

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

*Modelagem Molecular e Avaliação da Relação
Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos
Farmacocinéticos e Toxicológicos in silico de
Derivados Heterocíclicos com Atividade
Antimicrobiana*

Ilidio Ferreira Afonso

Rio de Janeiro

2008

Ilidio Ferreira Afonso

*Modelagem Molecular e Avaliação da Relação
Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos
Farmacocinéticos e Toxicológicos in silico de
Derivados Heterocíclicos com Atividade
Antimicrobiana*

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Faculdade de
Farmácia, Universidade Federal do Rio
de Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral

Rio de Janeiro

2008

Ficha Catalográfica

Afonso, Ilídio Ferreira

Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Farmacocinéticos e Toxicológicos *in silico* de Derivados Heterocíclicos com Atividade Antimicrobiana - 2008.

xxii, 114f.: il..

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 2008

Orientador: Carlos Rangel Rodrigues

1. Antimicrobianos. 2. Resistência bacteriana. 3. Modelagem Molecular. 4. SAR. 5. ADMET. 6. Regra de Lipinski. I. Rodrigues, Carlos Rangel (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Farmácia. III. Título.

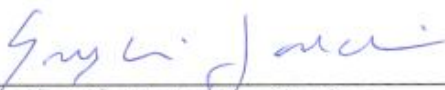
Ilidio Ferreira Afonso

*Modelagem Molecular e Avaliação da Relação
Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos
Farmacocinéticos e Toxicológicos in silico de Derivados
Heterocíclicos com Atividade Antimicrobiana*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.



Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues
Faculdade de Farmácia – UFRJ



Prof.ª. Dr.ª. Suely Lins Galdino
Faculdade de Farmácia – UFPE



Prof.ª. Dr.ª. Magaly Girão Albuquerque
Instituto de Química – UFRJ



Profa. Dra. Gisela Maria Dellamora Ortiz
Faculdade de Farmácia – UFRJ

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

Prof.ª. Dr.ª. Suzana Guimarães Leitão
Faculdade de Farmácia – UFRJ (Suplente)

Agradecimentos

Ao meu orientador, que simplesmente acreditou no intangível invisível e foi responsável por reacender a chama acadêmica, pelo tempo e esforços dedicados sem os quais não teria chegado aonde cheguei.

À minha mãe que sempre foi meu referencial de ética, esforço e dedicação.

À minha cúmplice nas muitas doideiras que fazemos juntos a mais de ¼ de século.

Ao meu co-orientador, cujo curso de tecnologia foi o início de todo esse caminho.

Aos professores da pós-graduação pela informação compartilhada.

Ao professor Marcelo de Pádula, cujas aulas são essencialmente o significado da arte.

À professora Gisela pelo bom astral que sempre possui em atender os alunos.

Aos professores da banca por gentilmente aceitarem o convite.

Ao pessoal da secretaria de pós-graduação pela paciência com as nossas “doideiras”.

À Rachel, Glaucia e Will pelos muitos cafés expressos que tomamos juntos, sem os quais nem sempre poderíamos ter superado alguns momentos mais complicados.

Ao pessoal do laboratório de tecnologia pelo tempo compartilhado.

E a Sri Krishna, Senhor Supremo e fonte de toda riqueza e conhecimento a quem dedico este trabalho.

आपूर्यमाणमचलप्रतिष्ठं
समुद्रमापः प्रविशन्ति यद्वत् ।
तद्वत्कामा यं प्रविशन्ति सर्वे
स शान्तिमाप्नोति न कामकामी ॥ २-७० ॥

āpūryamāṇam acalapratiṣṭhaṃ; samudram āpaḥ praviśanti yadvat
tadvat kāmā yaṃ praviśanti sarve; sa śāntim āpnoti na kāmakāmī

"Aquele que não se perturba com o incessante fluxo de desejos - que entram como os rios no oceano, o qual está sempre sendo enchido mas sempre permanece calmo - pode alcançar a paz, e não o homem que se esforça para satisfazer tais desejos."

Bhagavad-gitā [2:70]

RESUMO

Resistência bacteriana é um assunto complexo que contribui para perdas humanas e econômicas mundialmente. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* são dois importantes patógenos que afetam pacientes imunodeprimidos e usuários de próteses cirúrgicas. A pressão seletiva originada pelo uso indiscriminado de antibióticos originou o aparecimento de cepas multi-resistentes, incluindo estas duas espécies de bactérias, tornando-se um dos mais importantes problemas no ambiente nosocomial. Neste trabalho, uma série de derivados do ácido 4-(fenilamino)-1-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina-5-carboxílico (**1**, **1a-m**) foi avaliada biológica e teoricamente e comparada com uma nova série de derivados do ácido 4-(fenilamino)tieno-[2,3-*b*]piridina-5-carboxílico (**2**, **2a-m**), obtidos por substituição isostérica do núcleo pirazolo-piridina. Nossos resultados mostraram que os derivados da série pirazolo-piridina possuem significativa atividade antimicrobiana contra *S. epidermidis* em contraste com os derivados da série tieno-piridina. A concentração mínima inibitória dos derivados (**1a**, **1c**, **1e** e **1f**) foi semelhante a oxacilina e duas vezes melhor que o cloranfenicol. O estudo de relação estrutura-atividade dos derivados 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina revelou que a maior atividade inibitória é atingida quando a posição *meta* é ocupada por grupos eletronegativos. A análise dos orbitais de fronteira através da modelagem molecular revelou que a intensidade da densidade de LUMO é menor na posição *meta* do que nas posições *orto* e *para* em ambas as séries (**1** e **2**) enquanto que a densidade HOMO está concentrada sobre o núcleo 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina comparado com o sistema tieno[2,3-*b*]piridina. Os derivados mais ativos da série **1** foram submetidos a avaliação de ADMET *in silico*, sugerindo que estes compostos podem atuar como

potenciais candidatos antimicrobianos. Substituição não clássica do grupo ácido carboxílico do sistema tieno-piridina por um anel tetrazol levou a novos derivados (**3**, **3a-m**) e dois novos compostos apresentaram atividade antimicrobiana (**3a** e **3b**). Realizamos também, para estes compostos, um estudo de relação estrutura-atividade através da modelagem molecular, avaliação do perfil ADMET *in silico* e a “regra dos cinco” de Lipinski; que são ferramentas utilizadas para avaliar a relação entre atividade e propriedades “drug-like” destes compostos ativos. Todos os resultados obtidos com os estudos teóricos e atividade biológica reforçam o perfil promissor do derivado **3b** para um posterior estudo e desenvolvimento de um composto antibacteriano o qual poderia atuar por um mecanismo de ação diferente.

ABSTRACTS

Antibacterial resistance is a complex problem that contributes to health and economic losses worldwide. The *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* are two important pathogens in nosocomial environment and affects immunocompromised patients or those with indwelling devices. Currently, the selective pressure caused by the indiscriminate use of antibiotics has caused the emergence of multi-resistant strains, including these two species of bacteria. In this work, we report the biological and theoretical evaluations of a 3-(phenylamino)-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylic acids series (**1**, **1a-m**) and the comparison with a new isosteric ring nucleus series, 4-(phenylamino)thieno[2,3-*b*]pyridine-5-carboxylic acids derivatives (**2**, **2a-m**). Our results revealed that 1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine derivatives (**1a**, **1c**, **1e** and **1f**) with significant antibacterial activity with a minimal inhibitory concentration (MIC) similar to oxacillin and 2-fold better than chloramphenicol. Interestingly, the position of the functional groups has a great impact on the activity as observed in our structure-activity relationship (SAR) study. The SAR of 1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine derivatives shows that the highest inhibitory activity is observed when the *meta* position is occupied by electronegative substituents. The molecular modeling analysis of frontier molecular orbitals revealed that the LUMO density is less intense in *meta* than in *ortho* and *para* positions for both series (**1** and **2**) whereas HOMO density is over concentrated in 1-*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine ring nucleus compared to the thieno[2,3-*b*]pyridine system. The most active derivatives of series **1** were submitted to *in silico* ADMET screening which confirmed these compounds as potential antibacterial candidates. A non-conventional substitution of carboxylic acid group by tetrazole ring in the thieno-

pyridine system led to new derivatives (**3**, **3a-m**) and two compounds showed antimicrobial activity (**3a** and **3b**). In addition we performed a SAR study by using molecular modeling and discussed *in silico* ADMET profile and Lipinski “rule of five”, which are tools to assess the relationship between structures and drug-like properties of active compounds. Our results showed that compound **3b** was active as oxacilin and chloramphenicol. All theoretical studies and biological activity results reinforced the promising profile of **3b** for further experimental investigation and development of new antibacterial drug which may be acting by different action mechanism.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Cronologia do uso clínico de fármacos antimicrobianos.....	24
Figura 2 - Mecanismos de ação de algumas substâncias antimicrobianas	25
Figura 3 - Estrutura geral dos antibióticos β -lactâmicos	26
Figura 4- Estrutura da Vancomicina.	27
Figura 5 – Estruturas (A) fluoroquinolona e (B) oxazolidinona.	29
Figura 6 – Semelhança estrutural entre a sulfanilamida e o PABA.	30
Figura 7 – Diagrama demonstrando a bomba de efluxo bacteriana.	31
Figura 8 – Mecanismo de ação da enzima β -lactamase.....	32
Figura 9 – Mecanismos de inativação dos aminoglicosídeos	33
Figura 10 - Mecanismo de ação e de resistência bacteriana à vancomicina	34
Figura 11 - <i>Staphylococcus aureus</i> corado pelo método de Gram.....	37
Figura 12. Cronologia clínica do surgimento de alguns antibióticos e cepas resistentes do <i>S. aureus</i> nos séculos XX e XXI.	41
Figura 13 Colônias de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Figura 14 – Estruturas químicas da quinupristina (A) e da dalfopristina (B).....	44
Figura 15 - Estrutura da daptomicina (Cubicin®)	45
Figura 16 - Estrutura da daptomicina (Cubicin®) complexada com um íon cálcio...47	
Figura 17 – Estruturas da Série 1 (pirazolo-piridina) e Séries 2 e 3 (tieno-piridina)...50	
Figura 18– Fluxograma da metodologia.	51
Figura 19 – Diagrama de energia para o <i>n</i> -butano	53
Figura 20- Osiris® Property Explore – Gráfico de Treinamento.	67
Figura 21 - Distribuição de druglikeness.....	69
Figura 22. A superfície de Van der Waals.....	72

Figura 23 – Estruturas (A) dos derivados pirazol com diferentes atividades biológicas e (B) dos derivados pirazolo(3,4- <i>d</i>)pirimidina com atividade sobre <i>S. aureus</i>	74
Figura 24. Estrutura de derivados 3 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]pirazolo[3,4- <i>h</i>]-1,6-naftiridina	75
Figura 25 – Esquema de síntese dos derivados da série 1 e série 2.....	76
Figura 26. Esquema dos derivados da série 1 e 2.....	77
Figura 27. Comparação entre as conformações de menor e de maior energia para o derivado 1e (<i>meta</i> -F) da série 1.....	81
Figura 28. Gráfico de energia relativa em função da distância interatômica entre H1 e O1 da série 1.....	83
Figura 29. Comparação entre as conformações de menor e de maior energia para o derivado 2e (<i>meta</i> -F) da série 2.....	86
Figura 30. Sobreposição entre as conformações C08 à C11 do derivado 2e (<i>m</i> -F) ..	87
Figura 31. Sobreposição entre os confômeros C03 à C07 do derivado 2e (<i>m</i> -F)	88
Figura 32. Gráfico de energia relativa em função da distância interatômica H1 <---->O1 da série 2.....	88
Figura 33. Sobreposição (A) derivados <i>meta</i> (1a-f); (B) derivados <i>para</i> (1g-m) da série 1 em modelo CPK ; (C) sobreposição dos derivados (1, 1a-m).....	91
Figura 34. Potencial eletrostático da molécula de benzeno (A) e piridina (B).....	95
Figura 35. Molécula do benzeno visualizada sem aplicação da superfície de densidade eletrônica; com superfície de densidade eletrônica e valor “isosurface (C)” de 0,1 e/ua ³ e 0,001 e/ua ³	97
Figura 36. Superfície de densidade eletrônica total do benzeno (A); superfície de potencial eletrostáticos do benzeno (B) e mapa de potencial eletrostático do benzeno (C).	98
Figura 37. Mapa de potencial eletrostático dos derivados da série 1 (1, 1a-m).....	98

Figura 38. Mapa de potencial eletrostático dos derivados da série 2 (2, 2a-m).....	100
Figura 39. Mapa de densidade de HOMO dos derivados da série 1 (1, 1a-m).....	101
Figura 40. Mapa de densidade de HOMO dos derivados da série 2 (2, 2a-m).....	102
Figura 41. Mapas de densidade LUMO dos derivados da série 1 (1, 1a-m)	103
Figura 42. Mapas de densidade LUMO dos derivados da série 2 (2, 2a-m)	105
Figura 43 - Comparação entre os MIC para os derivados ativos da série 1.....	106
Figura 44. Mapas de densidade LUMO dos derivados 1n, 1e e 1l	108
Figura 45. Mapas de densidade LUMO dos derivados 1n, 1e e 1l da série 1 e 2e, 2l da série 2.....	108
Figura 46. Gráfico do crescimento bacteriano para os derivados fluorados da série 1 (o-F, m-F e p-F).....	109
Figura 47. <i>Druglikeness</i> dos derivados 1a, 1b, 1c 1e e 1f.....	114
Figura 48. <i>Drugscore</i> do derivados ativos 1a, 1b, 1c, 1e e 1f.....	115
Figura 49. Substituição isósterica do grupo ácido carboxílico do sistema tieno-piridina pelo grupo tetrazol.....	116
Figura 50. Comparação entre as concentrações inibitórias mínimas (MIC) dos derivados 3b e 3c.	118
Figura 51. Mapa de potencial eletrostático molecular dos derivados da série 3.....	120
Figura 52. Sobreposição dos derivados da série 3 (3, 3a-m).....	121
Figura 53. Densidade eletrônica LUMO dos derivados da série 3 (3, 3a-m).....	122
Figura 54. Comparação dos valores calculados de “drugscore” e “druglikeness” para os derivados 3b e 3c	123
Figura 55. Comparação da toxicologia <i>in silico</i> para os derivados 3b e 3c	123

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Eventos históricos na descoberta dos antibióticos.....	24
Tabela 2. Alvos, modo de ação e mecanismo de resistência das principais classes de substâncias antimicrobianas.	36
Tabela 3. Comparação entre o perfil antimicrobiano sobre <i>S. epidermidis</i>	79
Tabela 4. Distâncias intramoleculares entre H1O1 e energia relativa de 32 conformações para o derivado 1e (<i>m</i> -Fluor) da série 1 (pirazolo-piridina)	82
Tabela 5. Distâncias D1 e D2 (Å) e área CPK (Å ²) da série pirazolo-piridina (1).	84
Tabela 6. Distâncias intramoleculares entre H1<--->O1 e energia relativa de 22 conformações para o derivado 2e (<i>m</i> -F) tieno-piridina.....	86
Tabela 7. Distâncias D1 e D2 (Å) e área CPK (Å ²) da série tieno-piridina (2).	89
Tabela 8. Comparação parâmetros teóricos dos derivados pirazolo-piridina (1,1a-m) e tieno-piridina (2,2a-m).....	93
Tabela 9. Valores de cLogP, HBA, HBD, PM e PSA dos derivados pirazolo e tieno-piridina.	111
Tabela 10. Toxicidade teórica dos derivados ativos da série pirazolo-piridina (1a, 1b, 1c, 1e e 1f) obtidos com o programa Osiris [®] Property Explorer.	112
Tabela 11. Valores dos derivados da série 3 (3, 3a-m), tetrazóis: ensaio de halo de inibição (Halo) e energia de HOMO (E _{HOMO}), energia de LUMO (E _{LUMO}), momento de dipolo, cLogP, peso molecular, PSA, HBD e HBA.	117
Tabela 12 - . Distâncias D1 e D2 (Å) e área CPK (Å ²) da série tieno-piridina tetrazol (3).	119

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade
AM1	Modelo Austin 1 (Austin Model 1)
AMBER	Modelo de Construção Assistida e Refinamento Energético (Assisted Model Building and Energy Refinement)
AMP	Monofosfato de adenosina (Adenosine monophosphate)
cLogP	Coeficiente de Partição calculado (teórico)
CNDO	Negligência Completa da Diferencial de Sobreposição (Complete Neglect of Differential Overlap)
CPK	Corey-Pauling-Koton
DFT	Teoria do Funcional de Densidade (Density Functional Theory)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
eV	elétron Volt
FDA	Food and Drug Administration
Gb	Gigabyte (1Gb é equivalente a 1024 bytes)
GHz	Gigahertz
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (Human Immunodeficiency Virus)
HOMO	Orbital Molecular de Mais Alta Energia Ocupado (Highest Occupied Molecular Orbital)
INDO	Negligência Intermediária da Diferencial de Sobreposição (Intermediate Neglect of Differential Overlap)
LCD	Tela de Cristal Líquido (Liquid Crystal Display)
LogP	Coeficiente de Partição

LUMO	Orbital Molecular de Mais Baixa Energia Desocupado (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
MEP	Mapa de Potencial Eletrostático Molecular (Molecular Electrostatic Potential Map)
MIC	Concentração inibitória mínima (Minimal Inhibitory Concentration)
MINDO/3	Negligência Intermediária Modificada da Diferencial de Sobreposição, versão 3 (Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap, version 3)
MMFF1	Campo de Força Mecânica Molecular 1 (Molecular Mechanics Force Field 1)
MMFF2	Campo de Força Mecânica Molecular 2 (Molecular Mechanics Force Field 2)
MNDO	Negligência Modificada da Diferencial de Sobreposição (Neglect of Differential Overlap)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
NDDO	Negligência da Sobreposição Diferencial Diatômica (Neglect of Diatomic Differential Overlap)
PABA	Ácido <i>para</i> -aminobenzóico (<i>p</i> -aminobenzoic acid)
PBMC	Célula Sanguínea Periférica Mononuclear (Peripheral Blood Mononuclear Cell)
PBP	Proteínas Ligantes de Penicilina (Penicillin Binding Proteins)
PM	Peso Molecular
PM3	Método Paramétrico 3 (Parametric Method 3)
PM5	Método Paramétrico 5 (Parametric Method 5)
PSA	Área de Superfície Polar (Polar Surface Area)
RAM	Memória de Acesso Randômico (Random Access Memory)
RM1	Modelo Recife 1 (Recife Model 1)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
RTECS	Registro de Efeitos Tóxicos de Substâncias Químicas (Registry of Toxic Effects)

of Chemical Substances)

- SAR** Relação estrutura-atividade (Structure Activity Relationship)
- SEP** Superfície de Energia Potencial
- STO-3G** Orbitais Tipo Slater simulado por 3 Gaussianas (Slater-Type-Orbitals simulated by 3 Gaussians) - Base de dados
- ua** Unidade Atômica
- VISA** *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária a vancomicina (Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*)
- VRAM** Memória de Acesso Randômica de Vídeo (Video Random Access Memory)
- VRSA** *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*)

MARCAS E PROPRIEDADES

Foram realizados esforços para mencionar todas as marcas comerciais que porventura apareçam neste trabalho, entretanto, a não menção devida caracteriza apenas uma falha não intencional. As seguintes marcas comerciais são propriedade de seus respectivos detentores:

Cubicin[®]	Cubist Pharmaceuticals, Inc
Fluka[®]	Fluka Chemie AG.
Osiris[®]	Actelion Pharmaceuticals, Ltd.
Pentium[®]	Intel Corporation
SnagIt[®]	TechSmith Corporation
Spartan[®]	Wavefunction, Inc.
Synercid[®]	Kings Pharmaceuticals, Inc.
Windows[®]	Microsoft Corporation
Zyvox[®]	Pfizer, Inc.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS	25
1.1.1 INIBIÇÃO DA SÍNTESE DA PAREDE CELULAR	26
1.1.2 LIGAÇÃO À MEMBRANA CITOPLASMÁTICA	28
1.1.3. INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	28
1.1.4. INIBIÇÃO DA TRADUÇÃO E SÍNTESE DE PROTEÍNAS	28
1.1.5. ANTAGONISMO METABÓLICO	29
1.2. RESISTÊNCIA MICROBIANA	30
1.2.1. BOMBEAMENTO PARA O MEIO EXTRACELULAR	31
1.2.2. INATIVAÇÃO DO AGENTE ANTIMICROBIANO	32
1.2.3. MODIFICAÇÃO DE ENZIMA OU ESTRUTURA ALVO	33
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>, UMA ESPÉCIE DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA	37
1.3.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO	37
1.3.2 RESERVATÓRIO E DISSEMINAÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i>	39
1.4. ANTIBIOTICOTERAPIA – PANORAMA ATUAL	40
2. JUSTIFICATIVA	48
3. OBJETIVOS	48
3.1 GERAL	48
3.2 ESPECÍFICO	49
4. METODOLOGIA	51
4.1 METODOLOGIA – FUNDAMENTOS TEÓRICOS	52

4.1.1 ANÁLISE CONFORMACIONAL	52
4.1.2 MÉTODOS DE MODELAGEM MOLECULAR	54
4.1.2.1 MECÂNICA MOLECULAR	54
4.1.2.2 MECÂNICA QUÂNTICA - ab initio	60
4.1.2.3 MÉTODOS SEMI-EMPÍRICOS	62
4.2 METODOLOGIA COMPUTACIONAL	65
4.3 METODOLOGIA - ESTUDO TEÓRICO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E DE TOXICIDADE IN SILICO – ADMET (ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLIZAÇÃO, ELIMINAÇÃO E TOXICIDADE)	66
4.3.1 REGRA DOS CINCO	70
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1 ANÁLISE DOS DADOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS DERIVADOS PIRAZOLO-PIRIDINA (1) E TIENO-PIRIDINA (2)	73
5.2. ANÁLISE CONFORMACIONAL DOS DERIVADOS PIRAZOLO-PIRIDINA (1) E TIENO-PIRIDINA (2)	80
5.3 PROPRIEDADES ELETRÔNICAS	92
5.3.1 CÁLCULOS DE ENERGIA DE HOMO (E_{HOMO}), ENERGIA DE LUMO (E_{LUMO}) E MOMENTO DE DIPOLO DOS DERIVADOS PIRAZOLO-PIRIDINA E TIENO-PIRIDINA	92
5.3.2 MAPAS DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO	94
5.3.3. MAPAS DE DENSIDADE HOMO	101
5.3.4 MAPAS DE DENSIDADE LUMO	102
5.4 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E TOXICOLÓGICAS “in silico”	110
5.4.1 “REGRA DOS CINCO” (LIPINSKI)	110
5.5. MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DO ANEL TIENO-PIRIDINA	116

6. CONCLUSÕES _____ **125**

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____ **127**

1. INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são agentes capazes de eliminar (ação bactericida) ou inibir o crescimento (ação bacteriostática) de microorganismos, podendo ser de origem natural (antibióticos) ou sintética (quimioterápicos) (FRENCH, 2006).

Os antimicrobianos são, geralmente, usados em altas concentrações e possuem mecanismos que, muitas vezes, evitam efeitos danosos ao paciente, devido as suas características. Dentre elas podemos citar:

- *Toxicidade Seletiva*: característica desejada para todo antimicrobiano, pois reflete sua capacidade de atuação, agindo seletivamente sobre o microrganismo sem provocar danos ao hospedeiro (KYAW, 2005).
- *Espectro de ação*: refere-se à diversidade de organismos afetados pelo antibiótico, os quais podem ser de pequeno ou de amplo espectro (CAVALLO, 2008).

Desde os primórdios da humanidade, os microorganismos estiveram associados a patologias inicialmente incuráveis, que sempre deixaram o ser humano impotente diante da ação de seres invisíveis a olho nu e por muito tempo, desconhecidos. A Tabela 1 mostra os primeiros relatos na literatura sobre o descobrimento dos antibióticos, que determinou o grande avanço no controle da ação patogênica dos microorganismos, através da utilização de agentes antimicrobianos (FERNANDES, 2006).

A introdução das sulfonamidas (sulfas), em 1936 e da penicilina (antibiótico), em 1941 (Figura 1), no arsenal terapêutico antimicrobiano provocou um dramático declínio da incidência das várias infecções bacterianas, como endocardites, meningites, pneumonias, gonorréia e outras (KYAW, 2005; WRIGTH, 2007).

Tabela 1: Eventos históricos na descoberta dos antibióticos (FERNANDES, 2006).

