscópicas dos Produtos Cíclicos da Reação de Acilação Anidra de 1,4-Difeniltiossemicarbazida, **Química Nova**, v. 16, 5, p. 404-408, 1993.

MONTANARI, C. A., SANDALL, J. P. B., MIYATA, Y., MILLER, J. Structural studies on some 1,3,4-thiadiazolium-2-aminides and their rearrangement isomers using ^{15}N and ^{13}C NMR spectroscopy, **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2**, p. 2571-2575, 1994.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **J. Immunol. Methods**, v. 65, p.55-63, 1983.

MOURA, G. L. C., SIMAS, A., MILLER, J. Mesoionic Rings as efficient Bridges for the Design of Compounds with Large Optical Nonlinearities, **2nd Conference on Molecular Modeling**, Rio de Janeiro (RJ), p. 26-28, 1994.

MURAD, A. M., KOTZ, A. A., **Oncologia - Bases Clínicas do Tratamento**, Ed. Guanabara Koogan S. A., 1996.

NEWTON, C. G., RAMSDEN, C. A. Mesoionic heterocycles (1976-1980), **Tetrahedron**, v. 38, p. 2965-3011, 1982.

OLIVEIRA, R. B., ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: Uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos, **Quim. Nova**, v. 25, n^o 6A, p. 976-984, 2002.

OLLIS, W. D., RAMSDEN, C. A. Cyclic mesoionic compounds. Part X. Synthesis, spectroscopic properties, and chemistry of 1,3,4-thiadiazolium-2-aminides and their rearrangement to 1,3,4-triazolium-2-thiolates, **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, p. 633-638, 1974.

OLLIS, W. D., RAMSDEN, C. A. Synthesis of mesoionic anhydro-2-arylamino-1,3,4-thiadiazolium hydroxides and the rearrangement of mesoionic 1,3,4-thiadiazoles to mesoionic 1,3,4-triazoles, **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, p. 1222-1223, 1971.

OLLIS, W. D., STANFORTH, S. P., RAMSDEN, C. A. Heterocyclic mesomeric betaines, **Tetrahedron**, v. 41, 12, p. 2239-2329, 1985.

PESSOA, S. B., MARTINS, A. V., **Parasitologia Médica**, Ed. Guanabara Koogan, 10^a ed., Rio de Janeiro, 1977.

POLLIEN, P., ROBERTS, D. Use of solid-phase microextraction for measuring oil-water partition coefficients and correlation with high-performance liquid chromatographic methods for lipophilicity, **Journal of Chromatography A**, v. 864, p. 183-189, 1999.

POMMIER, Y., POURQUIER, P., FAN, Y., STRUMBERG, D. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1400, p. 83-106, 1998.

SANTOS, A. C. S. Síntese, Espectroscopia e Correlações de Energia Livre de Novos Heterociclos Meso-iônicos da Classe dos 1,3,4-Tiadiazólio-2-fenilaminas, **Tese de Mestrado**, Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica-ICE, UFRRJ, 1993.

SANTOS, A. C. S., ECHEVARRIA, A. Electronic effects on ¹³C NMR chemical shifts of substituted 1,3,4-thiadiazolium salts, **Magn. Reson. Chem.**, v. 39, p. 182-186, 2001.

SANTOS, M. B. Síntese e Atividade Tripanomicida de novos Derivados 1-Hpirazolo[3,4-b]piridínicos, **Tese de Mestrado**, UFF, p.7-26, 2000.

SATO, M., UJIIE, S. New twin liquid-crystalline diazole derivatives, **Advanced Materials**, v. 8, p. 567-572, 1996.

SCHINZATO, T., GRYNBERG, N., GOMES, R., ECHEVARRIA, A., MILLER, J. Antitumour activity of new mesoionic compounds against three murine tumours, **J. Med. Sci. Res.**, v. 17, p. 865-866, 1989.

SCHMIDT, E. D., VOTAW, J. R., KESSLER, R. M., PAULIST, T. Aromatic and aminesubstituent effects on the apparent lipophilicities of N-[(2-pyrrolidinyl)methyl]-substituted benzamides, **J. Pharm. Sci.**, v. 83, p. 305-315, 1994)

SENFF-RIBEIRO, A., ECHEVARRIA, A., SILVA, E. F., VEIGA, S. S., OLIVEIRA, M. B. M. Antimelanoma activity of 1,3,4-thiadiazolium mesoionics: a structure-activity relationship study, **Anti-cancer Drugs**, v. 15(3), p. 269-275, 2004.