ANO	EVENTO
1896	Ernest Duchesne descobriu a penicilina, mas não a notificou apropriadamente.
1927	Gerhard Domagk realizou testes utilizando corantes e outros produtos químicos, para observar a ação antimicrobiana e a toxicidade em animais
1928	Alexander Fleming, pesquisador que estudava bactérias, encontrou uma colônia de fungos em uma de suas placas e percebe que ao redor destes fungos não havia crescimento bacteriano. Fleming chamou esta substância de penicilina, pois o fungo que o produzia era do gênero <i>Penicilium</i> .
1935	O Vermelho Prontosil, inócuo para animais, é descoberto como capaz de proteger camundongos contra estafilococos e estreptococos patogênicos. Ainda neste ano, foi descoberto que o Prontosil era clivado no organismo, originando a sulfonamida, responsável pelos efeitos antimicrobianos observados.
1939	Howard Florey & Ernst Chain obtêm a cultura de fungo isolada, inicialmente, por Fleming, passando a trabalhar na purificação da penicilina. Florey e Chain injetaram a penicilina em camundongos infectados com estafilococos ou estreptococos e observaram que quase todos sobreviveram (Trabalho publicado em 1940).

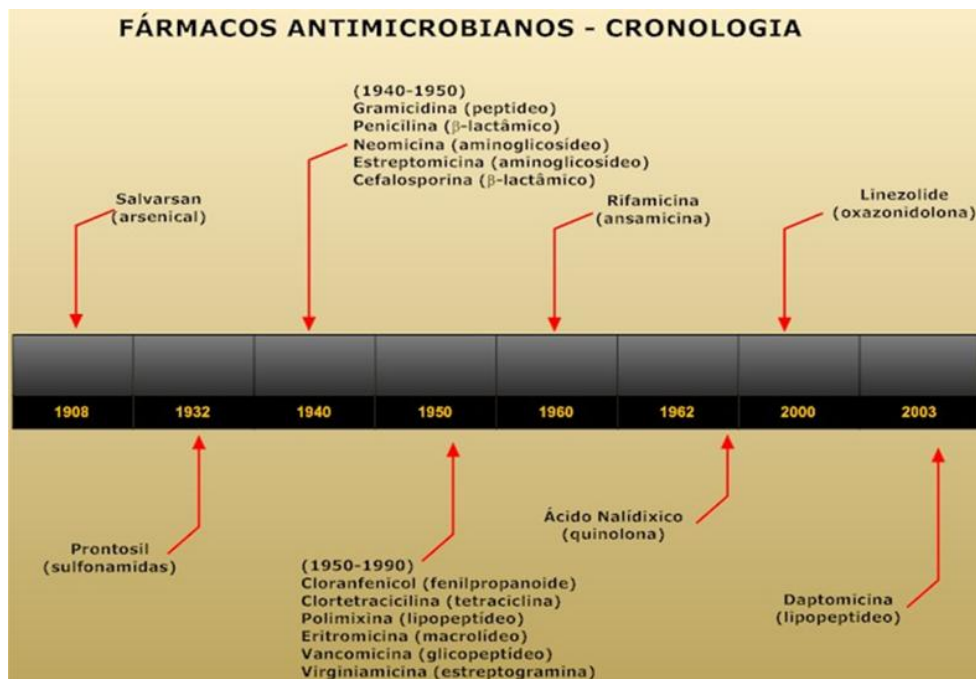


Figura 1 - Cronologia do uso clínico de fármacos antimicrobianos. Adaptado de (WRIGHT, 2007).

1.1. MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS

As principais classes de substâncias antimicrobianas possuem como alvo de ação: a inibição da síntese proteica bacteriana, a replicação do ácido nucléico e seu reparo e a biossíntese de enzimas essenciais à formação da parede celular (Figura 2). (HANCOCK, 2005)

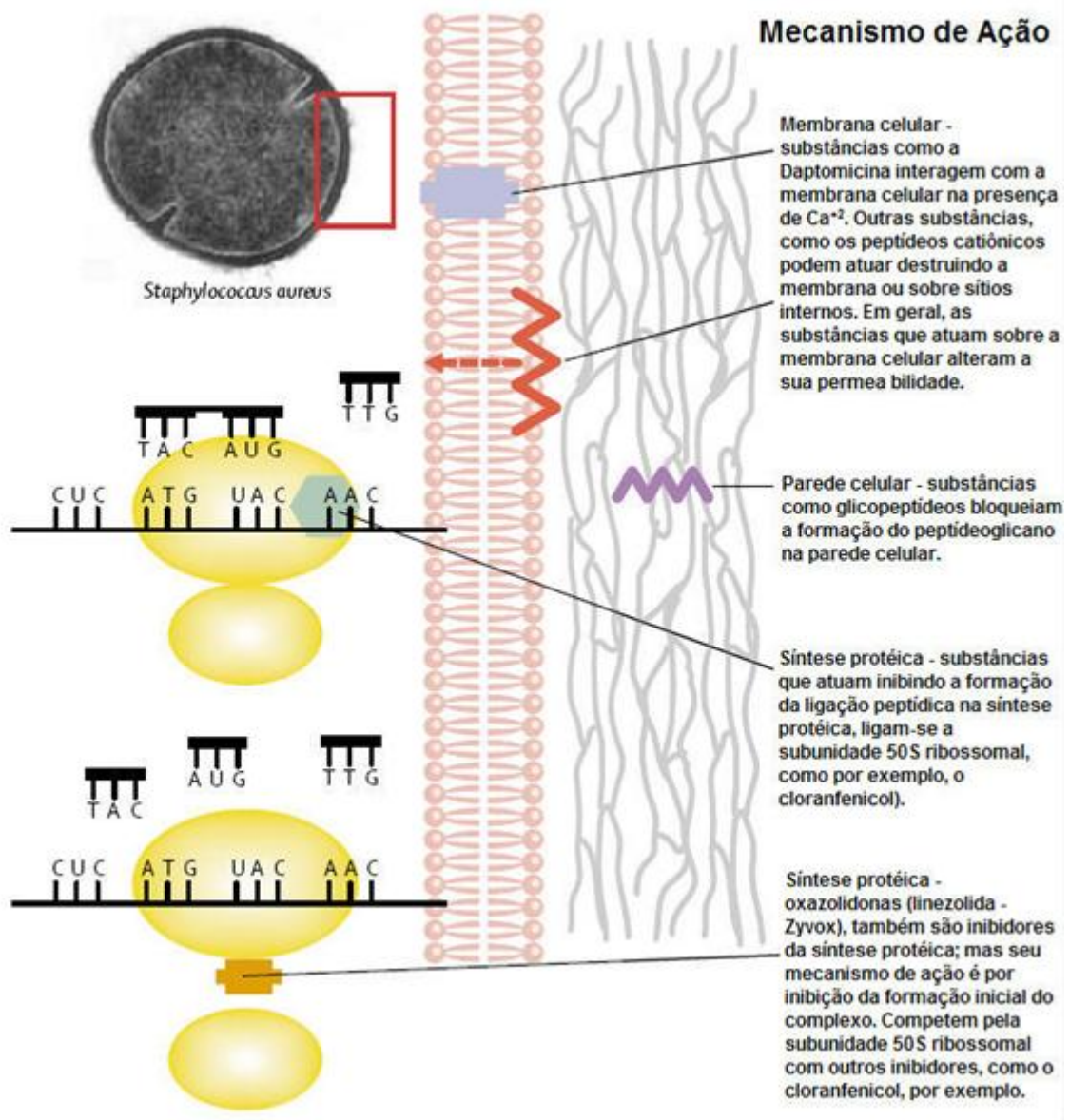


Figura 2 - Mecanismos de ação de algumas substâncias antimicrobianas. Adaptado de (HANCOCK, 2005)

1.1.1 INIBIÇÃO DA SÍNTESE DA PAREDE CELULAR

A estrutura rígida da parede celular permite que as bactérias mantenham uma pressão osmótica muito elevada, devido à ligação cruzada dos seus precursores, que ocorre durante a síntese da parede celular bacteriana, catalisada por enzimas específicas. Este processo é controlado por proteínas reguladoras – transpeptidases - também chamadas de proteínas ligantes de penicilina (PBPs – *Penicillin Binding Proteins*), tendo em vista que interagem com os antibióticos β -lactâmicos (Figura 3) (LEMAIRE *et al.*, 2008)

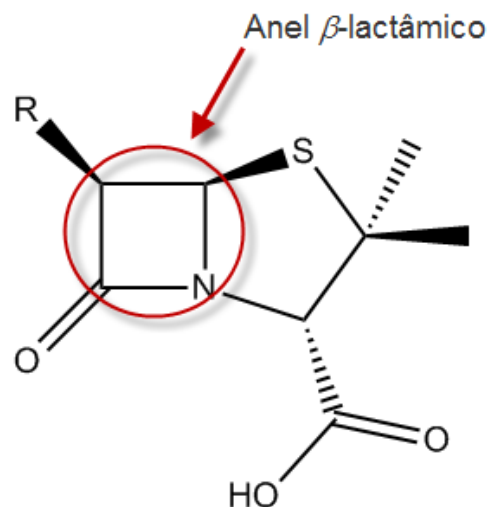


Figura 3 - Estrutura geral dos antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos incluem quatro tipos principais: penicilinas, cefalosporinas, carbapenems e monobactâmicos. Entretanto, quando as bactérias são expostas à penicilina ou outros antibióticos desta classe, estes se ligam às PBPs na parede celular. Os antibióticos β -lactâmicos inibem a última etapa na síntese de

peptidoglicano, a reação de transpeptidação, responsável pela formação das ligações cruzadas entre as cadeias laterais de polissacarídeos presentes no peptidoglicano da parede celular. Embora a parede celular continue a ser formada, esta se torna progressivamente mais fraca, à medida que o esqueleto de peptidoglicano é incorporado. Além disso, o complexo antibiótico–PBP estimula a liberação de autolisinas, que atuam na parede celular existente. Com uma parede celular fragilizada e degradada, as diferenças de pressões osmóticas entre os meios extracelular e intracelular provocam a lise da célula, resultando na morte da bactéria. Em contrapartida, a vancomicina (Figura 4) – um glicopeptídeo – não se liga às PBPs, atuando diretamente no peptídeo d-alanil-d-alanina terminal presente nos precursores do peptidoglicano, bloqueando assim a reação de transpeptidase. (SALYERS, 1994; MADIGAN *et al.*, 2004).

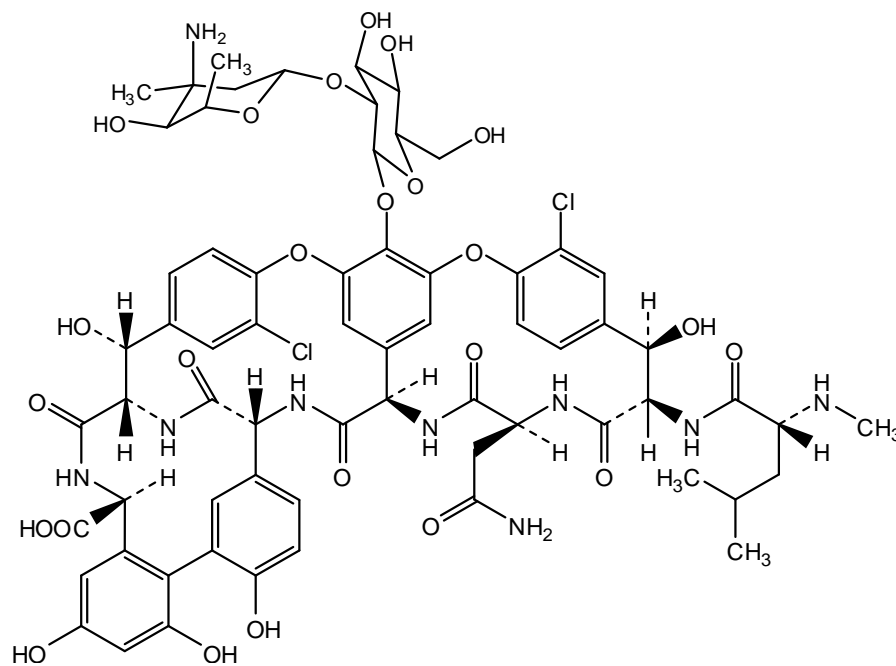


Figura 4- Estrutura da Vancomicina, um antibiótico glicopeptídeo semi-sintético.

1.1.2 LIGAÇÃO À MEMBRANA CITOPLASMÁTICA

Os antimicrobianos que apresentam este mecanismo exibem baixo grau de toxicidade seletiva. Dentre eles podemos citar as polimixinas, que se ligam a membrana, entre os fosfolípidos, alterando sua permeabilidade. Estes antimicrobianos são altamente efetivos contra bactérias Gram-negativas, pois afetam tanto a membrana citoplasmática como a membrana externa (MDLULI, 2006).

1.1.3. INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

Os antimicrobianos que utilizam o mecanismo de inibição da síntese de ácidos nucleicos são razoavelmente seletivos e podemos citar como exemplos a novobiocina que se liga a DNA girase, alterando o desenovelamento do DNA, impedindo sua replicação; as quinolonas (Figura 5A), que inibem a DNA girase afetando a replicação, transcrição e seu reparo; e a rifampicina que se liga a RNA polimerase-DNA-dependente, bloqueando a transcrição (KYAW, 2005; HANCOCK, 2005).

1.1.4. INIBIÇÃO DA TRADUÇÃO E SÍNTESE DE PROTEÍNAS

O mecanismo de síntese proteica dos ribossomas de células procariontes é bastante distinto de seus análogos eucariontes, de modo que, existem diferentes inibidores da síntese proteica que apresentam ação antibacteriana seletiva. Entre eles podemos citar os antibióticos como a eritromicina (macrolídeo), as tetraciclina e a estreptomicina (aminoglicosídeo) (WALSH, 2000; HANCOCK, 2005).

Dado o grande número de passos envolvidos na iniciação, alongação e terminação da síntese proteica, ocorrem muitas etapas de ligação e catálise que podem sofrer interferência por estas substâncias e por outras classes de inibidores. Esta multiplicidade de eventos também indica que a síntese proteica fornece um grande número de alvos para novos antimicrobianos e também se constitui em alvo de ação para as oxazolidinonas (Linezolida – Zyvox – Figura 5B) (THOMAS, 2008).

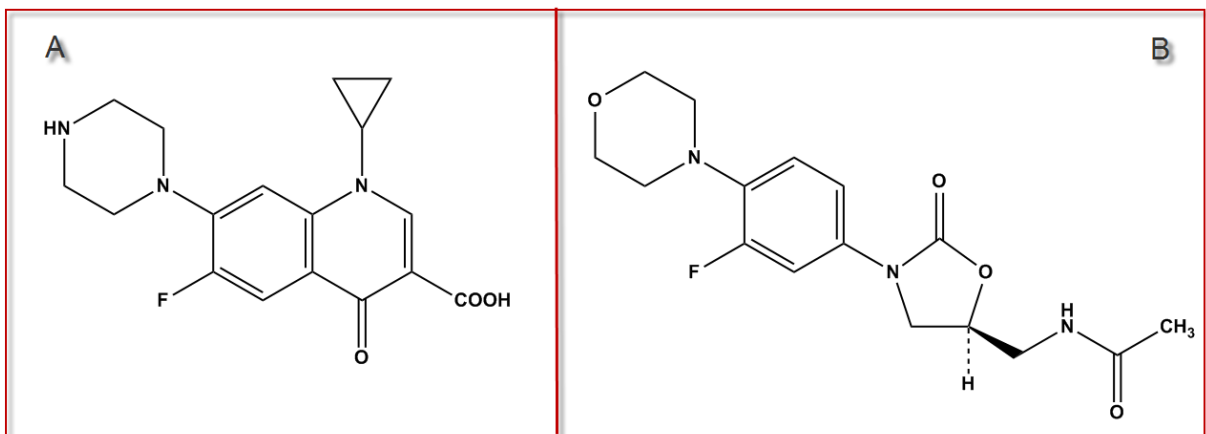


Figura 5 – Estruturas (A) fluoroquinolona – ciprofloxacina (Cipro®) e (B) oxazolidinona - linezolida (Zyvox®).

1.1.5. ANTAGONISMO METABÓLICO

Algumas substâncias antimicrobianas atuam como antimetabólitos por um mecanismo de inibição competitiva. A sulfonamida compete com o ácido p-aminobenzóico (PABA), substrato natural na síntese do ácido fólico, impedindo a produção deste último; necessário para certos microorganismos. Como os mamíferos não sintetizam ácido fólico, as sulfonamidas não interferem no metabolismo dos mamíferos (Figura 6) (KIAW; 2005).

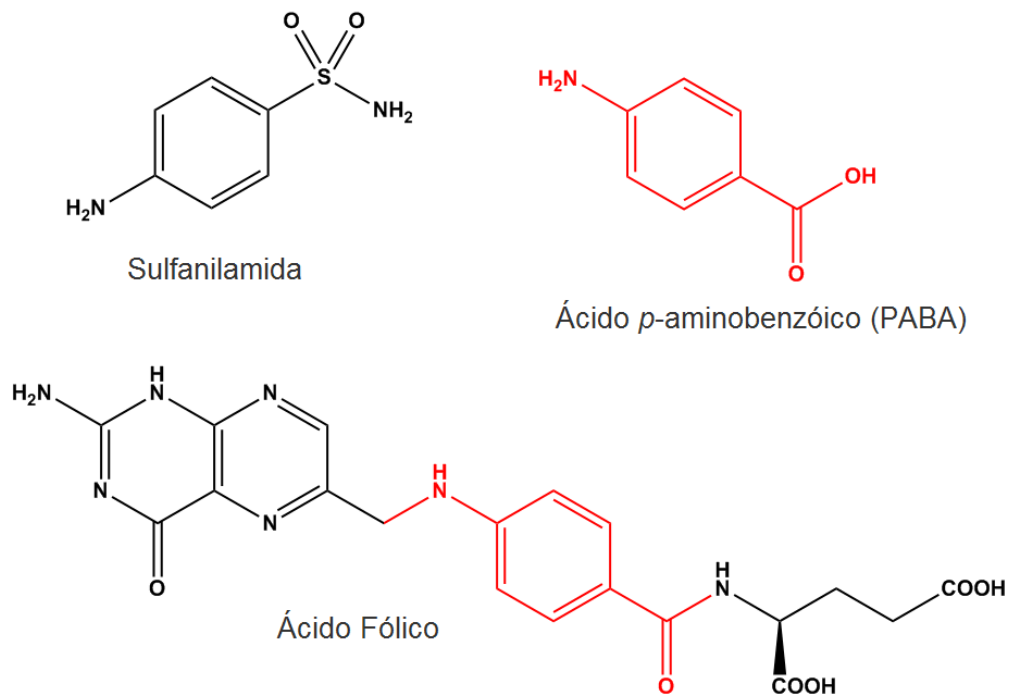


Figura 6 – Semelhança estrutural entre a sulfanilamida e o ácido *p*-aminobenzóico (assinalado em vermelho nas estruturas).

1.2. RESISTÊNCIA MICROBIANA

A resistência aos antimicrobianos se caracteriza pela “insensibilidade” da bactéria a um ou mais antibióticos e é classificada em dois tipos:

a) Natural - também chamada de intrínseca e é típica da espécie, sendo transmitida verticalmente às células-filhas, possuindo um caráter hereditário.

b) Adquirida - que surge na bactéria através de mutações espontâneas, seleção, ou por transferência de genes (TAVARES, 2000; HANCOCK, 2005; WRIGHT, 2007).

Dentre os principais mecanismos de resistência podemos citar:

1.2.1. BOMBEAMENTO PARA O MEIO EXTRACELULAR

Para um antimicrobiano ser efetivo, ele deve alcançar seu sítio de ação e atingir uma concentração adequada capaz exercer sua atividade. Por exemplo, a síntese de proteínas está localizada no citoplasma e assim, o antimicrobiano que atua como um inibidor da síntese proteica deverá ser capaz de atravessar a parede e a membrana celular e alcançar o interior citoplasmático bloqueando um passo específico da síntese proteica. (WALSH, 2000; HANCOCK, 2005; KUMAR, 2005)

Tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas que se tornam resistentes a tetraciclina, por exemplo, comumente possuem uma alta produção de proteínas de membrana (com massas moleculares relativas de 42.000 Daltons) que atuam como um exportador ou “bomba de efluxo”. O fármaco é bombeado para o meio extracelular mais rapidamente do que consegue atravessar a membrana celular para o interior da bactéria (Figura 7) (WALSH, 2000; HANCOCK, 2005; KUMAR, 2005)

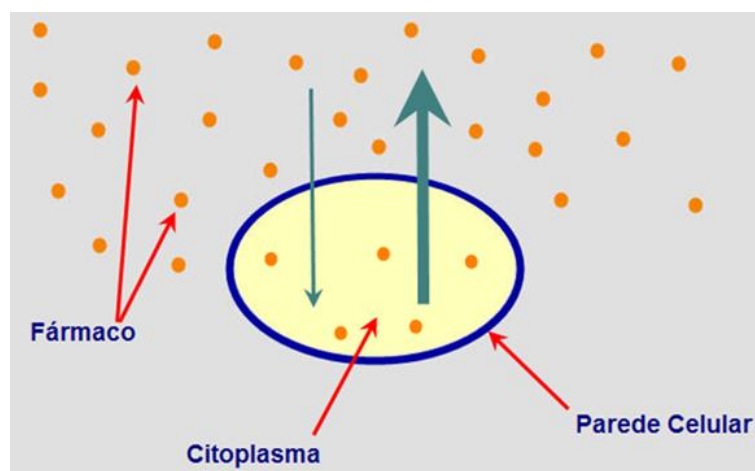


Figura 7 – Diagrama demonstrando a bomba de efluxo bacteriana.

1.2.2. INATIVAÇÃO DO AGENTE ANTIMICROBIANO

O mecanismo de bomba de efluxo, apesar de efetivo para a bactéria, deixa o fármaco inalterado, conservando todas as suas características químicas. Um mecanismo de desenvolvimento de resistência bacteriana mais efetiva é a inativação do fármaco devido a sua modificação estrutural. O caso clássico é a ruptura do anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas pela enzima β -lactamase através de mecanismo hidrolítico. Esta enzima é secretada no periplasma de modo a destruir os antibióticos β -lactâmicos antes que eles possam alcançar as PBP's na membrana citoplásmica (Figura 8). (WALSH, 2000; HANCOCK, 2005; WRIGHT, 2005)

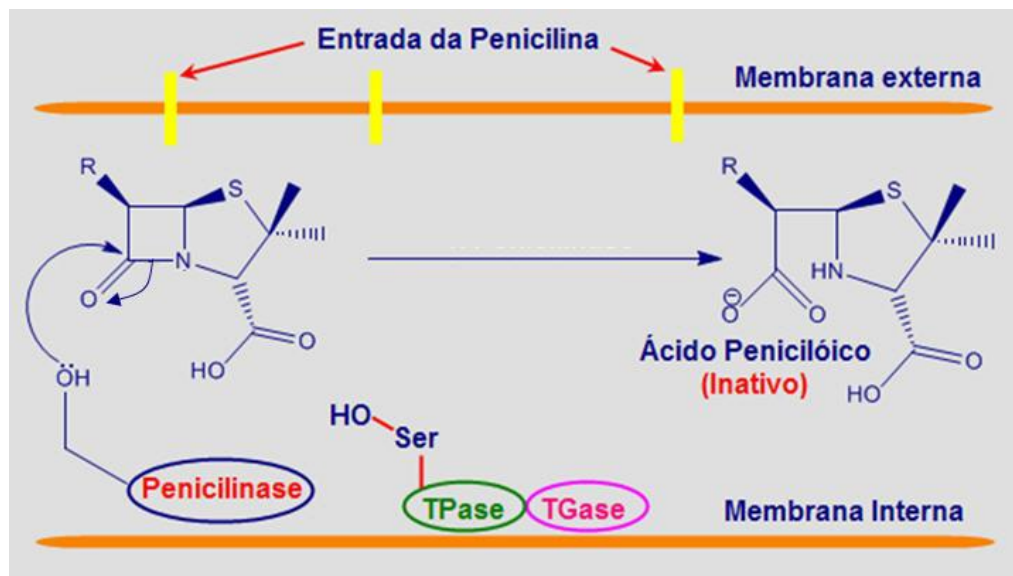


Figura 8 – Mecanismo de ação da enzima β -lactamase. Adaptado de (WALSH, 2000)

Outras classes de substâncias que não apresentam grupamentos hidroliticamente lábeis, como exemplo, os aminoglicosídeos, também podem ser inativados. Estes inibidores da síntese proteica são alvos de enzimas que alteram a

sua estrutura molecular impedindo que se liguem ao RNA nos ribossomas e abolindo sua atividade. (WALSH, 2000; HANCOCK, 2005; WRIGHT, 2005)

Estas enzimas podem ser adenil-transferases, que adicionam grupamentos AMP; fosforil-transferases, que adicionam grupamentos PO_3 ou acetil-transferases, que acetilam os grupos amino do antibiótico (Figura 9) (WALSH, 2000; HANCOCK, 2005).

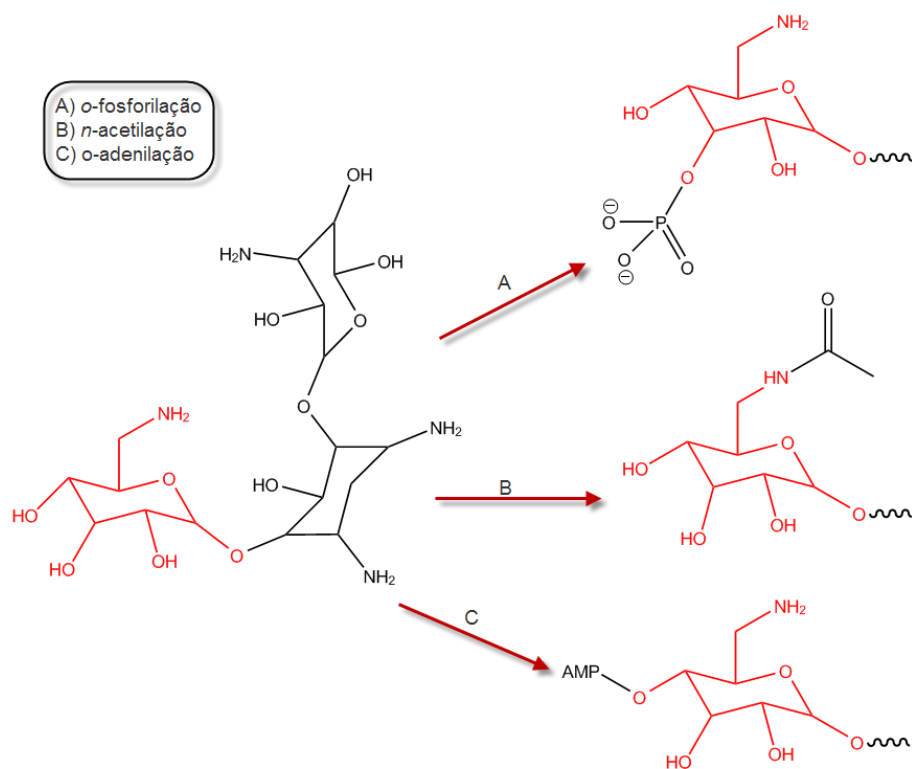


Figura 9 – Mecanismos de inativação dos aminoglicosídeos por enzimas bacterianas. Adaptado de (WALSH, 2000).

1.2.3. MODIFICAÇÃO DE ENZIMA OU ESTRUTURA ALVO

Outra estratégia é a reprogramação ou camuflagem do alvo na bactéria resistente. Nas bactérias com resistência à eritromicina, pelo mecanismo de bomba de efluxo, um resíduo mono ou dimetilado de adenina (A2058) aparece no ciclo da

peptidil-transferase do componente 23S RNA do ribossoma. Esta modificação é efetuada pela enzima metil-transferase Erm que não danifica a biossíntese, mas reduz a afinidade de todos os membros da classe de substâncias relacionadas a eritromicina pelo RNA. O mecanismo por Erm é a principal rota de resistência bacteriana das cepas clínicas isoladas de *Staphylococcus aureus* e está presente em organismos produtores de eritromicina (*Streptomyces erytreus*, por exemplo) como mecanismo auto-imune (WALSH, 2000; HANCOCK, 2005).

Um mecanismo elegante de alteração da enzima alvo é demonstrado pela resistência à vancomicina. A vancomicina liga-se a unidades dipeptídicas *N-acil-D-Ala-D-Ala* nas terminações do peptidoglicano através de 5 ligações de hidrogênio. Bactérias resistentes à vancomicina sintetizam o peptidoglicano com a terminação constituída por *N-acil-D-Ala-D-Lactato* que elimina uma ligação hidrogênio, resultando numa redução de 10^{-3} na afinidade da vancomicina pela parede celular (Figura 10). (WRIGHT, 2007)

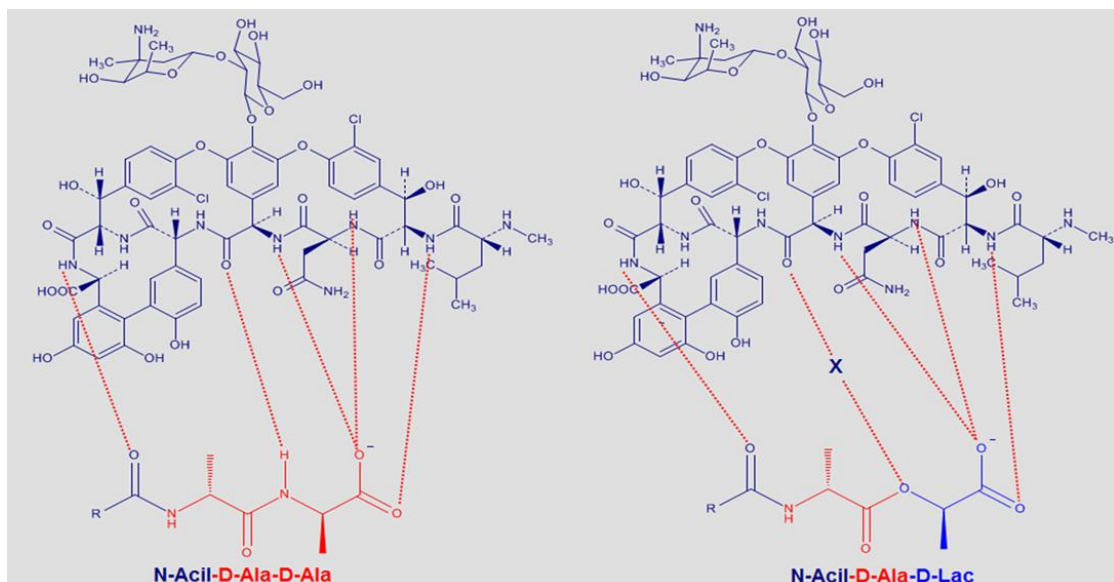


Figura 10 - Mecanismo de ação (esquerda) e de resistência bacteriana (direita) à vancomicina. Adaptado de (WRIGHT, 2007).

Os principais modos de ação dos antimicrobianos e mecanismos de resistência bacteriana estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Alvos, modo de ação e mecanismo de resistência das principais classes de substâncias antimicrobianas. Adaptado de (WALSH, 2000).

ANTIBIÓTICO	ALVO	MODO DE AÇÃO	RESISTÊNCIA
PAREDE CELULAR			
β -lactâmicos	Transpeptidases/transglicosilases (PBP's)	Bloqueio das enzimas responsáveis pela ligação cruzada na camada de peptidoglicano da parede celular.	β -lactamases e PBP's mutantes
Vancomicina	Terminação D-Ala-D-Ala do peptidoglicano	Sequestro do substrato necessário a ligação cruzada	Reprogramação da D-Ala-D-Ala para D-Ala-D-Lac ou D-Ala-D-Ser
SÍNTESE PROTEICA			
Macrolídeos da classe das eritromicinas	Peptidiltransferase, centro do ribossoma	Bloqueio da síntese proteica	Metilação rRNA; bomba de efluxo
Tetraciclina	Peptidiltransferase	Bloqueio da síntese proteica	Bomba de efluxo
Aminoglicosídeos	Peptidiltransferase	Bloqueio da síntese proteica	Modificação enzimática do fármaco
Oxazolidinonas	Peptidiltransferase	Bloqueio da síntese proteica	Desconhecido
REPLICAÇÃO/REPARO DO DNA			
Fluorquinolonas	DNA girase	Bloqueio da replicação do DNA	Mutação da girase para resistência ao fármaco

1.3. *Staphylococcus aureus*, UMA ESPÉCIE DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

1.3.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

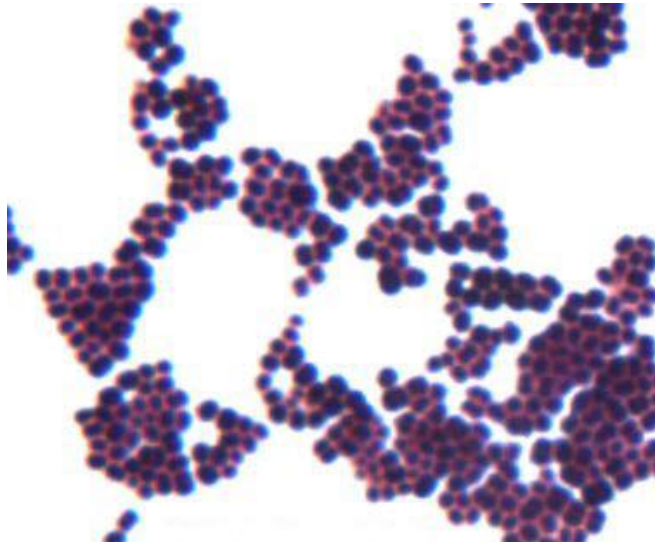


Figura 11 - *Staphylococcus aureus* corado pelo método de Gram. (Fonte: www.life.umd.edu/CBMG/faculty/asmith/Staphylococcus.jpg, em 21/06/2008)

Os *Staphylococcus* são cocos Gram e catalase positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não esporulados e, geralmente, não encapsulados. Apresentam-se em diversas formas: isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente, com aspecto semelhante a um cacho de uvas (Figura 11) (TRABULSI, 2005; SANTOS *et al*, 2007).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcae* juntamente como os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*

Atualmente, o gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Geralmente fazem parte

da microbiota da pele humana normal e de outros sítios anatômicos. A espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial é o *Staphylococcus aureus*, que está, freqüentemente, relacionado a diversas infecções em seres humanos (ÁLVAREZ-LERMA, 2006; SANTOS *et al*, 2007)

Outra espécie, *Staphylococcus epidermidis*, também possui grande interesse no ambiente nosocomial, uma vez que fazendo parte da biota humana normal, tornou-se um patógeno importante em pacientes imunodeprimidos ou usuários de próteses. O *S. epidermidis* apresenta-se como cocos Gram positivo, catalase positivo e coagulase negativo, formando colônias lembrando cachos de uva, apresentando a capacidade de formar biofilmes em próteses cirúrgicas o que contribui para sua virulência (GILL, 2005; EKKELENKAMP *et al*, 2005)

As cepas de *S. aureus* crescem em meio de caldo ou ágar simples, pH 7, à temperatura de 37 °C . As colônias formadas em placa, após 18-24 horas de incubação, apresentam-se arredondas, lisas e brilhantes. A coloração destas colônias varia desde o acinzentado até o amarelo-ouro, em que a pigmentação amarelada aumenta com o prolongamento do tempo de incubação, exceto nos casos de crescimento em condições anaeróbicas ou na cultura em caldo. Em placas de ágar-sangue, um halo de hemólise desenvolve-se em torno das colônias formadas (TRABULSI 2005; SANTOS *et al*, 2007).

1.3.2 RESERVATÓRIO E DISSEMINAÇÃO DE *Staphylococcus aureus*

A distribuição de *S. aureus* é muito ampla, visto que essa bactéria é altamente resistente à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira. Este microrganismo pode ser encontrado no ambiente de circulação do ser humano, porém, o seu principal reservatório é o homem, sendo encontrado em diversas partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele. Destes sítios anatômicos, as narinas possuem o maior índice de colonização, cuja prevalência é de cerca de 40 % na população adulta, podendo ser ainda maior, dentro de hospitais (KYAW, 2005; SANTOS *et al*, 2007).

O *S. aureus* encontrado nas fossas nasais ou na pele de neonatos, crianças e adultos pode, a partir desses sítios, alcançar outras regiões da pele e das mucosas. Caso as barreiras naturais, isto é, pele e mucosas, estejam comprometidas por trauma ou cirurgia, o *S aureus* pode se alojar no tecido e provocar uma lesão local (ROBERT, 2005; VELÁZQUEZ-MEZA *et al*, 2005; SANTOS *et al*, 2007).

A colonização nasal pelo *S. aureus* é desprovida de sintomas, ou seja, o indivíduo não desenvolve infecção. Essa colonização assintomática tem grande importância clínica, uma vez que, com as narinas colonizadas, o indivíduo contamina as próprias mãos e passa a ser veículo de transferência da bactéria por contato. Assim, principalmente em hospitais, o hospedeiro assintomático pode ser um paciente, um visitante, ou mesmo um profissional de saúde. De acordo com alguns estudos, o carreamento nasal também contribui para a transmissão da bactéria por disseminação aérea (CAVALCANTI *et al*, 2005).

O *S. aureus* também traz riscos para pacientes que fazem diálise, queimados, diabéticos e HIV positivos visto que pode causar diversos processos infecciosos, que variam desde infecções cutâneas benignas até infecções sistêmicas, potencialmente fatais (CAVALCANTI *et al*, 2005; SANTOS *et al* 2007).

O *S. aureus* foi descrito pela primeira vez há mais de 120 anos pelo médico escocês Alexander Ogston, que reconheceu seu papel tanto em infecções de pele quanto na sepse (infecção generalizada do organismo). Um estudo (SALES JUNIOR *et al.*, 2006) mostra o *S. aureus* resistente a meticilina como segunda maior causa da sepse em unidades de terapia intensiva. É preocupante o crescimento vertiginoso do *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), que se tornou uma endemia nas instalações hospitalares de todo o mundo. (ALANIS, 2005; CAVALCANTI *et al*, 2005)

1.4. ANTIBIOTICOTERAPIA – PANORAMA ATUAL

A implantação da antibioticoterapia no início da década de 1930, com o emprego da sulfanilamida (descoberta por Gerhard Domagk, em 1932), aparentemente decretava o fim às doenças infecciosas. Contudo, ao analisarmos a evolução da resistência do *S. aureus*, observamos que, no final daquela década, surgiam as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes àquele quimioterápico (Figura 12). Com a entrada da penicilina em uso clínico, o *S. aureus* passou a desenvolver resistência a esse β -lactâmico pela produção da β -lactamase (penicilinase), capaz de hidrolisar o anel β -lactâmico da penicilina, tornando-a inativa (ALANIS, 2005; MAMISUKA, 2005; SANTOS *et al.*, 2007).

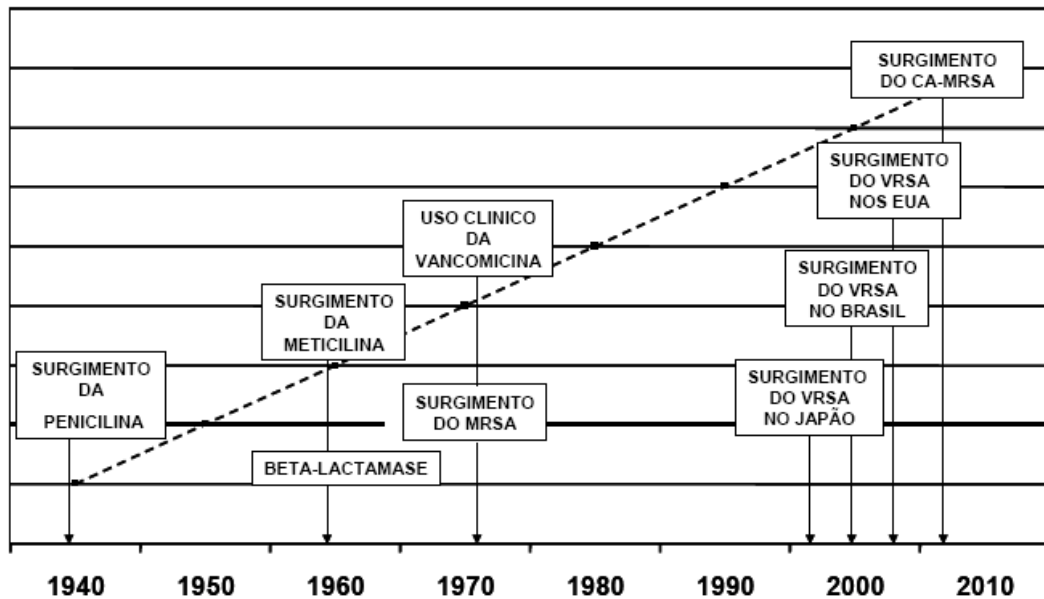


Figura 12. Cronologia clínica do surgimento de alguns antibióticos e cepas resistentes do *S. aureus* nos séculos XX e XXI. Reproduzido de (SANTOS *et al*, 2007).

Com a introdução da penicilina na clínica no início da década de 40, o pensamento na época era que o sucesso da antibioticoterapia para as infecções estafilocócicas estava garantido. Contudo, apesar de penicilina ter sido bastante eficiente no primeiro momento, pouco tempo depois, o *S. aureus* passou a desenvolver resistência a este β -lactâmico por produzir uma β -lactamase (penicilinase) capaz de hidrolisar o anel β -lactâmico da penicilina e torná-la inofensiva para a bactéria. Em 1944, apenas 5 % das cepas de *S. aureus* eram resistentes à penicilina, em 1949, 29% das cepas eram resistentes. Em 1959, a resistência dos à penicilina chegou à 80% das cepas de *S. aureus*, sendo que, atualmente também são resistentes à amoxicilina e à ampicilina (ALANIS, 2005; MAMISUKA, 2005; SANTOS *et al*, 2007).

Em 1960, foi descoberto um antibiótico do grupo das penicilinas, a meticilina, resistente à β -lactamase e, logo depois, foi descoberto a classe das cefalosporinas.

Porém, no início da década de 70, começaram a surgir, rapidamente, cepas resistentes à meticilina, chamados MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*), que também eram resistentes aos β -lactâmicos e às cefalosporinas.

Estes MRSA foram rapidamente disseminados em ambientes hospitalares restando apenas a vancomicina e a teicoplanina como opções terapêuticas. A vancomicina é um fármaco conhecido desde 1958, eficiente no tratamento de MRSA, apesar de apresentar efeitos nefrotóxicos e ototóxicos (LUTZ *et al*, 2003; SANTOS *et al*, 2007)

Em 1997, foi descrito pelo Prof Keich Hiramatsu da Universidade de Jutendo no Japão, o caso de uma cepa de MRSA, resistente à vancomicina, isolada de uma ferida cirúrgica de um garoto de 4 meses de idade (OLIVEIRA *et al*, 2001a; VELÁSQUEZ *et al*, 2002 ; WALSH, 2002; SANTOS *et al*, 2007).

A resistência do *S. aureus* à vancomicina provoca alterações no aspecto macro-morfológico das colônias, que se apresentam como colônias com aparência bastante heterogênea, dando a impressão de contaminação. Além disso, geralmente, estas cepas de *S. aureus* precisam de mais de 4 horas para quer o teste de coagulase de resultado positivo, levando a identificações errôneas de *Staphylococcus* coagulase negativa (Figura 13) (LUTZ *et al*, 2003; MAMISUKA, 2005; SANTOS *et al*, 2007).

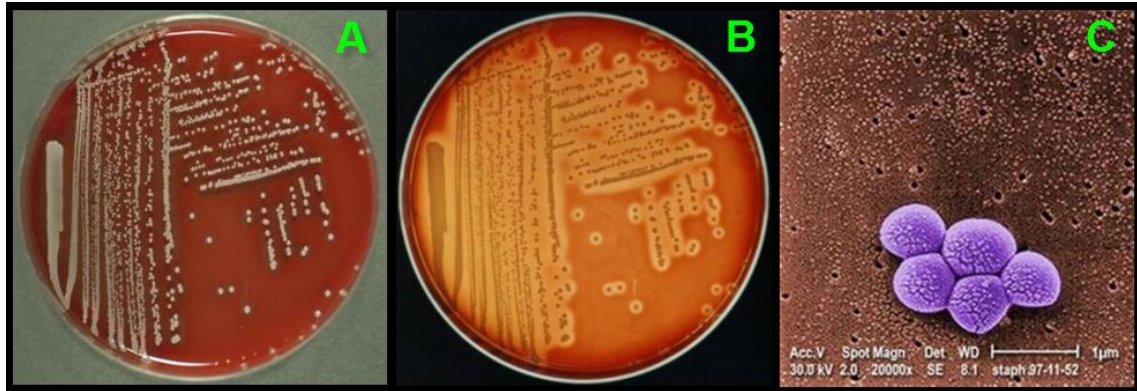


Figura 13 Colônias de *Staphylococcus aureus*: (A) visão macroscópica, placa Ágar-sangue, colônias pigmentadas com cor variando do branco acinzentado, passando pelo amarelo até laranja; (B) visão por luz transmitida mostrando a hemólise (áreas mais claras) e (C) visão microscópica (20.000X) de cepa resistente à meticilina (alteração morfológica da organela). Fonte (<http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/showmorf.asp?articleid=29> (A e B) e <http://phil.cdc.gov/Phil/details.asp> (C), acessado em 21/06/2008)

Em 2000, foi encontrada no Brasil, as primeiras cepas de *S. aureus* resistente à vancomicina, denominada VISA (*Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus*), em um hospital de referência do município de Queimados no Rio de Janeiro. Este dado entre tantos outros, apontam a necessidade premente, identificada inclusive pela Organização Mundial de Saúde, da descoberta ou síntese de novos antibióticos para o tratamento das cepas de *S. aureus* multiresistentes (TAVARES, 2002; LUTZ *et al*, 2003; MAMISUKA, 2005).

Os agentes antimicrobianos desenvolvidos mais recentemente e utilizados no controle das infecções resistentes pertencem a classe das oxazolidinonas (linezolida), estreptograminas (Synercid®) e lipopeptídeos (daptomicina).

Linezolida (Zyvox® - Figura 5) é uma oxazolidinona semi-sintética estruturalmente semelhante a outras substâncias pertencentes a esta classe aprovada em 2000 nos EUA pelo FDA (Food and Drug Administration). O mecanismo de ação deste fármaco é por ligação aos sítios do ribossomo bacteriano (23S da subunidade 50S), impedindo a formação de um complexo de iniciação 70S

funcional, essencial para o processo de transcrição, sendo um fármaco essencialmente bacteriostático, porém bactericida contra alguns tipos de bactérias. O mecanismo de resistência bacteriano é mediado por alterações nos sítios de ligação do ribossomo (raro) e a competição com outros inibidores da síntese proteica é desconhecida. Este fármaco é disponível para aplicação por via oral ou injetável (HANCOCK, 2005).

Quinupristina e dalfopristina são duas substâncias derivadas da pristinamicina pertencentes à classe das estreptograminas. A combinação destas duas substâncias semi-sintéticas na proporção de 30:70 (peso/peso) forma o medicamento conhecido por Synercid[®] aprovado em setembro de 1999 nos EUA pelo FDA (Figura 14) (HANCOCK, 2005).

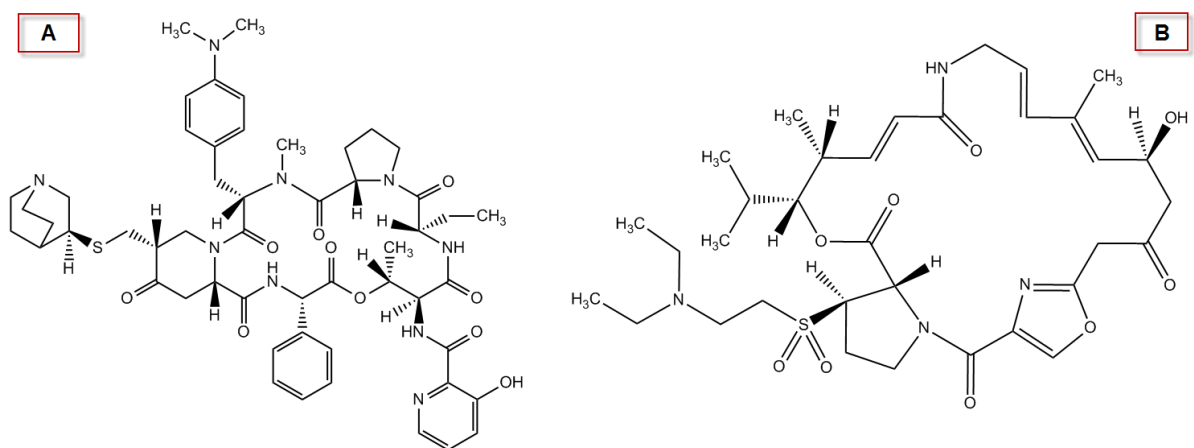


Figura 14 – Estruturas químicas da quinupristina (A) e da dalfopristina (B), princípios ativos do medicamento Synercid[®].