SENFF-RIBEIRO, A., ECHEVARRIA, A., SILVA, E. F., VEIGA, S. S., OLIVEIRA, M. B. M. Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma, **Melanoma Research**, v. 13(5), p. 465-471, 2003.

STEWART, T. G., KIER, L. B., **J. Pharm. Sci.**, v. 54, p. 731, 1965.

STRYER, L., **Bioquímica**, 4ª edição, Ed. Guanabara Koogan, p. 758, 1996.

SUMMERS, J., KIM, K. H., MAZDIYASNI, H., HOLMS, H. J., RATAJCZYK, J. D. Hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase: Quantitative structure activity relationships, **J. Med. Chem.**, v. 33, p. 992-998, 1982.

TEIJEIRO, S. A., MORONI, G. N., MOTURA, M. I., BÚÑÓN, M. C. Lipophilic character of pyrimidinic nucleoside derivatives: correlation between shake flask, chromatographic (RP-TLC and RP-HPLC) and theoretical methods, **Marcel Dekker, Inc.**, p. 855-872, 2000.

TEMPORAL, R. M. Estudos de Derivados Amidínicos em *Leishmania amazonensis*: Avaliação da Toxicidade e do efeito na interação parasita-hospedeiro, **Tese de Doutorado**, Instituto Oswaldo Cruz, Jun., 2000. 111p

TIEKINK, E. R. T. Antimony and bismuth compounds in oncology, **Critical Review in Oncology/Hematology**, v.42, p. 217-224, 2002.

TOPLISS, J. G. Some observation on classe QSAR, **Persp. Drug. Disc. Design.**, v. 1, 253-268, 1993.

TURCO, S. F.; SACKS, D. L., Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes, **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 45, 91-99, 1991.

UMERUMA, K., YANASE, K., MITSUE, S., OKUTANI, K., YAMARI, T., ANDOH, T. Inhibition of DNA Topoisomerase I and II, and growth inhibition of human cancer cell lines by a marine microalgal polysaccharide., **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 481-487, 2003.

VALKÓ, K., SLÉGEL, P. New chromatographic hydrophobicity index (f_0) based on the slope and the intercept of the log k' versus organic phase concentration plot, **Journal of Chromatography**, v. 631, p. 49-61, 1993.

VALKOV, N. I., SULLIVAN, D. M. Tumor p-53 status and response to Topoisomerase II inhibitors, **Drug Resist. Updates**, v. 6, p. 27-39, 2003.

VEDOVA-BROOK, N., MATSUNAGA, N., SOHLBERG, K. Correlating substituent parameter values to electron transport properties of molecules, **Chemical Physics**, 299, p. 89-95, 2004.

YAMAGAMI, C., TAKAO, N. Hydrophobicity parameters determined by reverse-phase liquid chromatography. VII. Hydrogen-bond effects in prediction of the log P values for benzyl N,N-dimethyl-carbamates, **Chem. Pharm. Bull**, v. 41, n. 4, p. 694-698, 1993.

<http://cmgm.stanford.edu/biochem/biochem201/handouts/DNAtopo.html>, 2006.

www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites, 2006

<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/> - Organização mundial de saúde (OMS), 2007.

www.who.int/emc/diseases/leish/, 2006

www.gerenciadeleishmaniose.hpg.ig.com.br, 2006

www.fiocruz.br, 2006

www.geocites.com/entomologia2000, 2006

www.sigma-aldrich.com.br, 2007

7 ANEXOS

7.1 Anexo de Produção Científica

7.1.1 Artigos publicados

Antimelanoma Activity of 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionics: Structure-Activity Relationships Study. *Anti Cancer Drugs*, 15(3), 269-275, 2004.

Cytotoxic Effect of New 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic Compound (MI-D) on Cell Lines of Human Melanoma. *British Journal of Cancer*, 91(2), 297-304, 2004.

Effect of a new 1,3,4-Thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 Murine Melanoma. *Melanoma Research*, 13(15) 465-471, 2003.

Synthesis and Biological Evaluation of New 1,3,4-Thiadiazolium-2-phenylamine Derivatives against *Leishmania amazonensis* Promastigotes and Amastigotes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37, 979-984, 2002.

7.1.2 Patente

Atividade Antimelanoma de Composto Mesoiónico. INPI, 2004.

7.2 Anexo de Espectros dos Sais dos Compostos Mesoiónicos