Isoladamente cada uma destas duas substâncias tem ação bacteriostática, mas quando combinadas em proporções adequadas apresentam característica bactericida, atuando de forma sinérgica sobre a subunidade do ribossomo 50S inibindo a síntese proteica. Alterações no sítio de ligação ribossomal e inativação

enzimática são os principais mecanismos de resistência bacteriana. (HANCOCK, 2005)

Daptomicina (Cubicin[®]) é membro de uma nova classe de antibióticos bactericidas denominados de lipopeptídeos demonstrando a capacidade *in vitro* de eliminar rapidamente todas as bactérias Gram-positivas com relevância clínica via um mecanismo de ação distinto de outros antibióticos atualmente no mercado (Figura 15). (JUNG *et al*, 2004; HANCOCK, 2005)

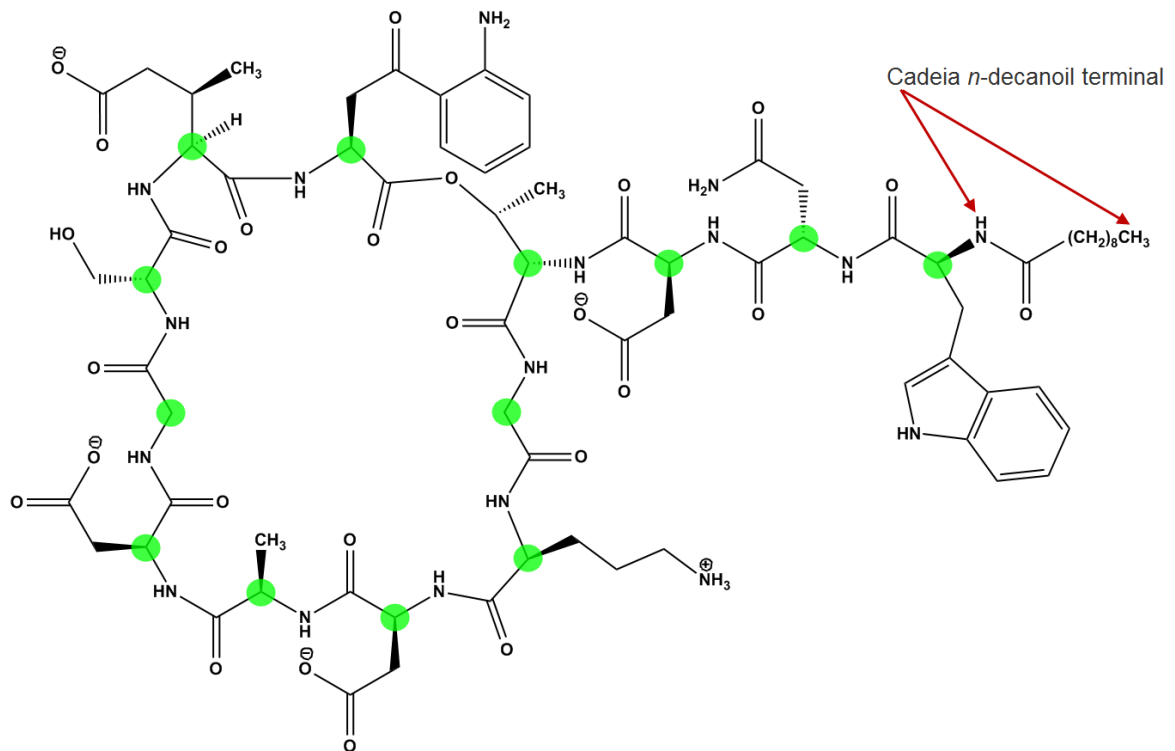


Figura 15 - Estrutura da daptomicina (Cubicin[®]). Adaptado de (JUNG *et al.*, 2004)

Daptomicina é obtida do *Streptomyces roseosporus*, possui um alto peso molecular (PM=1620 Da), disponível somente para uso parenteral e foi aprovada em setembro de 2003 nos EUA pelo FDA (JUNG *et al*, 2004; HANCOCK, 2005).

Daptomicina é um lipopeptídeo macrocíclico composto por 13 resíduos de aminoácidos, incluindo três D-aminoácidos (D-asparagina (C2), D-alanina (C8) e D-

serina (C11)), três aminoácidos incomuns (ornitina (C6), ácido (2S,3R)-3-metil-glutâmico (C12) e kynurenina (C13)) e o ácido *n*-decanoil como cadeia terminal. Existem quatro resíduos ácidos (três resíduos de ácido aspártico (C3, C7 e C9) e um resíduo de ácido 3-metil-glutâmico (C12)) e um resíduo básico (ornitina (C6)), resultado numa carga molecular total de -3 em pH neutro. O peptídeo é cíclico por formação de uma ligação éster entre os aminoácidos treonina (C4) e kynurenina (C13) (Figura 15) (JUNG *et al*, 2004).

O mecanismo de ação envolve a inserção, dependente de cálcio, da substância na membrana citoplásmica bacteriana, que despolariza a membrana, resultando na inibição da síntese proteica, síntese de RNA e DNA (Figura 16) (HANCOCK, 2005). Na ausência de íons Ca^{+2} , a daptomicina apresenta uma concentração inibitória mínima maior que 64 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que em concentrações de 0,34 mM, 2,00 mM e 5,00 mM de íons Ca^{+2} , as concentrações inibitórias mínimas reduzem para 2,00, 1,00 e 0,63 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, confirmando a dependência da atividade da daptomicina em função do íon Ca^{+2} (JUNG *et al*, 2004).

Embora, globalmente, a estrutura da daptomicina seja polar, na presença de íons Ca^{+2} ela sofre uma alteração conformacional que aumenta sua característica anfifílica por concentrar em uma terminação da molécula as cadeias laterais ácidas expondo sua cadeia lipofílica na outra terminação (Figura 16). Os íons Ca^{+2} também favorecem a oligomerização da daptomicina em uma estrutura micelar com a porção lipídica direcionada para o interior da micela. Na presença de membranas carregadas negativamente, ocorre um novo rearranjo da estrutura micelar de modo a permitir a interação da região lipofílica com a membrana, ocorrendo a formação de canais através dos quais ocorre efluxo de íons potássio, causando a despolarização

da membrana e a morte celular. Daptomicina é ativa somente contra bactérias Gram positivas porque ela não é capaz de atravessar a membrana externa de organismos Gram negativos (BAMBEKE *et al*, 2008).

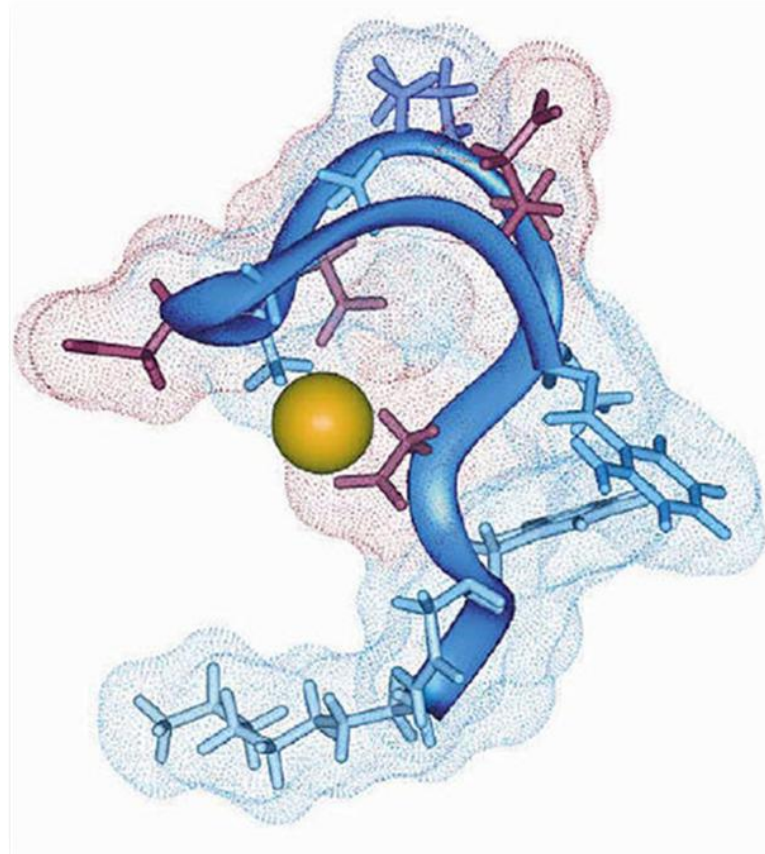


Figura 16 - Estrutura da daptomicina (Cubicin®) complexada com um íon cálcio. A estrutura foi baseada em RMN bidimensional e modelada no software Insight II versão 97.2. Cadeias laterais hidrofílicas carregadas negativamente são representadas em vermelho; cadeias laterais hidrofóbicas, incluindo a cadeia de ácido graxo, são representados em azul. A ligação do íon cálcio (amarelo) resulta num deslocamento conformacional tornando a daptomicina anfipática e permitindo a inserção da macromolécula na membrana. Reproduzido de (HANCOCK, 2005).

Atualmente, nenhum mecanismo de resistência bacteriana é conhecido para a daptomicina. Entretanto, pacientes com bacteremia prolongada por MRSA e submetidos ao tratamento com vancomicina como monoterapia apresentam diminuição da susceptibilidade (elevação do MIC) à daptomicina e à vancomicina (HANCOCK, 2004; BENNET *et al*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Uma vez constatado que o uso indiscriminado e errôneo de antimicrobianos leva a uma pressão seletiva sobre os microorganismos e, conseqüentemente, ao desenvolvimento da resistência bacteriana, surge à necessidade de buscar novos fármacos que sejam eficazes para o tratamento destas doenças e que apresentem menos efeitos colaterais. Isto se torna mais relevante quando deparamos com a quantidade de fármacos antimicrobianos efetivos ou com pouca resistência bacteriana disponíveis na terapêutica, o tempo para desenvolvimento de novos fármacos e a velocidade com que os microorganismos desenvolvem resistência aos fármacos atualmente em uso no tratamento das infecções microbianas.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Este trabalho visa aplicar estudos de modelagem molecular e avaliação da relação estrutura atividade acoplados a estudos farmacocinéticos e toxicológicos *in silico* em três novas séries de derivados heterocíclicos que apresentaram diferentes perfis de atividade antibacteriana. Busca-se determinar propriedades estereoeletrônicas que possam ser correlacionadas com a atividade biológica observada e avaliar o potencial teórico desses novos compostos como candidatos a fármacos antimicrobianos.

3.2 ESPECÍFICO

Aplicação de metodologias de modelagem molecular em derivados heterocíclicos aromáticos – pirazolo-piridina (série **1**) e tieno-piridina (séries **2** e **3**) (Figura 17) com o intuito de identificar parâmetros eletrônicos e físico-químicos globais tais como mapas de potencial eletrostático molecular (MEP), energias dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, densidades de HOMO e LUMO, cLogP e momentos de dipolo molecular que possam permitir realizar um estudo da relação da estrutura química com a atividade antimicrobiana frente a cepas resistentes de *S. epidermidis*.

Os dados de modelagem molecular serão empregados para propor um modelo farmacofórico preliminar, objetivando estabelecer parâmetros geométricos que possam definir a orientação de determinados grupos nos derivados heterocíclicos que podem ser relevantes para interagir com o sítio receptor.

Os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos teóricos (ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade), juntamente com *drugscore* e *druglikeness*, serão calculados com o intuito de analisar se os compostos possuem as características essenciais para que possam ser considerados como potenciais candidatos a fármacos e, dessa forma, evitar gastos desnecessários durante o processo de identificação de novas entidades químicas candidatos a novos agentes antimicrobianos.

A predição teórica de toxicidade analisará a mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos na reprodução que são importantes na seleção de novas substâncias bioativas candidatas a fármacos. Os derivados também serão avaliados quanto aos requisitos da Regra dos Cinco de Lipinski, que avalia a probabilidade de uma substância ser um bom candidato a fármaco por via oral.

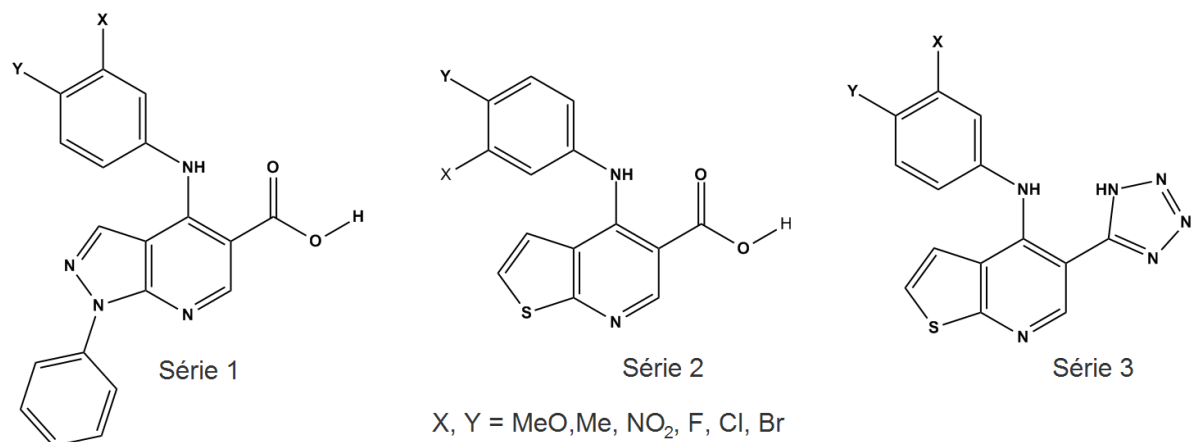


Figura 17 – Estruturas da Série 1 (pirazolo-piridina) e Séries 2 e 3 (tieno-piridina).

4. METODOLOGIA

O fluxograma abaixo (Figura 18) descreve resumidamente a metodologia aplicada neste estudo.

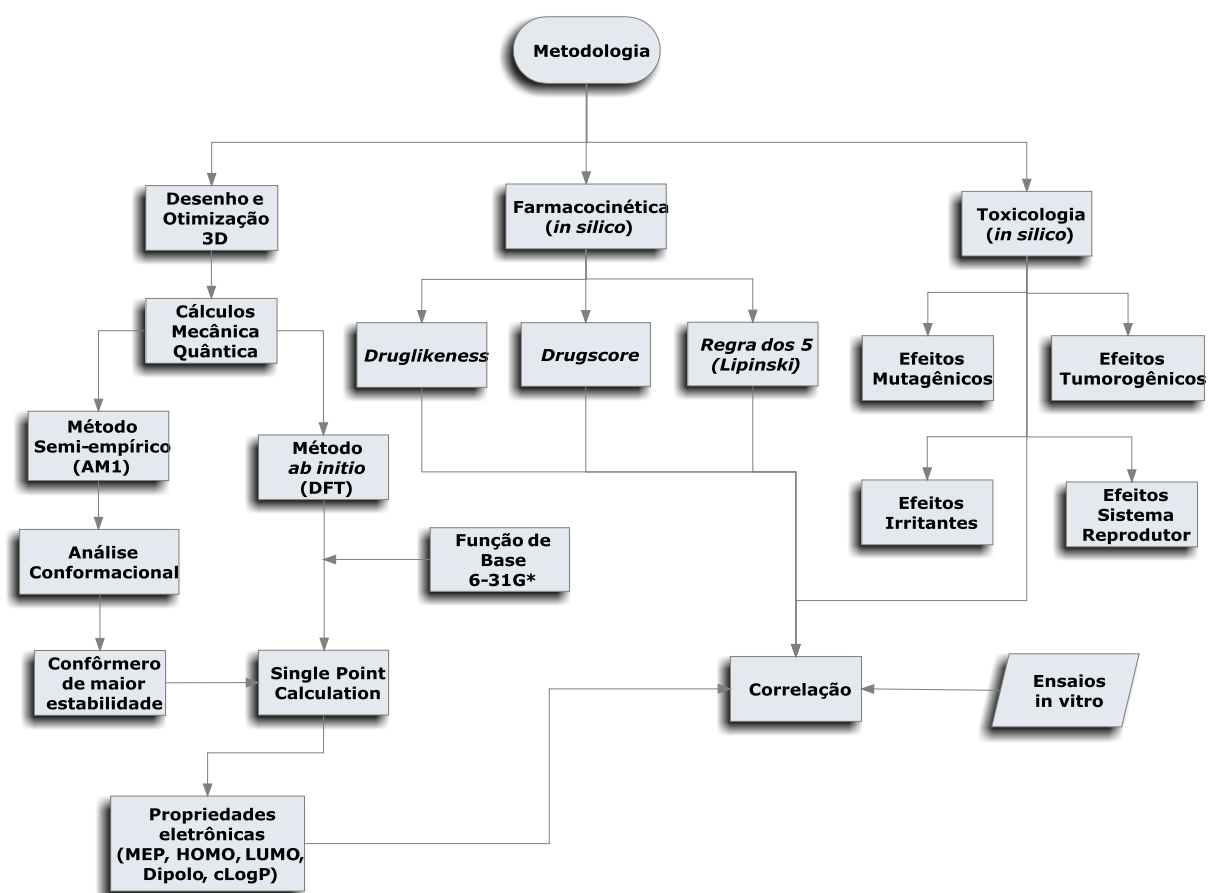


Figura 18– Fluxograma da metodologia.

4.1 METODOLOGIA – FUNDAMENTOS TEÓRICOS

4.1.1 ANÁLISE CONFORMACIONAL

A energia a temperatura ambiente é grande o bastante para que todos os átomos numa molécula estejam em movimento permanente. Isto significa que a posição absoluta dos átomos na molécula, e da própria molécula como um todo, não é fixa e a localização de substituintes conectados à ligações simples pode variar ao longo do tempo. Assim, cada molécula contendo uma ou mais ligações simples existe em variados rotâmeros ou diferentes conformações. A composição quantitativa e qualitativa desta mistura esta permanentemente mudando. Naturalmente, as conformações de menor energia são encontradas em maior quantidade. A transformação de uma conformação para outra está relacionada a mudanças nos ângulos de torção (ou ângulos de diedro) das ligações simples. (LEACH, 2001; HÖLTJE, 2003)

As mudanças na conformação molecular podem ser consideradas como movimentos sobre uma superfície multidimensional que descreve a relação entre a energia potencial e a geometria da molécula. Cada ponto sobre esta superfície representa a energia potencial de uma única conformação. Conformações estáveis de uma molécula correspondem a um mínimo local nesta superfície de energia (Figura 19) (LEACH, 2001; HÖLTJE, 2003).

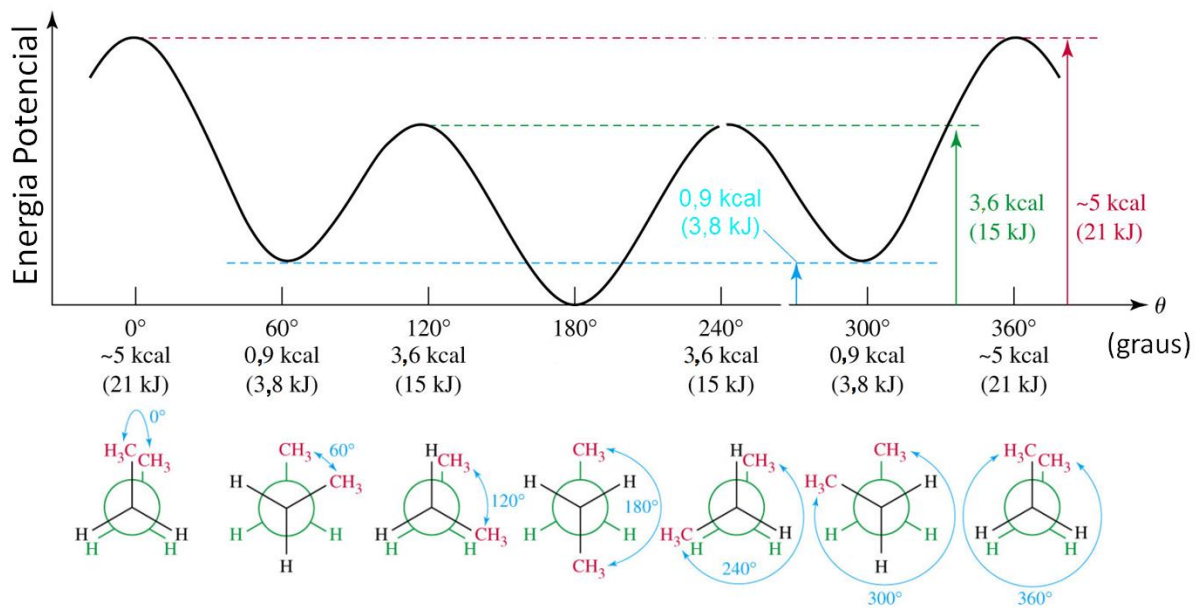


Figura 19 – Diagrama de energia para o *n*-butano mostrando os mínimos locais e o mínimo global de suas conformações. Adaptado de (http://wps.prenhall.com/wps/media/objects/340/348272/Instructor_Resources/Chapter_03/Text_Images/FG03_11.JPG)

Independente do método de minimização de energia usado, não há como garantir que o mínimo encontrado seja o mínimo absoluto (ou mínimo global) da superfície de energia potencial (SEP). Normalmente, muitos mínimos locais estão presentes e é comum que a aplicação de algum algoritmo de minimização de energia acabe conduzindo a um deles, dependendo da proximidade da geometria inicial do sistema. [Isto é particularmente verdade no caso da energia em função da torção dos ângulos diedros, ou seja, da energia conformacional.] Em princípio, o mínimo absoluto só pode ser encontrado por análise conformacional sistemática do sistema molecular (LEACH, 2001; HÖLTJE, 2003).

A técnica mais rigorosa de realizar uma análise conformacional é varrer cada ângulo diedro da estrutura independentemente, a chamada pesquisa de grade. A aplicação deste procedimento é, contudo, limitada. O número de conformações a serem analisadas equivale a $(360/\theta)^n$, onde θ é o incremento usado no processo de

varredura do ângulo diedro e n é o número de ligações avaliadas. Quanto menor o incremento θ , maior a quantidade de informações que se obtém sobre a energia conformacional, mas, na prática, apenas algumas conformações são importantes. O tamanho do incremento ótimo para a pesquisa conformacional sistemática é normalmente de 30 graus. Isso significa que em uma rotação completa de 360° , 12 conformações são obtidas. Entretanto, o número de ligações rotáveis avaliadas (n) pode aumentar o número de conformações a enésima potência (HÖLTJE, 2003).

A atividade biológica de uma molécula é dependente de uma única conformação dentre todas as conformações de baixa energia. A pesquisa pela assim denominada conformação bioativa é um dos objetivos principais em química medicinal. Somente a conformação bioativa pode se ligar em um ambiente macromolecular específico no sítio ativo do receptor protéico (HÖLTJE, 2003).

4.1.2 MÉTODOS DE MODELAGEM MOLECULAR

4.1.2.1 MECÂNICA MOLECULAR

Quando iniciamos um estudo de modelagem molecular, a primeira coisa a fazer é gerar um modelo da molécula no computador definindo-se as posições dos átomos no espaço por um conjunto de coordenadas cartesianas. Uma geometria inicial razoável e confiável determina a qualidade de toda a investigação subsequente. Os métodos empregados para geração de estruturas moleculares tridimensionais (3D) são (HÖLTJE, 2003):

- banco de dados cristalográficos de raios-X
- compilação de bibliotecas de fragmentos com geometrias padrões,

- desenho bidimensional (2D) das estruturas moleculares e
- conversão da estrutura 2D para 3D via programas específicos.

As estruturas moleculares geradas deverão sempre ter sua geometria otimizada a fim de se encontrar o estado de energia mínima individual. Isto normalmente é feito aplicando-se um método de mecânica molecular. A expressão “mecânica molecular” é usada para definir um método computacional amplamente aceito e empregado para calcular as geometrias e energias moleculares (HÖLTJE, 2003).

Neste método, os elétrons e o núcleo dos átomos não são explicitamente incluídos nos cálculos. A mecânica molecular considera a composição atômica da molécula como uma coleção de massas interagindo entre si através de forças harmônicas. Como resultado desta simplificação, a mecânica molecular é um método computacional relativamente rápido, aplicável a moléculas pequenas e grandes e até mesmo sistemas oligomoleculares (LEACH, 2001; HÖLTJE, 2003).

Na abordagem pelo método da mecânica molecular, os átomos são considerados como bolas de diferentes tamanhos (tipos de átomos) unidos por molas de comprimento variável (ligações). Aplica-se então a lei de Hooke para se calcular a energia potencial do conjunto de átomos. Durante o cálculo a energia total é minimizada com relação às coordenadas atômicas (Equação 1) (LEACH, 2001; HÖLTJE, 2003).

$$E_{tot} = E_s + E_b + E_t + E_{vdw} + E_{elec} + \dots \quad \text{Equação 1}$$

Onde E_{tot} é a energia total da molécula, E_s é o termo da energia do comprimento da ligação, E_b é o termo da energia do ângulo de ligação, E_t é a energia de torção,

E_{vdw} é o termo referente a energia de Van der Waals e E_{elec} é o termo da energia eletrostática (HÖLTJE, 2003).

A mecânica molecular realiza cálculos da energia estérica total de uma molécula em termos de desvio em relação a um estado “não tensionado” do comprimento de ligação, do ângulo de ligação e do ângulo de torção, incluindo interações não ligantes intramoleculares. Uma coleção destes valores de referência juntamente com as respectivas constantes de força relacionadas a cada uma destas variáveis é conhecida como “campo de força” (*force field*) (HÖLTJE, 2003).

O primeiro termo na Equação 1 descreve a mudança de energia em função do estiramento e da contração do comprimento de ligação entre dois átomos com relação à um valor de repouso não tensionado. Assume-se, em geral, que as forças interatômicas são harmônicas, de forma que este termo possa ser descrito por uma simples função quadrática dada pela Equação 2 (HÖLTJE, 2003):

$$E_s = \frac{k_b (b - b_0)^2}{2} \quad \text{Equação 2}$$

Onde K_b é a constante de força da ligação, b_0 é o comprimento de ligação não tensionado e b é o comprimento real de ligação.

No caso do ângulo de ligação emprega-se também uma representação simples harmônica. O segundo termo, referente a energia do ângulo de ligação é descrito pela Equação 3 (HÖLTJE, 2003).

$$E_b = \frac{k_\theta (\theta - \theta_0)^2}{2} \quad \text{Equação 3}$$

Onde k_θ é a constante de força do ângulo de ligação (θ), θ_0 é o ângulo de ligação no equilíbrio e θ é o valor real para θ .

O termo referente à variação da energia potencial em função do ângulo de diedro é descrito pela Equação 4 (HÖLTJE, 2003).

$$E_t = \frac{K_\varphi (1 - \cos(n\varphi - \varphi_0))^2}{2} \quad \text{Equação 4}$$

Onde k_φ é a barreira torcional, φ é o ângulo de torção real, n é a periodicidade (número de mínimos de energia dentro de um ciclo completo) e φ_0 é o ângulo torcional de referência.

O termo que representa a energia de van der Waals, isto é, interações entre pares de átomos distantes três ou mais ligações, é usualmente representada pela Equação 5 (HÖLTJE, 2003).

$$E_{vdw} = \sum \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \quad \text{Equação 5}$$

Onde A_{ij} é o coeficiente do termo de repulsão, B_{ij} é o coeficiente do termo de atração e r_{ij} é a distância entre os átomos i e j . Esta é a forma do potencial de Lennard-Jones, mas há diversas modificações deste termo utilizadas em diferentes campos de força.

O termo que representa a energia eletrostática (também entre pares de átomos distantes 3 ou mais ligações) é geralmente calculado usando o potencial descrito pela Equação 6 (HÖLTJE, 2003).

$$E_{elect} = \frac{1}{\epsilon} \frac{Q_1 Q_2}{r}$$

Equação 6

Onde ϵ é a constante dielétrica do meio, Q_1 e Q_2 são as cargas atômicas dos átomos interagindo e r a distância interatômica.

A idéia básica da mecânica molecular é que as ligações possuem comprimentos e ângulos “naturais”. Os valores no equilíbrio dos ângulos de ligação e dos comprimentos de ligação e as constantes de força correspondentes utilizadas nas funções de energia potencial são definidos no campo de força e formam os “parâmetros do campo de força”. Cada desvio destes parâmetros padrões resultará num incremento da energia total da molécula. Assim a energia total é uma medida da tensão intramolecular relativa, correlacionada a uma molécula hipotética com geometria ideal (HÖLTJE, 2003).

O objetivo de um bom campo de força é descrever tanto quanto possível diferentes classes de moléculas com razoável exatidão. A confiabilidade nos cálculos de mecânica molecular é dependente de funções de energia potencial e da qualidade dos parâmetros incorporados a estas funções. Assim, é fácil compreender que cálculos de alta qualidade não podem ser realizados se parâmetros geométricos importantes são negligenciados. Para evitar esta situação, a escolha de um campo de força adequado à uma investigação em particular deve ser cuidadosamente selecionado (HÖLTJE, 2003).

Com estes princípios em mente, é hora de examinar alguns dos campos de força mais comuns presentes em programas de modelagem profissionais. Dentre estes, “Dreiding” é um campo de força parametrizado para todos os tipos de átomos que qualquer químico orgânico esperaria obter dos elementos H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br e I. Em termos de expressão “padrão” seria descrito pela Equação 1 (HINCHLIFFE, 2006).

Em sua revisão de 1976, Norman Allinger essencialmente definiu o que chamamos de campo de força “MM1” (Molecular Mechanics Force Field 1 - MMFF1). Ele tratava apenas hidrocarbonetos, ignorando o termo de Coulomb e usando um potencial de Lennard-Jones de exponencial seis. Entretanto, essa abordagem encontrava problemas com os hidrocarbonetos cíclicos como, por exemplo, o ciclobutano e outros anéis tensionados (HINCHLIFFE, 2006).

Em 1977, Allinger introduz o campo de força “MM2” – campo de força para hidrocarbonetos aprimorado - (Molecular Mechanics Force Field 2 - MMFF2). O MM2 difere do MM1 em três aspectos principais:

- 1) O termo do ângulo de diedro da Equação 4 foi estendido conforme descrito pela Equação 7 (HINCHLIFFE, 2006):

$$E_t = \frac{k_{\varphi_1} (1 + \cos \varphi)}{2} + \frac{k_{\varphi_2} (1 + \cos 2\varphi)}{2} + \frac{k_{\varphi_3} (1 + \cos 3\varphi)}{2} \quad \text{Equação 7}$$

Onde cada k_{φ_n} foi encontrado e calibrado experimentalmente.

- 2) O termo de deformação do ângulo de ligação da Equação 3 foi estendido conforme descrito pela Equação 8 (HINCHLIFFE, 2006):

$$E_t = \frac{k_\theta (\theta - \theta_0)^2}{2} + \frac{k_\theta (\theta - \theta_0)^6}{2}$$

Equação 8

- 3) Os termos cruzados referentes ao estiramento e à deformação das ligações foram negligenciados (HINCHLIFFE, 2006).

O campo de força AMBER (um acrônimo para **A**ssisted **M**odel **B**uilding and **E**nergy **R**efinement) é um campo de força para simulação de aminoácidos e proteínas. Os ângulos e comprimentos de ligações utilizados em sua calibração foram obtidos experimentalmente de dados de microondas, difração de nêutrons e estudos quantum-mecânicos acurados. Os parâmetros foram então refinados com estudos de mecânica molecular sobre modelos como tetrahidrofurano, deoxiadenosina, dimetilfosfato e outros (HINCHLIFFE, 2006).

4.1.2.2 MECÂNICA QUÂNTICA - *ab initio*

Ab initio significa, estritamente, “do início” ou “dos princípios iniciais”, implicando que os cálculos que utilizam tal abordagem requerem como parâmetros somente constantes físicas como a velocidade da luz, a constante de Planck, a massa das partículas elementares e assim por diante. *Ab initio* de fato refere-se a cálculos que utilizam todas as equações Hartree-Fock, sem desprezar ou aproximar qualquer dos termos ou integrais empregados no operador Hamiltoniano. Esse modelo emprega um conjunto de funções de bases (“basis set”) nos cálculos. Uma função de base mínima, estritamente falando, conteria exatamente o número de funções que seriam

necessárias para acomodar todos os orbitais preenchidos de um átomo. Na prática, uma base mínima inclui todos os orbitais atômicos em uma camada. Assim, para o hidrogênio e o hélio, uma única função do tipo 1s seria necessária; para os elementos do lítio ao neônio, funções 1s, 2s e 2p seriam utilizadas e assim por diante. As bases STO-3G, STO-4G, etc (em geral STO-nG) são todas bases mínimas (LEACH, 2001).

As bases mínimas são conhecidas por apresentarem diversas deficiências. Um problema em particular ocorre com compostos contendo átomos do final do período, como por exemplo, oxigênio e flúor. Estes átomos são descritos utilizando-se o mesmo número de funções de base para os átomos do início do período, apesar de possuírem mais elétrons. O simples aumento do número de funções não necessariamente soluciona o problema ou aprimora o modelo. A solução mais comum deste problema é a introdução de uma base com “função de polarização”. Funções de polarização possuem um número quântico angular mais elevado, e assim correspondem aos orbitais p para o hidrogênio e d para os demais átomos (LEACH, 2001).

O uso de bases contendo funções de polarização é indicado por um asterisco (*). Assim, 6-31G* refere-se à base 6-31G com funções de polarização para átomos pesados (isto é, não hidrogênio). Dois asteriscos (e.g, 6-31G**) indicam a aplicação de funções de polarização (isto é, orbital p) para os átomos de hidrogênio e hélio. A base 6-31G** é particularmente útil onde ocorrem ligações hidrogênio. Funções de base com polarização parcial também foram desenvolvidas, por exemplo, 3-21G* que é a mesma base mínima 3.21G com funções de polarização parcial (LEACH, 2001).

Estas funções de bases são suficientes para a maioria dos cálculos. Entretanto, para alguns cálculos de nível mais elevado, uma base que efetivamente habilite o limite a ser alcançado deve ser considerada. Por outro lado, o custo computacional inerente à estas bases deve ser avaliado, de modo a ter-se uma relação custo/benefício favorável (LEACH, 2001).

Devido ao custo computacional elevado dos métodos *ab initio* mais sofisticados, um recurso comumente empregado é o de se otimizar a geometria com um conjunto de bases mais simples e então executar cálculo em ponto único (*Single Point Calculation*) com um método mais completo sobre a geometria resultante (LEACH, 2001).

4.1.2.3 MÉTODOS SEMI-EMPÍRICOS

A maior parte do tempo necessário para efetuar um cálculo *ab initio*, utilizando o modelo Hartree-Fock, é despendido invariavelmente na computação das integrais. O modo mais óbvio de reduzir o esforço computacional é negligenciar ou aproximar algumas destas integrais. Métodos semi-empíricos realizam este processo por considerarem apenas os elétrons da camada de valência. A razão por trás desta aproximação é que os elétrons envolvidos numa ligação química, e outros fenômenos que podemos desejar investigar, são os elétrons da camada de valência (LEACH, 2001).

O primeiro método a utilizar essa aproximação é o **CNDO** (**C**omplete **N**eglect of **D**ifferential **O**verlap ou Negligência Completa da Diferencial de Sobreposição), no qual os orbitais atômicos são considerados esfericamente simétricos na avaliação

das integrais de repulsão eletrônica. A direcionalidade dos orbitais p é considerada apenas pelas integrais de ressonância de um elétron. O método seguinte foi o **INDO** (Intermediate **N**eglect of **D**ifferential **O**verlap ou Negligência Intermediária da Diferencial de Sobreposição), que inclui integrais de repulsão de um centro entre orbitais atômicos do mesmo átomo. O método **NDDO** (**N**eglect of **D**iatomic **D**ifferential **O**verlap ou Negligência da Diferencial de Sobreposição Diatômica) foi o primeiro a incluir a direcionalidade dos orbitais atômicos durante o cálculo das integrais de repulsão (LEACH, 2001).

Dewar e colaboradores desenvolveram uma série de programas com o objetivo de tornar acessíveis cálculos semi-empíricos de orbitais moleculares aos não especialistas. Além disso, os programas deveriam fornecer informações estruturais quimicamente exatas com um custo razoável de tempo de cálculo, um objetivo que só pôde ser alcançado parcialmente. O método **MINDO/3** (**M**odified Intermediate **N**eglect of **D**ifferential **O**verlap, version 3 ou Negligência Intermediária Modificada da Diferencial de Sobreposição, versão 3) foi o primeiro programa a introduzir o conceito de cálculos de estrutura e de energia. O método, uma modificação do método INDO, contém um conjunto de parâmetros desenvolvidos para aproximar as integrais de repulsão de um centro, que eram avaliadas analiticamente. Estes parâmetros, juntamente com constantes usadas para avaliar integrais de ressonância, foram introduzidos para ajustar os resultados de forma a reproduzirem da melhor maneira possível dados experimentais e compensar, em parte, as aproximações inerentes à negligência da diferencial de sobreposição. Contudo, para moléculas nas quais a repulsão entre pares de elétrons solitários é significativa, o método apresentava alguns erros sistemáticos (LEACH, 2001).

O método **MNDO** (**M**odified **N**eglect of **D**ifferential **O**verlap ou Negligência Modificada da Diferencial de Sobreposição) foi então desenvolvido a partir da aproximação NDDO, na qual está presente o efeito da direcionalidade dos termos de repulsão elétron-elétron. Seguiram-se os métodos **AM1** (**A**ustin **M**odel **1** ou Modelo Austin 1) e **PM3** (**P**arametric **M**ethod **3** ou Método Paramétrico 3). Ambos os métodos incorporam aproximações muito semelhantes, mas diferem nas suas parametrizações (DEWAR, 1984).

Em 1989, Stewart aprimorou as técnicas de parametrização do AM1 e publicou o método PM3 que apresenta uma média de erros menores do que o AM1. Logo a seguir, Stewart aprimorou sua parametrização e foi capaz de aperfeiçoar 37 elementos simultaneamente, todos do grupo principal, juntamente com três metais de transição com orbitais *d* totalmente preenchidos (*Zn*, *Cd* e *Hg*). O modelo resultante, **PM5** (**P**arametric **M**ethod **5** ou Método Paramétrico 5), possui cerca de 40% de redução nos erros médios comparados aos outros métodos semi-empíricos para todos os 37 elementos (ROCHA *et al*, 2006).

Recentemente, o método AM1 foi objeto de uma re-parametrização para os átomos de *H*, *C*, *N*, *O*, *P*, *S*, *F*, *Cl*, *Br* e *I*, resultando no método **RM1** (**R**ecife **M**odel **1**). Para entalpia de formação, momento de dipolo, potencial de ionização e distância interatômica, os erros médios, para 1736 moléculas estudadas, são menores do que os gerados pelos métodos AM1, PM3 e PM5. O erro médio no ângulo de ligação calculado por RM1 é o único parâmetro com resultado levemente maior do que o obtido por AM1, mas foi inferior ao erro médio nos valores obtido por PM3 e PM5 (ROCHA *et al*, 2006).

4.2 METODOLOGIA COMPUTACIONAL

As estruturas 3D dos compostos foram construídas e otimizadas no programa Spartan'06[®], versão 1.1.2 da Wavefunction Inc., em ambiente Windows[®], numa estação de trabalho com processador Intel Pentium[®] 4, operando a 3.2 GHz de frequência e 2 Gb de memória RAM.

A distribuição das conformações foi efetuada através do método AM1 empregando análise conformacional sistemática com incrementos de 30 em 30 graus. O confôrmero de menor energia foi submetido a “*single point calculation*” pelo modelo DFT-B3LYP, utilizando a base 6-31G*. A seguir foram obtidos os valores de momento de dipolo molecular, mapa de potencial eletrostático molecular (MEP), mapa de densidade eletrônica do HOMO, mapa de densidade eletrônica do LUMO, distribuição dos orbitais HOMO e LUMO. Os valores de lipofilicidade (cLogP) foram obtidos pelo modelo de Crippen disponível no programa Spartan'06[®].

Todas as imagens foram capturadas diretamente da tela com o programa SnagIt[®], versão 8.2.3 da TechSmith Corporation, sem edição ou correção, com exceção da identificação ou legenda dos compostos.

4.3 METODOLOGIA - ESTUDO TEÓRICO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E DE TOXICIDADE *IN SILICO* – ADMET (ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLIZAÇÃO, ELIMINAÇÃO E TOXICIDADE)

A farmacocinética teórica *in silico* é uma abordagem atualmente muito utilizada no estudo inicial das propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade – também chamada de ADME/Tox) cujo objetivo é limitar o gasto desnecessário em ensaios biológicos de compostos com alta probabilidade de problemas farmacocinéticos e tóxicos futuros, economizando tempo e investimento (LIPINSKI, 2004; KADAN, 2007; KHAN, 2007; HOU *et al*, 2007).

A confiabilidade nestes modelos teóricos é dependente de informações de banco de dados proprietários e que estão sendo gradualmente liberados pelas indústrias farmacêuticas. Estes modelos também são submetidos à testes de desafio, onde o objetivo é determinar o grau de confiança no mesmo (STOUCH *et al*, 2003; TETKO *et al*, 2006; WANG *et al*, 2007).

Os dados teóricos a serem relacionados ao potencial comportamento farmacocinético e toxicológico dos compostos estudados foram obtidos *in silico* usando o programa Osiris[®] Property Explorer da Actelion Pharmaceuticals⁽¹⁾.

Foram obtidos dados relacionados ao risco de toxicidade (mutagênico, tumorigênico, irritante e efeitos no sistema reprodutor), “*druglikeness*” (semelhança com fármacos) e “*drugscore*” (índice de aproximação para se tornar um potencial candidato a fármaco).

¹ <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>

“Drugscore” combina os valores obtidos de “druglikenes”, cLogP (lipofilicidade), logS (solubilidade), peso molecular e riscos de toxicidade em um único valor de modo a avaliar se o composto tem potencial para se tornar um fármaco.

O risco de toxicidade é baseado no banco de dados de substâncias químicas que possuem comprovadamente efeito tóxico (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances - RTECS) e validado com um banco de dados contendo fármacos comercialmente disponíveis e largamente usado no mercado.

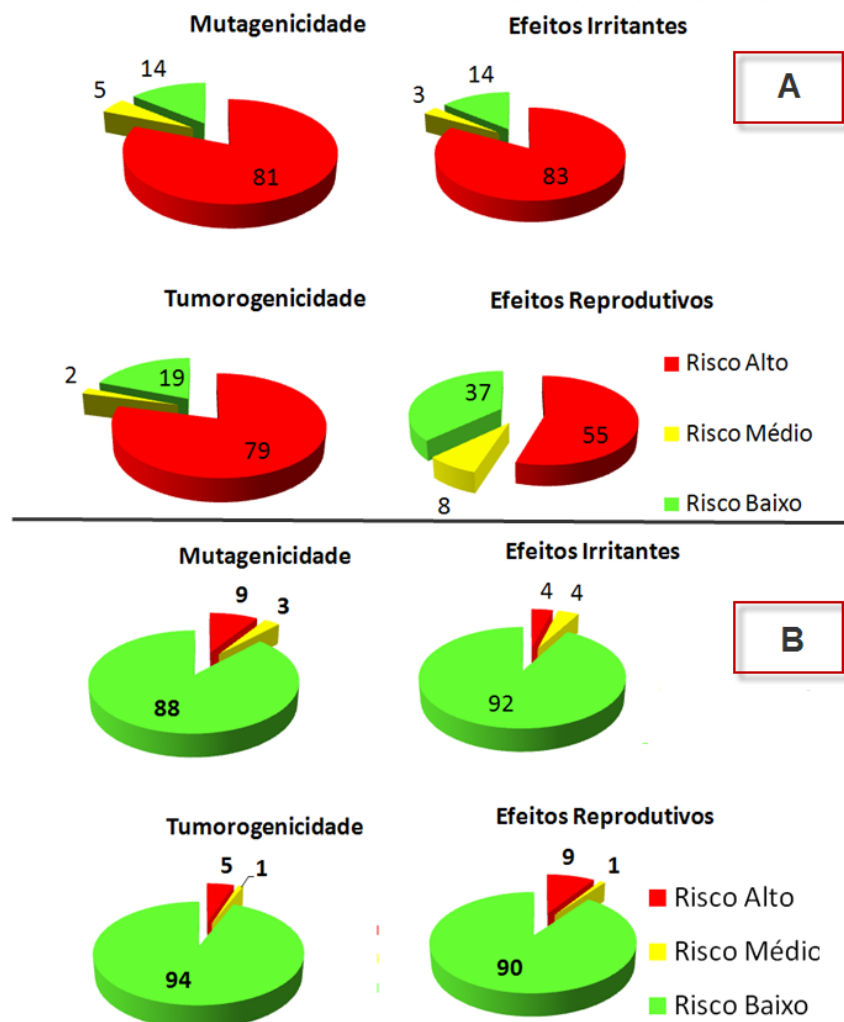


Figura 20- Osiris® Property Explore – Gráfico de Treinamento. Resultado percentual do treinamento com substâncias químicas com efeitos tóxicos (A) e validação utilizando-se fármacos em comercializáveis (B). Adaptado de (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/tox.html>).

De acordo com o gráfico de treinamento (Figura 20) o programa Osiris tem um bom grau de confiabilidade. Considerando, por exemplo, os valores obtidos para o risco mutagênico, apenas 14% das substâncias químicas tóxicas avaliadas foram erroneamente classificadas com risco baixo, enquanto 86% tiveram atribuição entre alto e médio risco e, portanto, de acordo com os dados experimentais.

No processo de validação (Figura 19B), utilizou-se apenas fármacos disponíveis comercialmente, onde apenas 12% dos fármacos apresentaram resultados discrepantes, distribuídos entre alto e médio risco, enquanto que a maioria dos fármacos foi corretamente identificada (88%) como não possuindo efeito mutagênico.

O algoritmo de avaliação de semelhança com fármacos (“druglikeness”) foi desenvolvido pela Actelion. A lista de fragmentos é criada a partir de um banco de dados de 3300 fármacos comerciais (fragmentos *druglike*) assim como 15000 substâncias químicas comercialmente disponíveis no catálogo Fluka® (fragmentos não-*druglike*) formando uma lista completa com todos os fragmentos disponíveis. A geração dos fragmentos ocorre a partir da quebra das ligações simples. O valor de *druglikeness* (*d*) é, então, calculado com a Equação 9 somando os valores dos fragmentos que estão presentes na molécula em estudo.

$$d = \frac{\sum v_i}{\sqrt{n}}$$

Equação 9

Todos os fragmentos com frequência acima de certo limite foram agrupados a fim de remover os altamente redundantes. Para os demais fragmentos, o potencial

de *druglikeness* foi determinado como o logaritmo do quociente da frequência nos fármacos comerciais versus as substâncias químicas do catálogo Fluka (Figura 21).

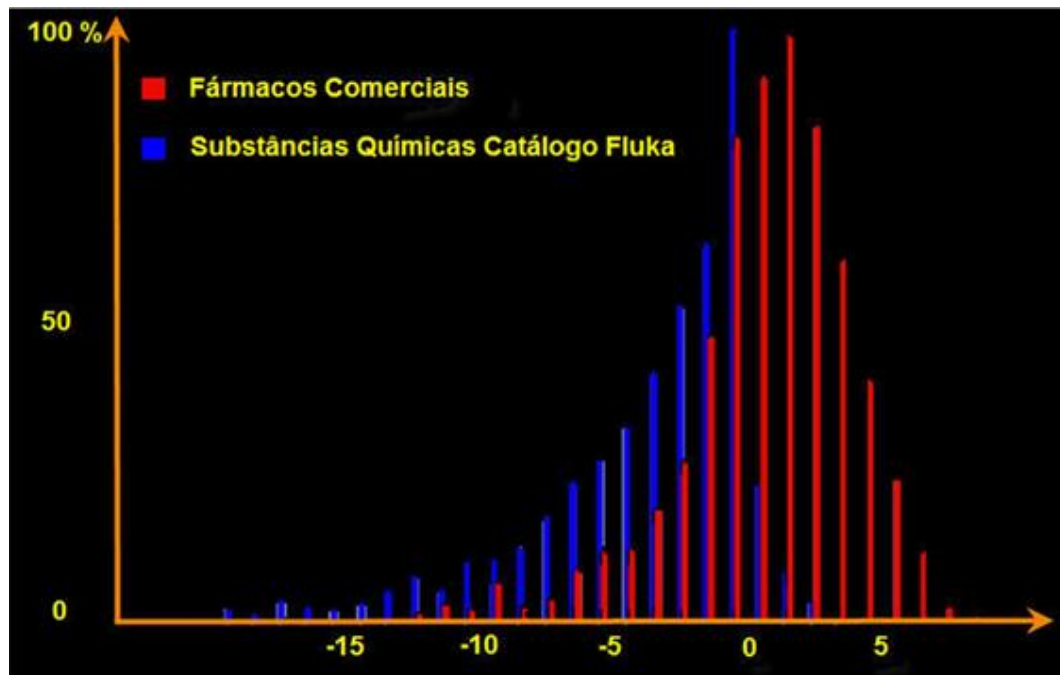


Figura 21 - Distribuição de *druglikeness*. Fármacos comerciais (em vermelho) versus substâncias químicas do catálogo Fluka (em azul). Fonte: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>

No gráfico obtido (Figura 20), 80% dos fármacos apresentam um valor de *druglikeness* positivo, enquanto que as substâncias químicas do catálogo da Fluka apresentaram um valor negativo.

Assim, os dados obtidos com o programa Osiris[®] Property Explorer podem ser utilizados como parâmetros na avaliação farmacocinética e toxicológica com boa confiabilidade (COSTA *et al*, 2006).

4.3.1 REGRA DOS CINCO

Alta biodisponibilidade oral é freqüentemente uma consideração importante no desenvolvimento de moléculas bioativas como agentes terapêuticos e o candidato deve atender a quatro parâmetros globalmente associados com a solubilidade e a permeabilidade: peso molecular, Log P (lipofilicidade), número de doadores de ligação hidrogênio número de receptores de ligação hidrogênio. Essa condição ficou conhecida pelo mnemônico “Regra dos Cinco”, porque para cada um dos quatro parâmetros, os valores encontrados eram próximos a cinco ou múltiplos de cinco (LIPINSKI, 2004).

O WDI (World Drugs Index – Índice Mundial de Fármacos) é um banco de dados computadorizado contendo mais de 50.000 substâncias. Deste banco de dados foi extraído um conjunto de substâncias que serviu de banco de prova para a “Regra dos Cinco”. A análise destas substâncias mostrou que (LIPINSKI, 2004):

- 11% das substâncias analisadas apresentam um peso molecular maior do que 500 Da;
- 10% das substâncias analisadas apresentam um cLogP (lipofilicidade) maior do que 5;
- 8% das substâncias analisadas apresentam a soma de *OH* e *NH* maior do que 5;
- 12% das substâncias analisadas apresentam a soma de átomos *N* e *O* na fórmula molecular maior do que 10.

A “Regra dos Cinco” estabelece que uma absorção ou permeação reduzida será mais comum quando (LIPINSKI, 2004):

- ✓ Houver mais do que 5 doadores de ligação hidrogênio (expresso pela soma de *OH* e *NH* na molécula);
- ✓ O peso molecular for maior do que 500 Da;
- ✓ O cLogP for maior do que 5;
- ✓ Houver mais do que 10 aceptores de ligação hidrogênio (expresso pela soma de átomos de *N* e *O*);

As classes terapêuticas oralmente ativas que são exceção a “Regra dos 5” são: antibióticos, antifúngicos, vitaminas e glicosídeos cardiotônicos. Uma possível explicação para estas substâncias que “violam” a “Regra dos Cinco” seria que membros destas classes terapêuticas apresentam características estruturais que permitem ao fármaco atuar como substrato para transportadores que ocorrem naturalmente (LIPINSKI, 2004).

Uma extensão da “Regra dos Cinco” foi formulada após o estudo de uma série de compostos ensaiados em ratos. Neste trabalho compostos com o número de ligações rotáveis menor do que dez (10) e área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 Å² (ou a soma do número de aceptores e de doadores de ligação hidrogênio menor do que 12) apresentam melhor biodisponibilidade oral no rato. Também foi observado que uma reduzida PSA correlaciona melhor com o aumento da velocidade de permeação do que a lipofilicidade (cLogP) e que um aumento no número de ligações rotáveis possui um efeito deletério na velocidade de permeação (VEBER, 2002; KELLER, 2006).

Diversas superfícies podem ser calculadas para uma molécula (Figura 22). Dentre elas, temos a superfície de área polar (PSA – Polar Surface Area).

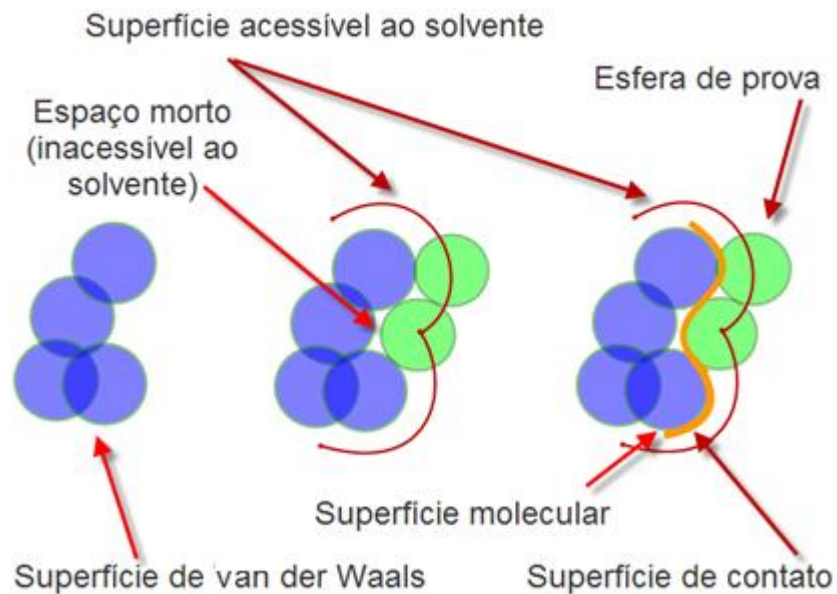


Figura 22. A superfície de Van der Waals corresponde ao contorno da superfície definidas pelos raios de van der Waals dos átomos. A superfície molecular é gerada rolando-se uma esfera de prova (geralmente de raio 1.4 Å, representando a molécula de água) sobre a superfície de van der Waals. O centro da esfera de prova traça a superfície acessível ao solvente (Adaptado de: LEACH, 2001).

PSA é definido como a soma das áreas de superfícies de van der Waals dos átomos polares (oxigênio e nitrogênio). Uma superfície polar menor do que 90 \AA^2 é referenciada como o limite máximo aproximado para que a molécula ultrapasse a barreira hemato-encefálica (WERMUTH, 2003)

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos dados de atividade antimicrobiana dos derivados pirazolo-piridina (1) e tieno-piridina (2)

A oxazolidinona linezolida (Zyvox®) é o fármaco de escolha na terapêutica de infecções hospitalares causadas por *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) (Figura 5). Entretanto, a toxicidade e casos emergentes de resistência, prolongam o tratamento, podendo torná-lo ineficaz (LOHRAY *et al.*, 2004). Estudos recentes mostram que a fusão da oxazolidinona com o anel tienopiridina resulta em derivados com atividade semelhante a linezolida em ensaios *in vitro* contra *S. aureus* (LOHRAY *et al.*, 2004).

A literatura descreve a presença do sistema pirazolo em inúmeros compostos com diferentes perfis de atividade biológica (Figura 23A) (KUMAR *et al.*, 2005). Como esse anel tem recebido muita atenção, os métodos de síntese vêm sendo aperfeiçoados. Um exemplo é o pirazolo(3,4-*d*)pirimidina, que apresenta atividade sobre *S. aureus* (Figura 23B) (ALI *et al.*, 2003).

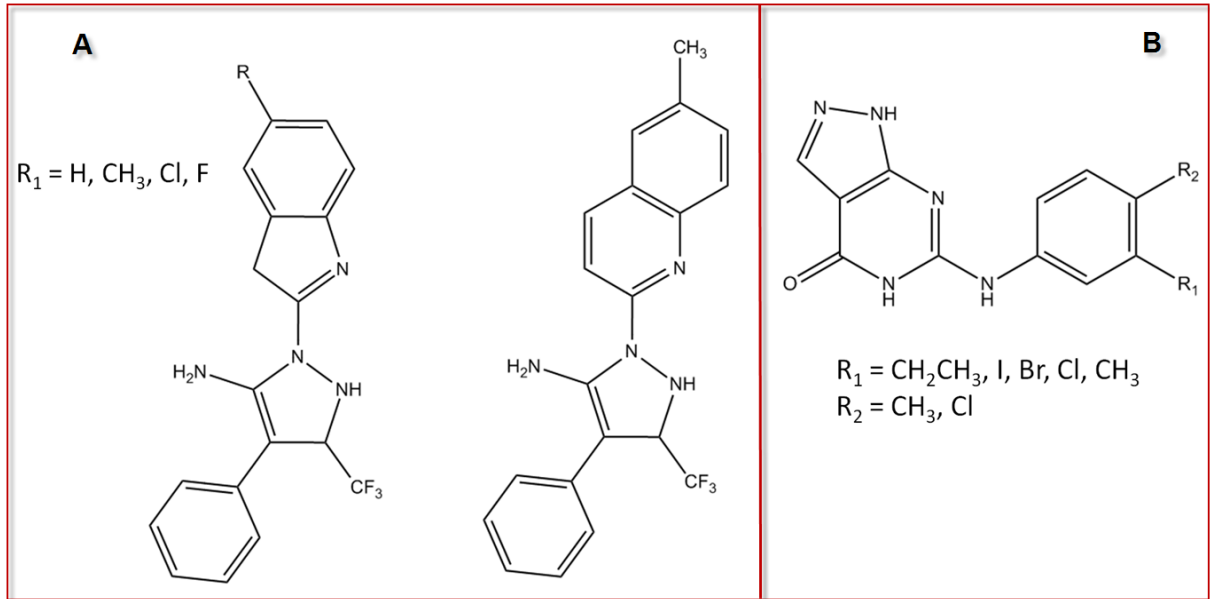


Figura 23 – Estruturas (A) dos derivados pirazol com diferentes atividades biológicas e (B) dos derivados pirazolo(3,4-*d*)pirimidina com atividade sobre *S. aureus*. Adaptado de: A (KUMAR *et al.*, 2005) e B (ALI *et al.*, 2003).

O grupo da professora Dr^a Alice Maria Rolim Bernardino do Laboratório de Síntese de Heterocíclicos (LASINHET) do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense sintetizou, com base na literatura, vários sistemas aromáticos heterocíclicos, obtendo derivados com diferentes perfis de atividades. Um exemplo mais recente refere-se a síntese de derivados benzo-pirazolo-naftiridina (BERNARDINO *et al.*, 2008) que apresentam atividade inibitória frente ao vírus HSV em culturas de células (Figura 24)

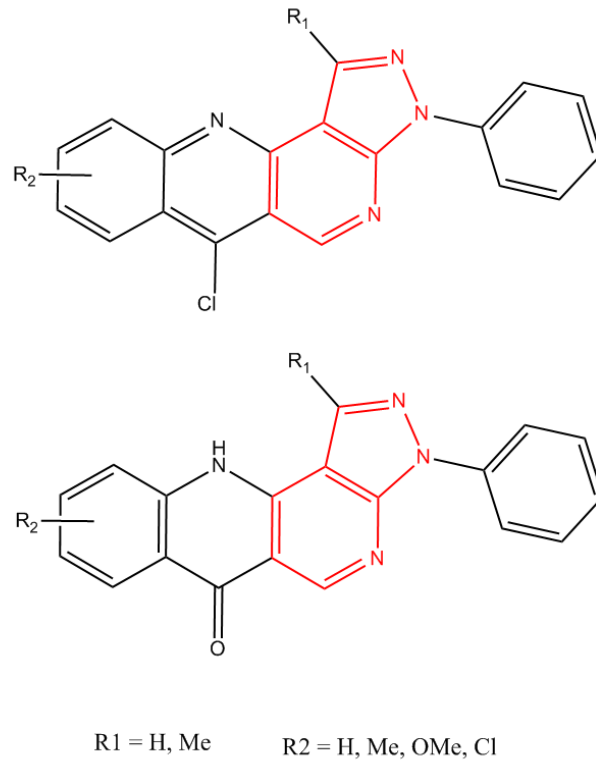
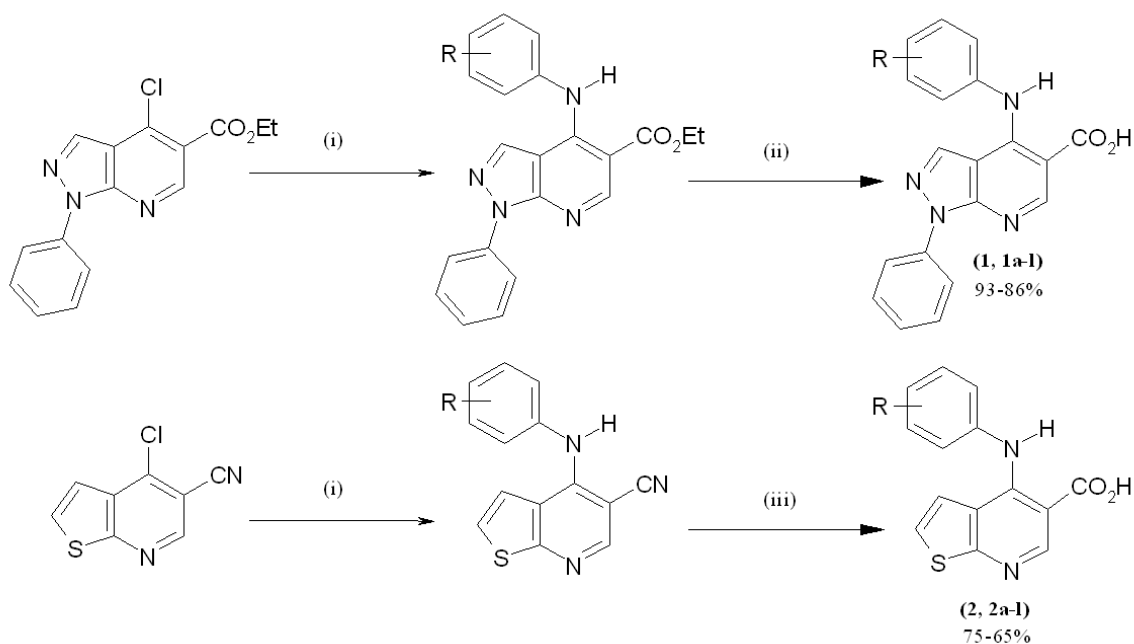


Figura 24. Estrutura de derivados 3*H*-benzo[*b*]pirazolo[3,4-*h*]-1,6-naftiridina com atividade antiviral anti-HSV). Em destaque (vermelho) os núcleos pirazolo-piridina. Adaptado de (BERNARDINO *et al.*, 2008).

Neste grupo foram sintetizadas duas séries de derivados heterocíclicos (Figura 25) – pirazolo-piridina (1) e tieno-piridina (2) – e testadas *in vitro* contra cocos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Serratia morcencens*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Klebsiella pneumoniae*) e Gram-positivos (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus epidermidis*). As cepas utilizadas são de bactérias resistentes, fornecidas pelo Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro.



(i) anilina, 140° C, 4h; (ii) NaOH 20%, refluxo, 3h; (iii) HCL 6N, refluxo, 24h

Figura 25 – Esquema de síntese dos derivados pirazolo-piridina (série 1) e tieno piridina (série 2).

A série dos derivados com o núcleo pirazolo-piridina possui seis compostos substituídos na posição *meta*; seis derivados substituídos na posição *para* (ambas as substituições no anel benzênico ligado ao grupo amino) e um derivado sem substituintes neste anel (R = H), totalizando treze derivados da série 1 (1, 1a-m) (Figura 26).

A segunda série corresponde aos derivados com sistema tieno-piridina e é composta por seis derivados substituídos na posição *meta*; seis derivados substituídos na posição *para* (ambas as substituições no anel benzênico ligado ao grupo amino) e um derivado não substituído neste anel (R = H), totalizando treze derivados da série 2 (2, 2a-m) (Figura 26).

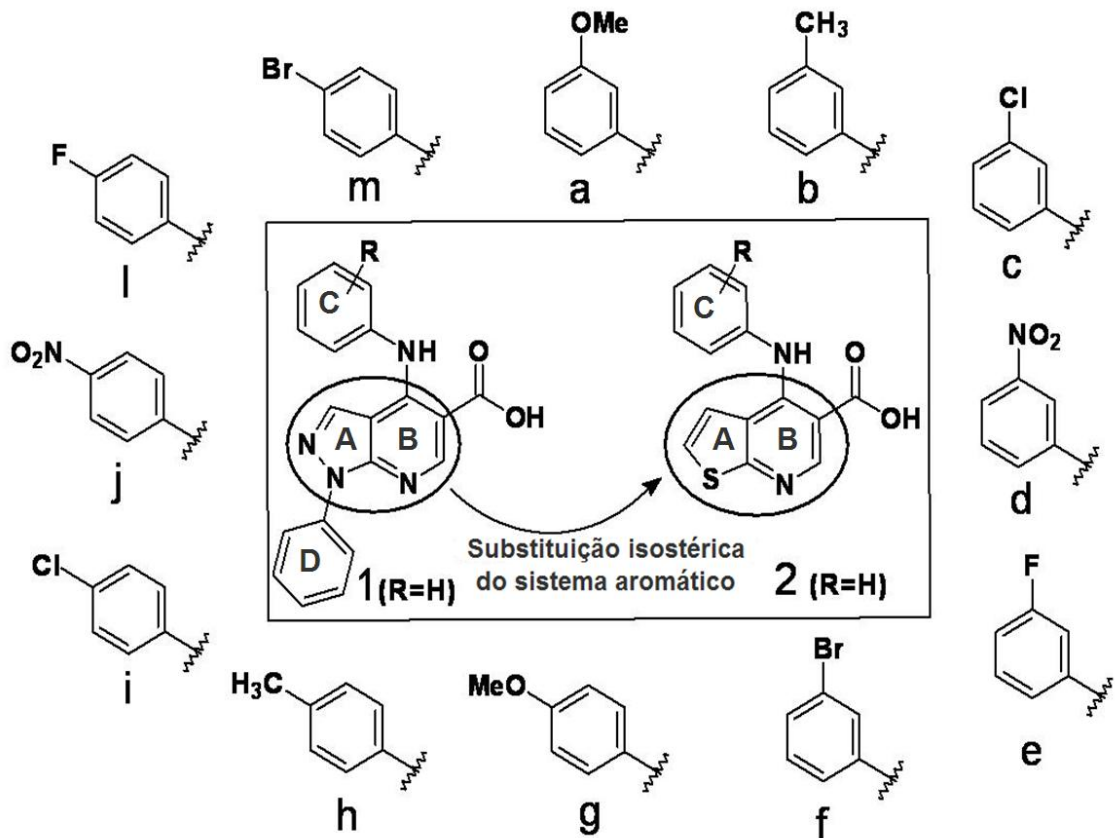


Figura 26. Esquema dos derivados pirazolo-piridina (1) e tieno-piridina (2). Em destaque, a substituição isostérica do sistema aromático pirazolo-piridina pelo sistema aromático tieno-piridina

Apresentam atividade contra *Staphylococcus epidermidis* os derivados **1a**, **1b**, **1c**, **1e** e **1f** (*m*-OCH₃, *m*-CH₃, *m*-Cl, *m*-F e *m*-Br, respectivamente) da série 1 (pirazolo-piridina). Os demais derivados da série 1 e todos os derivados da série 2 são inativos (Tabela 3). Deve-se ressaltar que não foi observada atividade antimicrobiana nos compostos quando ensaiados frente às outras cepas resistentes de bactérias gram positivas e negativas provenientes do Hospital Universitário Antônio Pedro, descritas anteriormente.

Utilizou-se como controle positivo neste estudo os seguintes fármacos: ampicilina, cloranfenicol, oxacilina, penicilina G e vancomicina.

Os testes de susceptibilidade das cepas bacterianas às substâncias foram efetuados pelo método de difusão qualitativo (OLIVEIRA, 2001) em concentração de 10 mg/mL. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

A concentração mínima inibitória (MIC – Minimal Inhibitory Concentration) foi determinada apenas para os derivados ativos pela técnica de difusão utilizando-se o método de macro-diluição. A concentração para cada derivado testado variou de 0,5 µg/mL a 1024 µg/mL. O MIC é definido como a menor concentração de cada derivado que impede o crescimento bacteriano visível. Todos os ensaios de MIC foram realizados em triplicata (OLIVEIRA, 2001).

Os ensaios de citotoxicidade em células sanguíneas periféricas mononucleares (PBMCs - Peripheral blood mononuclear cells), obtidas de doadores saudáveis, foram realizados em duplicata ao menos 3 vezes e resultaram em toxicidade nula para os derivados ativos da série **1** (**1a**, **1b**, **1c**, **1e** e **1f**). Foi utilizada uma concentração 15 vezes maior ao do MIC.

Tabela 3. Comparação entre o perfil antimicrobiano sobre *S. epidermidis* (Halo de inibição, concentração Mínima Inibitória - MIC - e citotoxicidade em células sanguíneas periféricas mononucleares - dos derivados pirazolo-piridina (1,1a-m) e tieno-piridina (2,2a-m)).

Derivado	R	Halo (mm)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	CC ^a (%)
1	H	0	ND ^b	91
1a	<i>m</i> -OCH ₃	15	16	100
1b	<i>m</i> -CH ₃	16	64	100
1c	<i>m</i> -Cl	17	16	100
1d	<i>m</i> -NO ₂	12	ND	100
1e	<i>m</i> -F	20	16	100
1f	<i>m</i> -Br	17	16	100
1g	<i>p</i> -OCH ₃	0	ND	100
1h	<i>p</i> -CH ₃	0	ND	100
1i	<i>p</i> -Cl	0	ND	100
1j	<i>p</i> -NO ₂	0	ND	88
1l	<i>p</i> -F	0	ND	100
1m	<i>p</i> -Br	10	ND	92
2	H	0	ND	100
2a	<i>m</i> -OCH ₃	0	ND	100
2b	<i>m</i> -CH ₃	0	ND	100
2c	<i>m</i> -Cl	0	ND	100
2d	<i>m</i> -NO ₂	0	ND	100
2e	<i>m</i> -F	0	ND	100
2f	<i>m</i> -Br	0	ND	100
2g	<i>p</i> -OCH ₃	0	ND	100
2h	<i>p</i> -CH ₃	0	ND	100
2i	<i>p</i> -Cl	0	ND	100
2j	<i>p</i> -NO ₂	0	ND	100
2l	<i>p</i> -F	0	ND	100
2m	<i>p</i> -Br	0	ND	100

^aCitotoxicidade é representada pela viabilidade celular (%) a 700 μM do composto

^bNão determinado (ND)

5.2. ANÁLISE CONFORMACIONAL DOS DERIVADOS PIRAZOLO-PIRIDINA (SÉRIE 1) E TIENO-PIRIDINA (SÉRIE 2)

As duas séries (pirazolo-piridina (1) e tieno-piridina (2)) foram submetidas ao estudo de modelagem molecular com o intuito de identificar as propriedades estereoeletrônicas que pudessem ser correlacionadas com a atividade biológica.

Numa primeira abordagem, utilizou-se a análise conformacional para avaliar a geometria dos derivados das duas séries. A série 1 (pirazolo-piridina) apresentou todos os substituintes *meta* do lado oposto ao núcleo pirazolo-piridina. A análise conformacional efetuada para os derivados *meta*-substituídos revelou um mínimo de energia global (conformação mais estável) quando o substituinte está distante do anel pirazol. Observando-se, por exemplo, o derivado **1e** (*m*-F), a análise conformacional resultou em 32 conformações e apresentou em média uma diferença de cerca de 10 kcal/mol (barreira rotacional) entre a conformação de menor e a de maior energia (Tabela 4). A ligação hidrogênio entre o átomo de oxigênio (O1) do grupo carboxila e o átomo de hidrogênio (H1) do grupo fenilamina (Figura 27) pode contribuir para a maior estabilidade (menor energia) desta conformação.

Existem diversos modos de classificar uma ligação hidrogênio. Tradicionalmente são definidos três tipos de ligação hidrogênio dependendo dos valores de energia associado a este tipo de ligação. Assim, ligações hidrogênio com energias entre -10,04 e -50,21 kJmol⁻¹ são definidas como fracas, aquelas com energias entre -50,21 e -100,42 kJmol⁻¹ são definidas como fortes e ligações hidrogênio com valores inferiores a -100,42 kJmol⁻¹ são consideradas muito fortes (ROZAS, 2007)

A distância entre o átomo de hidrogênio e o átomo aceptor da ligação também é utilizada como indicador da força da ligação e, assim, distâncias entre 1,2 a 1,5 Å são atribuídas a ligações hidrogênio muito fortes, distâncias entre 1,5 a 2,2 Å seriam encontradas nas ligações fortes e entre 2,0 a 3,0 Å corresponderiam as ligações fracas (ROZAS, 2007).

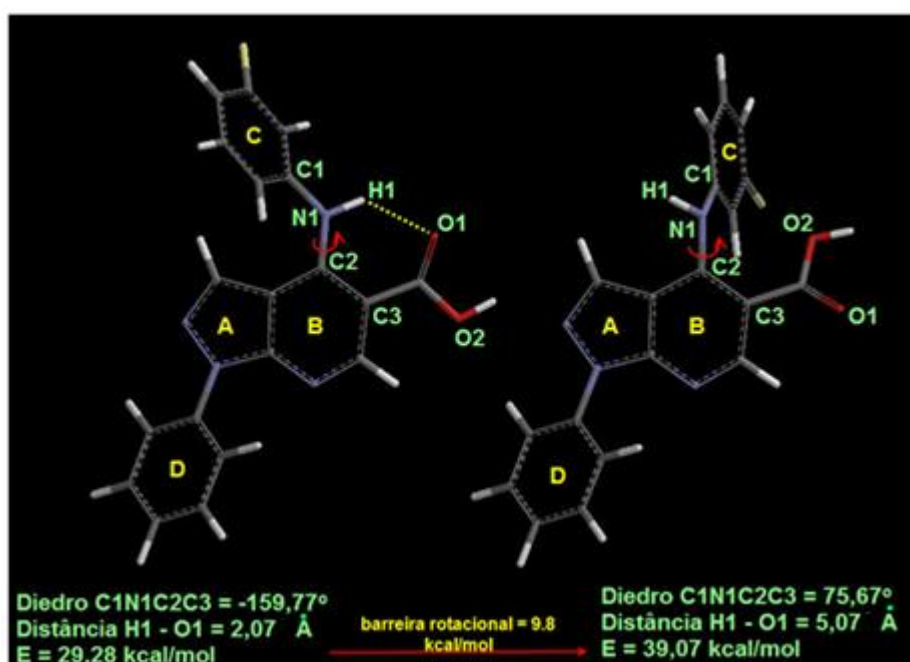


Figura 27. Comparação entre as conformações de menor (esquerda) e de maior (direita) energia para o derivado 1e (*m*-F) da série 1. A linha tracejada entre H1<---->O1 representa a ligação hidrogênio intramolecular.

A formação da ligação hidrogênio intramolecular favorece uma maior estabilidade da molécula e também restringe a liberdade conformacional em torno da rotação da ligação N1C2 do diedro C1N1C2C3. Os valores obtidos para a distância interatômica entre o átomo de hidrogênio H1 (do grupo amina) e o átomo de oxigênio O1 (do grupo carboxila) revelam que, com o aumento da distância, ocorre um aumento na energia relativa da molécula (Tabela 4).

Tabela 4. Distâncias interatômicas (Angstrom - Å) entre H1 e O1 e valores de energia das 32 conformações (C01-C32) obtidas por análise conformacional, pelo método AM1, para o derivado 1e (m-F) da série 1.

Conf. ^a #	E ^b (kcal/mol)	E rel. ^c (kcal/mol)	D H1O1 (Å)	Conf. ^a #	E ^b (kcal/mol)	E rel. ^c (kcal/mol)	D H1O1 (Å)
C01	29,28	0,00	2,07	C17	31,95	2,67	3,90
C02	29,36	0,08	2,07	C18	31,97	2,69	3,87
C03	29,41	0,13	2,07	C19	31,97	2,69	3,91
C04	29,45	0,17	2,07	C20	31,98	2,70	3,85
C05	31,72	2,44	3,88	C21	32,40	3,12	3,85
C06	31,72	2,44	3,88	C22	32,40	3,12	3,89
C07	31,75	2,47	3,91	C23	32,41	3,13	3,89
C08	31,76	2,48	3,91	C24	36,98	7,70	3,94
C09	31,78	2,50	3,87	C25	36,98	7,70	3,94
C10	31,81	2,53	3,89	C26	36,99	7,71	3,94
C11	31,82	2,54	3,90	C27	37,00	7,72	3,94
C12	31,82	2,54	3,88	C28	37,10	7,82	5,13
C13	31,84	2,56	3,89	C29	37,12	7,84	5,13
C14	31,84	2,56	3,88	C30	37,50	8,22	5,14
C15	31,92	2,64	3,88	C31	37,53	8,25	5,15
C16	31,94	2,66	3,91	C32	39,07	9,79	5,07

a) Conf. = número da conformação; b) E = energia; c) E rel. = diferença de energia em relação à conformação C01; d) D H1O1 = distância interatômica entre H1 e O1

As conformações C01 (de menor energia), C02, C03 e C04 apresentam, praticamente, a mesma distância interatômica entre o átomo de hidrogênio H1 e o átomo de oxigênio O1 (H1<---->O1) e todas apresentam ligação hidrogênio intramolecular. Nas demais conformações não foram observadas ligação hidrogênio (Tabela 4 e Figura 28).

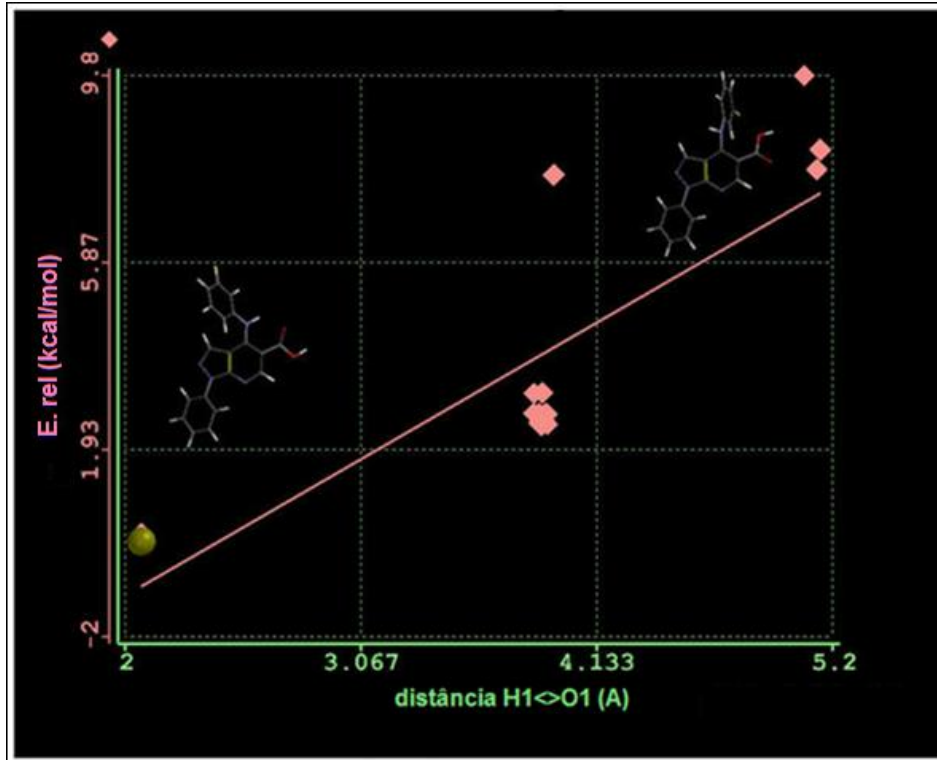
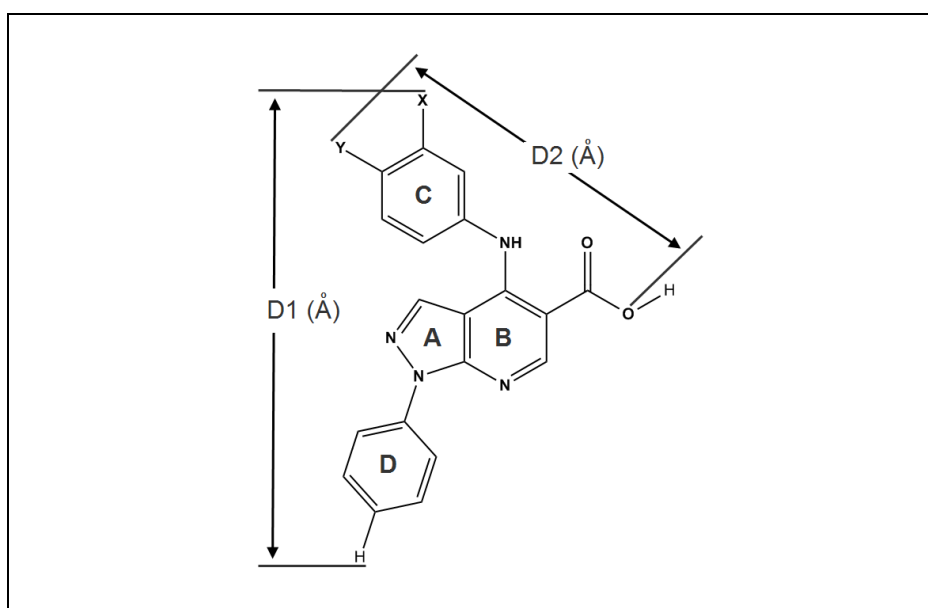


Figura 28. Gráfico de energia relativa em função da distância interatômica entre H1 e O1. A esfera no gráfico representa a conformação de menor energia (C01) (maior estabilidade) obtida pela análise conformacional do derivado 1e da série 1.

Os derivados ativos da série 1, isto é, derivados **1a**, **1b**, **1c**, **1e** e **1f**, são todos substituídos na posição *meta* no anel C, enquanto que nesta mesma série, os derivados com os mesmos grupos substituintes na posição *para* do anel C foram inativos, desta forma, foram realizadas medidas de distâncias interatômicas entre o substituinte na posição *meta* do anel C e o átomo de hidrogênio (na posição *para*) do anel fenila (anel D) (distância D1) e entre o substituinte na posição *para* do anel C e o átomo de oxigênio do grupo carboxílico (distância D2) visando propor um farmacóforo preliminar. Foi avaliada também a área CPK (Å²) da série 1 (Tabela 5).

Tabela 5. Distâncias interatômicas D1 e D2 (Å) e área CPK (Å²) da série 1 realizadas para a conformação mais estável de cada composto.



Derivado	X	Y	D1 (Å)	D2 (Å)	Área CPK (Å ²)
1	H	H	13,04	9,50	337,92
1a	OCH ₃	H	13,32	9,49	367,52
1b	CH ₃	H	13,30	9,51	357,86
1c	Cl	H	13,60	9,49	352,82
1d	NO ₂	H	13,50	9,46	363,57
1e	F	H	13,40	9,44	344,36
1f	Br	H	13,72	9,48	357,60
1g	H	OCH ₃	12,70	9,84	368,78
1h	H	CH ₃	12,65	9,96	358,71
1i	H	Cl	13,08	10,06	353,63
1j	H	NO ₂	13,44	9,68	363,61
1l	H	F	13,07	9,74	343,89
1m	H	Br	13,20	10,26	357,96

As medidas de distâncias interatômicas D1 e D2 foram feitas considerando o átomo pesado diretamente ligado ao anel fenila (anel C). Os derivados *meta*-substituídos apresentaram uma distância média D1 igual a 13,47 Å e

uma distância média D2 igual a 9,48 Å. Os mesmos substituintes na posição *para* do anel C revelaram uma distância média D1 igual a 13,02 Å e uma distância média D2 igual a 9,92 Å. O decréscimo em D1 é em média 0,45 Å e o acréscimo em D2 é em média de 0,44 Å. A área CPK (Corey-Pauling-Kotton) aumenta para todos os derivados substituídos na posição *para* do anel C em média 0,47 Å². Estes dados mostram que não existe uma diferença significativa das distâncias (D1 e D2) calculadas e as áreas CPK para os derivados *meta* e *para* substituídos que justifiquem o perfil de atividade apresentado.

A análise conformacional efetuada para a série 2, revelou que os derivados *meta*-substituídos, diferente da série 1, apresentam as conformações mais estáveis quando os substituintes em *meta* estão localizados próximos ao sistema tieno-piridina. Esta conformação também é favorecida pela presença de uma ligação hidrogênio intramolecular entre o átomo de hidrogênio da amina (H1) e o átomo de oxigênio do grupo carboxila (O1) (Figura 29) e apresentou uma barreira rotacional de 9,9 kcal/mol (conformação mais estável).

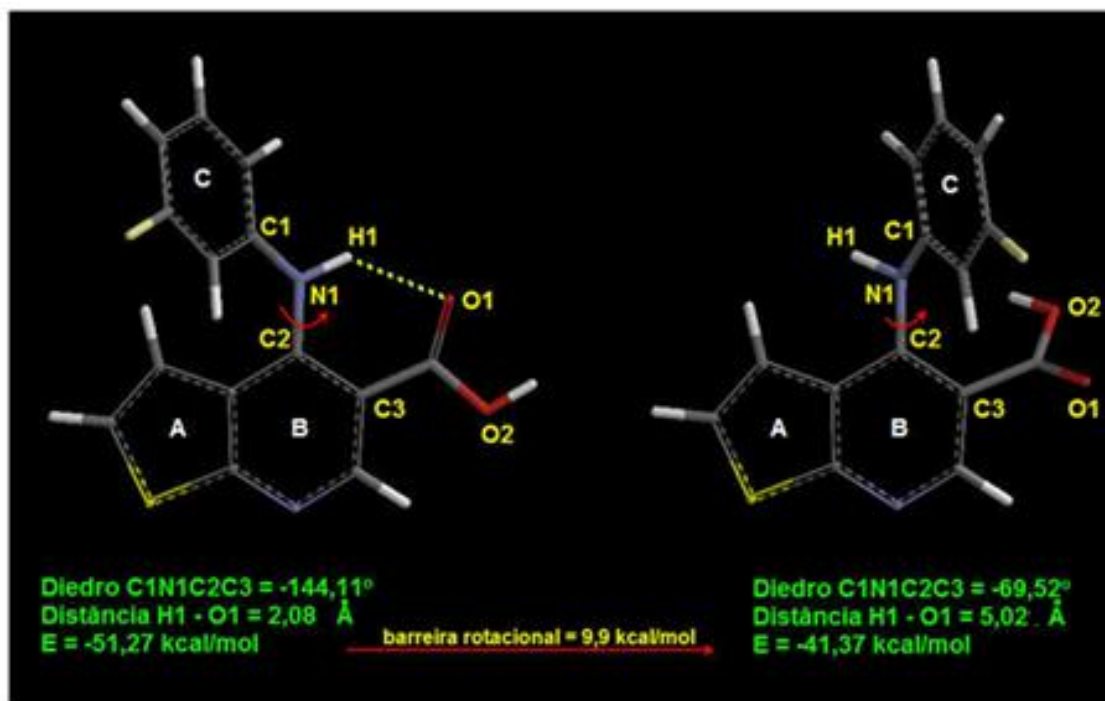


Figura 29. Comparação entre as conformações de menor (esquerda) e de maior (direita) energia para o derivado 2e (*meta*-F) da série 2. A linha tracejada entre H1<---->O1 representa a ligação hidrogênio intramolecular.

Tabela 6. Distâncias interatômicas entre H1 e O1 e valores de energia das 22 conformações (C01-C22) obtidas por análise conformacional, pelo método AM1, para o derivado 2e (*m*-F) da série 2.

Conf. ^a #	E ^b (kcal/mol)	E rel. ^c (kcal/mol)	D H1O1 ^d (Å)	Conf. ^a #	E ^b (kcal/mol)	E rel. ^c (kcal/mol)	D H1O1 ^d (Å)
C01	-51,27	0,00	2,08	C12	-44,83	6,44	3,92
C02	-51,26	0,01	2,08	C13	-44,79	6,48	3,92
C03	-49,02	2,25	3,89	C14	-44,79	6,48	3,92
C04	-48,95	2,32	3,89	C15	-44,71	6,56	5,08
C05	-48,92	2,35	3,92	C16	-44,28	6,99	5,10
C06	-48,90	2,37	3,90	C17	-42,37	8,90	3,37
C07	-48,90	2,37	3,88	C18	-42,36	8,91	3,38
C08	-45,47	5,80	2,12	C19	-42,32	8,95	3,37
C09	-45,36	5,91	2,13	C20	-42,31	8,96	3,38
C10	-44,85	6,42	2,15	C21	-41,88	9,39	5,02
C11	-44,84	6,43	2,15	C22	-41,37	9,90	5,02

a) Conf. = número da conformação; b) E = energia; c) E rel. = diferença de energia em relação à conformação C01; d) D H1O1 = distância interatômica entre H1 e O1

Observando-se a Tabela 6, as conformações identificadas como C08, C09, C10 e C11 podem, em função das distâncias interatômicas H1-O1, formar ligações hidrogênio. Entretanto, estas conformações apresentam maior energia, provavelmente devido à interação estérica entre o átomo de hidrogênio da hidroxila do grupo carboxila e o átomo de hidrogênio do anel piridina (anel B) (Figura 30).

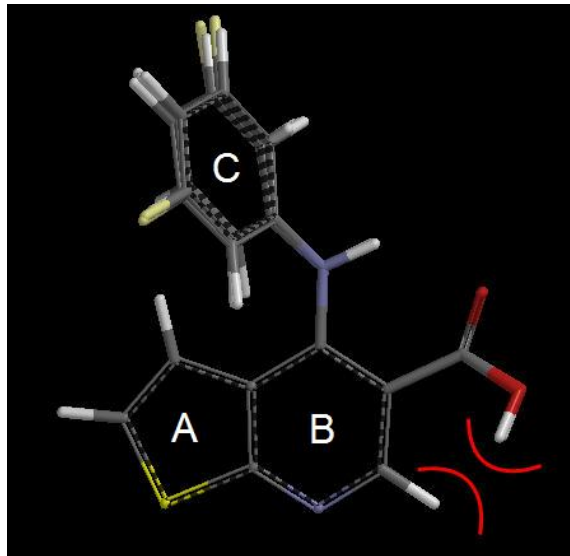


Figura 30. Sobreposição entre as conformações C08, C09, C10 e C11 do derivado 2e (*m*-F) da série 2. O símbolo) representa a interação estérica mencionada no texto.

Estes resultados são reforçados pela análise das conformações C03 a C07, que apresentam energia menor do que as conformações C08 a C11, formando ligações hidrogênio, não com o átomo de oxigênio da carboxila (O1), mas com o átomo de oxigênio da hidroxila (O2) e sem o fator estérico observado nas conformações C08 a C11; resultando em maior estabilidade (Figura 31). As conformações C01 e C02 são praticamente idênticas entre si e apresentam a menor energia (maior estabilidade) entre as conformações pesquisadas. A ligação hidrogênio nestas conformações ocorre entre o átomo de hidrogênio da amina (H1) e o átomo de oxigênio do grupo carboxila (O1) (Figuras 29 e 32).

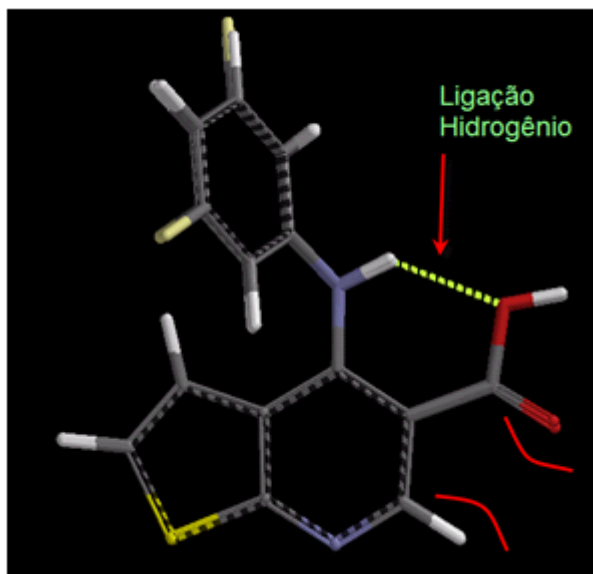


Figura 31. Sobreposição entre os confôrmeros C03, C04, C05, C06 e C07 do derivado 2e (*m*-F) da série 2, mostrando a ligação hidrogênio entre H1 \leftrightarrow O2.

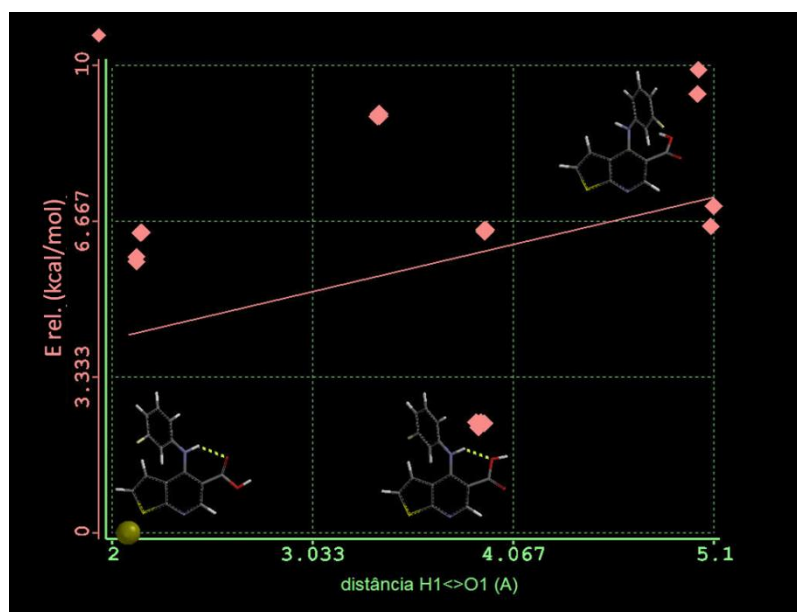
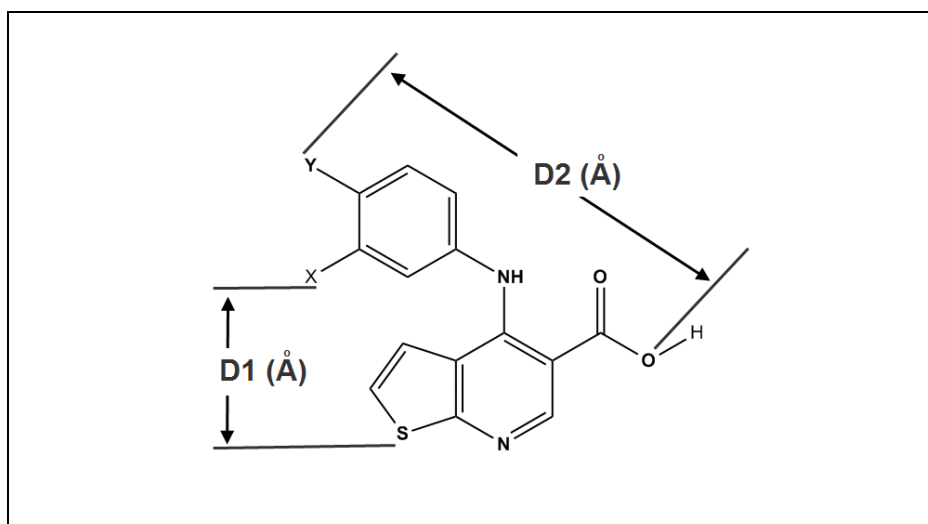


Figura 32. Gráfico de energia relativa em função da distância interatômica H1 \leftrightarrow O1. A esfera no gráfico representa a conformação de menor energia (C01) (maior estabilidade) obtida pela análise conformacional do derivado 2e da série 2.

Foram realizadas também as medidas D1 e D2 para a série 2. Neste caso, a distância D1 foi efetuada entre o átomo do substituinte em *meta* diretamente ligado

ao anel C e o átomo de enxofre do sistema tieno-piridina (**2**). Foi também avaliada a área CPK (Å²) (Tabela 7), conforme realizado para a série **1**.

Tabela 7. Distâncias interatômicas D1 e D2 (Å) e área CPK (Å²) da série 2.



Derivado	X	Y	D1 (Å)	D2 (Å)	CPK Area (Å ²)
2	H	H	4,53	9,31	262,88
2a	OCH ₃	H	6,45	9,29	292,73
2b	CH ₃	H	6,43	9,32	282,84
2c	Cl	H	6,76	9,24	279,24
2d	NO ₂	H	6,31	9,19	288,69
2e	F	H	6,62	9,25	269,32
2f	Br	H	6,79	9,24	283,80
2g	H	OCH ₃	8,24	9,63	294,01
2h	H	CH ₃	8,31	9,75	284,09
2i	H	Cl	8,44	9,92	279,46
2j	H	NO ₂	8,54	9,45	288,84
2l	H	F	8,31	9,54	269,80
2m	H	Br	8,45	10,06	284,00

Os derivados *meta*-substituídos apresentaram uma distância média D1 igual a 6,56 Å (aproximadamente 51% menor do que a mesma distância média determinada para os derivados pirazolo-piridina com os mesmos substituintes) e uma distância média D2 igual a 9,26 Å (muito próximo dos valores determinados para a série 1).

Os mesmos substituintes na posição *para* do anel C geraram uma distância média D1 igual a 8,38 Å (aproximadamente 35% menor do que a distância média determinada para os derivados com os mesmos substituintes na série 1) e distância média D2 igual a 9,73 Å. A área CPK (Corey-Pauling-Kotton) aumenta para todos os derivados da série 2 substituídos na posição *para* do anel C. Entretanto, todos os derivados desta série apresentam uma área CPK média 283,06 Å², cerca de 15% menor que a área CPK média dos derivados da série 1 (327,63 Å²).

Estes resultados mostram que as distâncias D1 e D2 são diferentes para as duas séries (1 e 2). Os derivados da série 1 possuem distâncias maiores para D1 e D2 quando comparados com a série 2, cujos derivados foram todos inativos. Assim, podemos sugerir que são necessárias distâncias D1 e D2 adequadas entre os grupos assinalados nos derivados avaliados para que ocorra uma interação com o sítio receptor. Entretanto, outros fatores estéricos e eletrônicos devem ser igualmente importantes, considerando que o derivado *m*-nitro e todos os compostos na posição *para* da série 1 foram inativos.

Assim, a partir das conformações mais estáveis, buscou-se observar se existiam outros fatores estéricos que pudessem influenciar o perfil de atividade dos derivados da série 1 e da série 2. A comparação do alinhamento estrutural dos derivados mais ativos da série 1 (**1a**, **1b**, **1c**, **1e** e **1f**) com outros derivados substituídos da mesma série, na posição *para*, sugerem um impedimento estérico quando os substituintes estão localizados nas posições *para* do anel fenila (anel C), provavelmente criando uma zona de restrição estérica (vermelho) que pode impedir um perfeito encaixe com o sítio receptor (LEAL *et al*, 2008 – DOI [10.1016/j.bmc.2008.07.035](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.035)) (Figura 33).

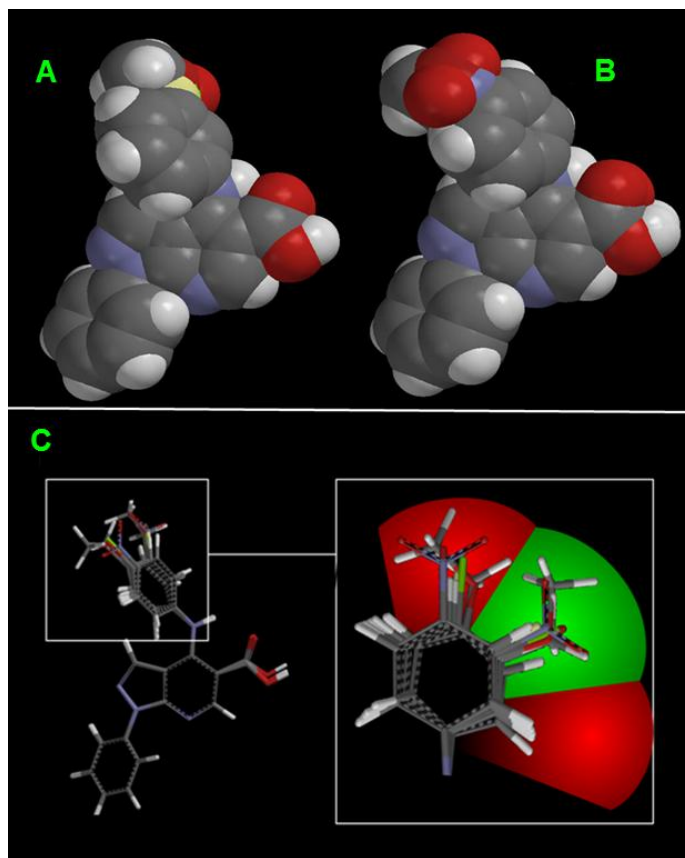


Figura 33. Sobreposição (A) derivados *meta* (1a-f); (B) derivados *para* (1g-m) da série 1 em modelo CPK ; (C) sobreposição dos derivados (1, 1a-m). No detalhe, o anel C com a zona de impedimento estérico (restrição estérica) (vermelho) (LEAL *et al*, 2008 – DOI [10.1016/j.bmc.2008.07.035](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.035)).

5.3 PROPRIEDADES ELETRÔNICAS

5.3.1 CÁLCULOS DE ENERGIA DE HOMO (E_{HOMO}), ENERGIA DE LUMO (E_{LUMO}) E MOMENTO DE DIPOLO DOS DERIVADOS PIRAZOLO-PIRIDINA E TIENO-PIRIDINA

Foi realizado um estudo global dos parâmetros teóricos para os derivados das duas séries (pirazolo-piridina e tieno-piridina) que pudessem ser correlacionadas com a atividade biológica. Calculou-se as energias de HOMO e LUMO (E_{HOMO} e E_{LUMO}) e momento de dipolo de todos os derivados (Tabela 8).

Os dados obtidos revelam que todos os derivados da série 2 (**2, 2a-m**) apresentam valores de lipofilicidade inferiores aos respectivos derivados da série 1 (**1, 1a-m**). Como era de se esperar, a ausência do anel fenila (anel D) na série de derivados tieno-piridina contribui para a redução da lipofilicidade.

Tabela 8. Comparação dos parâmetros teóricos calculados por DFT e base 6-31G* (E_{HOMO} , E_{LUMO} e momento de Dipolo) para os derivados da série 1 (1,1a-m) e série 2 (2,2a-m).

Derivado	R	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	Dipolo (debye)
1	H	-5,82	-1,50	1,33
1a	<i>m</i> -OCH ₃	-5,78	-1,47	2,45
1b	<i>m</i> -CH ₃	-5,78	-1,45	1,73
1c	<i>m</i> -Cl	-5,96	-1,67	1,20
1d	<i>m</i> -NO ₂	-6,17	-2,43	4,51
1e	<i>m</i> -F	-5,94	-1,70	1,18
1f	<i>m</i> -Br	-5,97	-1,68	1,27
1g	<i>p</i> -OCH ₃	-5,69	-1,29	2,50
1h	<i>p</i> -CH ₃	-5,76	-1,32	2,23
1i	<i>p</i> -Cl	-5,87	-1,47	1,73
1j	<i>p</i> -NO ₂	-6,26	-2,41	5,52
1l	<i>p</i> -F	-5,86	-1,58	0,72
1m	<i>p</i> -Br	-5,91	-1,77	1,22
2	H	-5,78	-1,56	2,89
2a	<i>m</i> -OCH ₃	-5,69	-1,60	1,82
2b	<i>m</i> -CH ₃	-5,74	-1,52	3,12
2c	<i>m</i> -Cl	-5,88	-1,59	2,93
2d	<i>m</i> -NO ₂	-6,21	-2,33	4,45
2e	<i>m</i> -F	-5,84	-1,55	2,79
2f	<i>m</i> -Br	-5,89	-1,60	2,93
2g	<i>p</i> -OCH ₃	-5,54	-1,29	3,83
2h	<i>p</i> -CH ₃	-5,65	-1,35	3,55
2i	<i>p</i> -Cl	-5,85	-1,58	1,36
2j	<i>p</i> -NO ₂	-6,34	-2,35	4,04
2l	<i>p</i> -F	-5,79	-1,46	1,93
2m	<i>p</i> -Br	-5,86	-1,60	1,32

As energias de **HOMO**, um acrônimo para *Highest Occupied Molecular Orbital* (Orbital Molecular de mais Alta Energia Ocupado) e **LUMO**, um acrônimo para *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (Orbital Molecular mais Baixa Energia Desocupado) são descritores quanto-mecânicos muito utilizados na área de planejamento de fármacos (KARELSON, 1996).

De acordo com a teoria dos orbitais moleculares, a formação de um estado de transição é devido a interação dos orbitais de fronteira (HOMO e LUMO) das espécies reagentes (ANSLYN, 2004).

A energia do HOMO está diretamente relacionada ao potencial de ionização e caracteriza a habilidade da molécula em realizar um ataque nucleofílico. A energia do LUMO está diretamente relacionada com a afinidade por elétrons e caracteriza a susceptibilidade da molécula em sofrer um ataque nucleofílico. A diferença entre as energias HOMO e LUMO (HOMO-LUMO) é um importante indicador de estabilidade da molécula. Uma grande diferença entre as energias HOMO-LUMO implica em uma maior estabilidade da molécula no sentido de uma menor reatividade frente a reações químicas (ANSLYN, 2004).

Não se observou correlação entre os dados obtidos para as energias de HOMO, LUMO e momento de dipolo e a atividade antibacteriana observada para os derivados de ambas as séries.

5.3.2 MAPAS DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO

O mapa de potencial eletrostático molecular pode ser uma abordagem alternativa com o intuito de compreender a contribuição eletrostática destes derivados para a atividade, visto que os parâmetros eletrônicos são um dos principais fatores que governam a interação fármaco-receptor.

O potencial eletrostático molecular, ϵ_p , é definido como a energia de interação entre um átomo de prova carregado positivamente com uma molécula e

representa um balanço entre as interações de repulsão com os núcleos dos átomos carregados positivamente e as interações de atração com os elétrons carregados negativamente (HEHRE, 2003).

As regiões de uma superfície na qual o potencial eletrostático é negativo delineiam locais na molécula que são passíveis de interagir com áreas positivas de outra molécula (receptor), caracterizando o que a literatura descreve como complementariedade eletrônica, isto pode ser observado no plano acima e abaixo do anel da molécula do benzeno e próximo ao átomo de nitrogênio da molécula de piridina, onde são observadas uma maior densidade eletrônica (Figura 34).

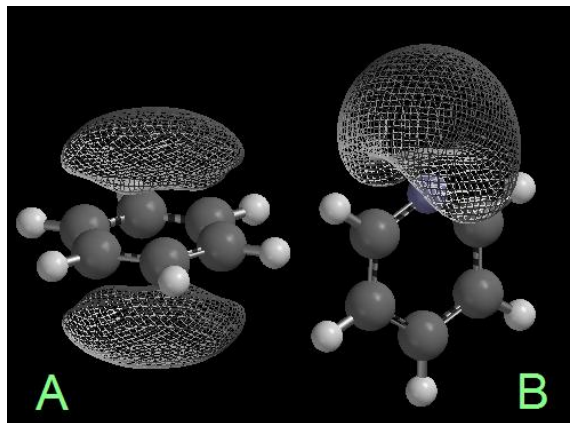


Figura 34. Potencial eletrostático da molécula de benzeno (A) e piridina (B).

A superfície de potencial eletrostática não leva em consideração a energia de redistribuição eletrônica (a energia de “polarização”). Isto conduz a falhas no modelo e é solucionado considerando-se explicitamente a energia de polarização na equação de obtenção do potencial eletrostático. O potencial de polarização fornece a energia originada pela reorganização eletrônica da molécula como resultado da interação com a carga positiva. A soma dos potenciais eletrostático e de

polarização fornecem uma melhor descrição da interação da carga positiva com a molécula (HEHRE, 2003).

Um terceiro descritor, o potencial de ionização local, indica a facilidade relativa com que um elétron pode ser removido (ionização) de qualquer ponto na molécula.

Estes descritores podem ser expressos como funções de coordenadas tridimensionais (x,y,z). Um modo de visualizá-los numa tela de vídeo ou página de papel bidimensional é definir um valor de superfície constante também conhecido por “superfície de densidade eletrônica constante” ou “*isosurface*” (Equação 10) (HEHRE, 2003).

$$f(x, y, z) = C$$

Equação 10

O valor da constante (C) pode ser escolhido para refletir uma propriedade física específica, por exemplo, o “tamanho” de uma molécula no caso da superfície de densidade eletrônica. Assim, uma superfície de densidade eletrônica com $C = 0,1$ e/ua³ fornece, praticamente, a mesma informação obtida com o desenho bidimensional da molécula (Figura 35).

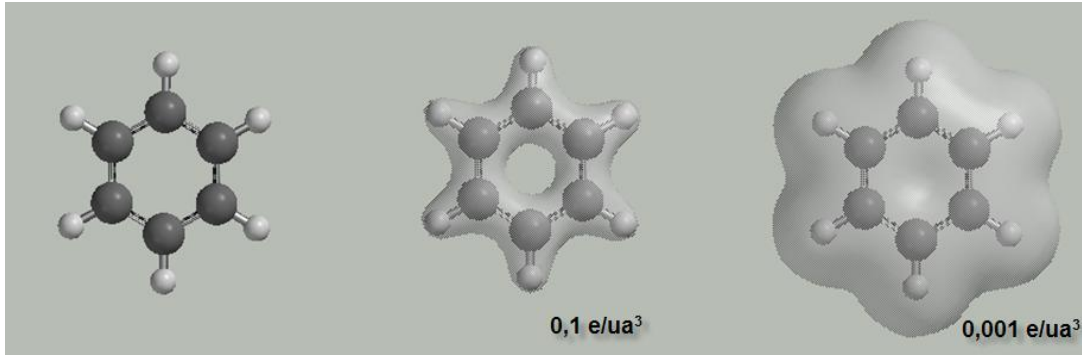


Figura 35. Molécula do benzeno visualizada sem aplicação da superfície de densidade eletrônica (esquerda); com superfície de densidade eletrônica e valor “isosurface (C)” de $0,1 \text{ e/ua}^3$ (centro) e $0,001 \text{ e/ua}^3$ (direita).

Uma informação (uma “propriedade”) pode ser adicionada a qualquer *isosurface* utilizando-se cores para representar valores da propriedade. Cores num extremo do espectro visível representariam valores menores da propriedade, e cores no outro extremo, valores maiores da propriedade mapeada sobre a superfície. Por exemplo, o valor do potencial eletrostático mapeado sobre uma superfície de densidade eletrônica constante pode ser empregado para distinguir regiões ricas e deficientes em elétrons mostradas em cores diferentes (em geral, no caso do mapa de potencial eletrostático, a cor vermelha indica alta densidade eletrônica e a cor azul indica baixa densidade eletrônica (HENRE, 2003).

O mapa de potencial eletrostático nos fornece regiões de uma superfície particular, comumente uma superfície de densidade eletrônica correspondente ao tamanho da molécula. A construção do mapa de potencial eletrostático envolve:

- a) A construção da superfície de densidade eletrônica da molécula;
- b) A construção da superfície de potencial eletrostático;
- c) A aplicação de cores a superfície obtida para designar valores de potencial (Figura 36).

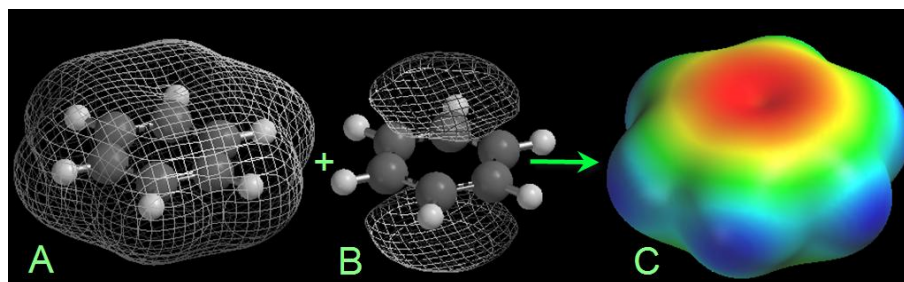


Figura 36. Superfície de densidade eletrônica total do benzeno (A); superfície de potencial eletrostáticos do benzeno (B) e mapa de potencial eletrostático do benzeno (C).

Neste exemplo, cores próximas ao vermelho indicam valores extremos de potencial negativo, enquanto que cores próximas ao azul escuro representam valores extremos de potencial positivo (cores laranja, amarela, verde e azul claro representam valores de potencial intermediário). Os valores são indicados em kcal/mol.

O mapa de potencial eletrostático para os derivados da série 1 é mostrado na Figura 37.

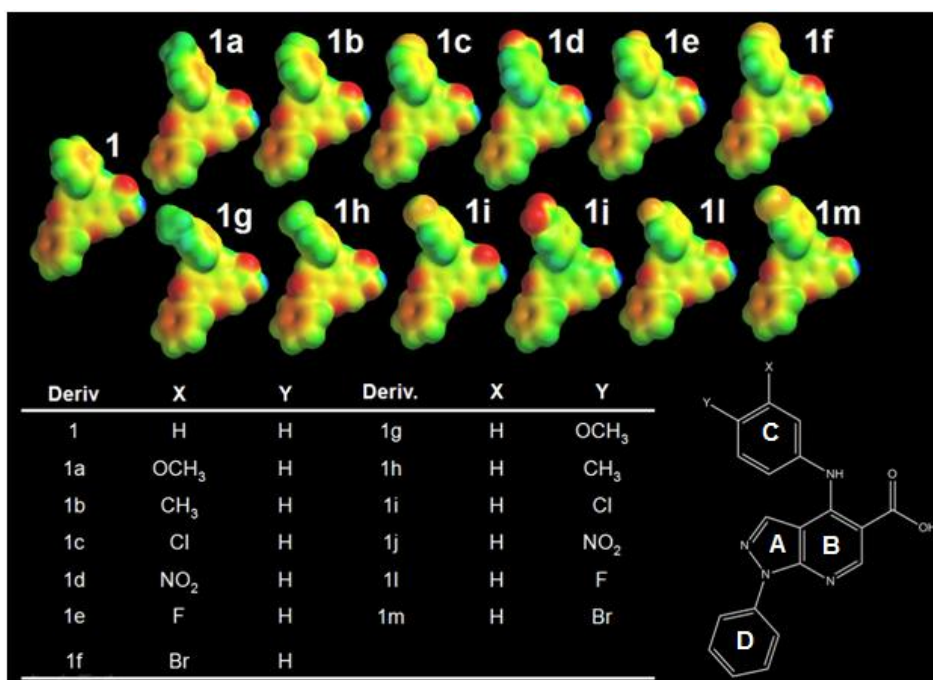


Figura 37. Mapa de potencial eletrostático dos derivados da série 1 (1, 1a-m) sobre uma *isosurface* de 0,002 eV/ua³ e faixa de -25 a +55 kcal/mol.

Os mapas de potencial eletrostático da série 1 sugerem que a densidade eletrônica está concentrada sobre o sistema fenil-pirazol (anéis A e D) e anel C e, aparentemente, influencia o perfil de atividade biológica.

Os derivados **1a**, **1c**, **1e** e **1f** com substituintes contendo átomos eletronegativos (metoxila, cloro, flúor e bromo, respectivamente) apresentaram melhor atividade antibacteriana do que o derivado **1b**, que apresenta um grupo metila como substituinte, que tem baixa contribuição eletrônica sobre o anel fenila (anel C). Isto pode sugerir a menor atividade biológica em função da ausência de interações importantes com o receptor quando comparados com os outros substituintes (LEAL *et al*, 2008 – DOI [10.1016/j.bmc.2008.07.035](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.035)).

O derivado **1d** (*m*-NO₂) apresentou um perfil eletrônico completamente diferente dos outros derivados. O grupo nitro é um forte grupo retirador de elétrons (**1d** e **1j**) e reduziu drasticamente a densidade eletrônica no anel fenila (anel C) e do sistema pirazolo-piridina, o que poderia explicar a reduzida atividade biológica do derivado **1d** apesar de ser *meta*-substituído.

Comparado os derivados ativos da serie 1 *meta*-substituídos (**1a**, **1b**, **1c**, **1e** e **1f**) com os derivados inativos apresentando os mesmos grupos substituintes na posição *para* do anel C (**1g**, **1h**, **1i**, **1l** e **1m**), não se observou alterações significativas da densidade eletrônica do anel C (Figura 37)

A série 2 (**2**, **2a-m**), também teve seu mapa de potencial eletrostático analisado com o objetivo de obter algum dado eletrônico que pudesse ser correlacionado com a ausência de atividade destes derivados (Figura 38).

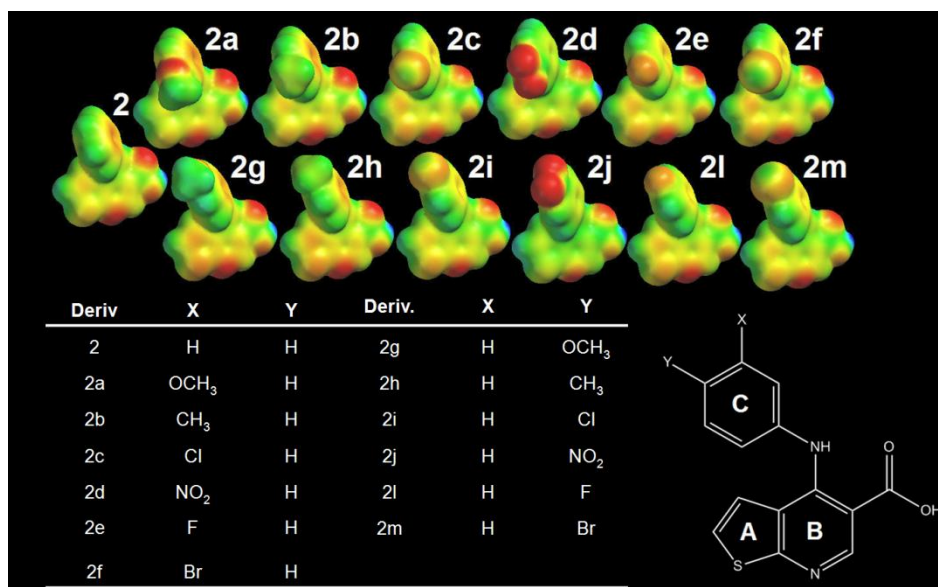


Figura 38. Mapa de potencial eletrostático dos derivados (2, 2a-m) da série 2 sobre uma *isosurface* de 0,002 eV/ua³ e faixa de -25 a +55 kcal/mol.

A série 2 inativa apresentou, aparentemente, as mesmas densidades eletrônicas sobre o anel fenila substituído (anel C), quando comparados aos mesmos derivados com os mesmos substituintes na série 1. Entretanto, as densidades eletrônicas ao longo do sistema tieno-piridina são aparentemente menores quando comparadas com o sistema pirazolo-piridina (Figura 38).

Foi observado também que o grupo nitro presente nos derivados **2d** e **2j** (*m*-NO₂ e *p*-NO₂, respectivamente) alterou totalmente o perfil eletrônico, reduzindo a densidade eletrônica tanto no anel C como no sistema tieno-piridina.

Correlacionando-se os mapas de potencial eletrostático dos derivados da série 1 e 2, observamos uma maior densidade eletrônica localizada sobre o sistema pirazolo-piridina (vide Figuras 37 e 38). Isto pode explicar em parte, o maior perfil de atividade para a série 1.

5.3.3. MAPAS DE DENSIDADE HOMO

O mapa de densidade de HOMO codificado sobre uma superfície de van der Waals, variando de vermelho (baixo valor de HOMO) à azul (alto valor de HOMO), dos derivados da série 1 (**1**, **1a-m**) pode ser observado na Figura 39.

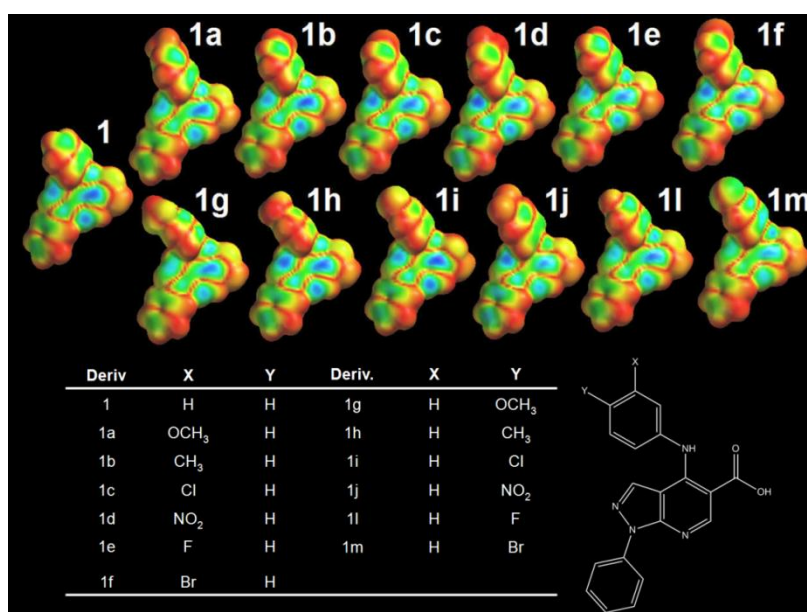


Figura 39. Mapa de densidade de HOMO dos derivados da série 1 (**1**, **1a-m**) codificado sobre uma *isosurface* de 0,002 eV/ua³.

A análise da densidade de HOMO revelou uma maior concentração sobre o sistema pirazolo-piridina que pode ser susceptível a interação com regiões de baixa densidade eletrônica do sítio receptor via interação do tipo π - π *stacking*.

O mapa de densidade HOMO da série 2 também foi calculado e está descrito na Figura 40.

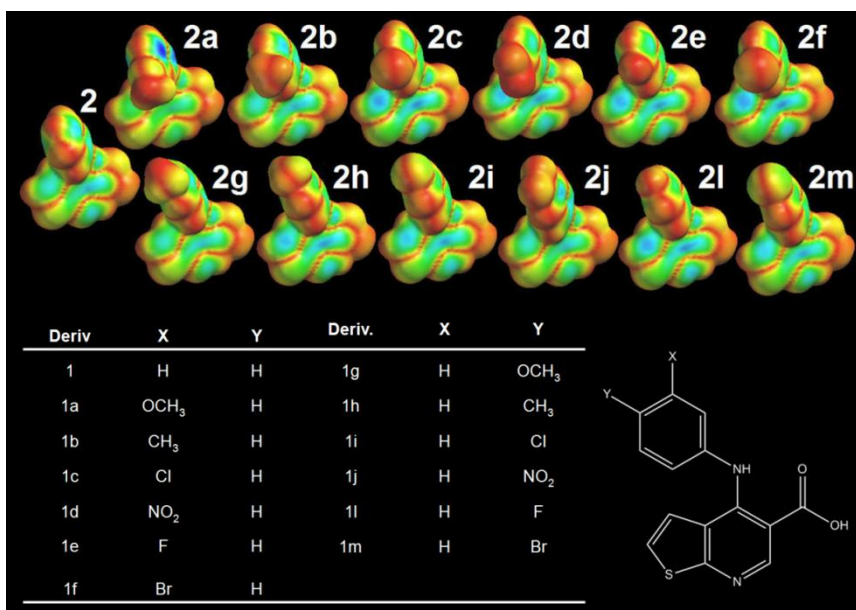


Figura 40. Mapa de densidade de HOMO dos derivados da série 2 (**2**, **2a-m**) codificado sobre uma *isosurface* de 0,002 eV/ua³.

A série 2 apresentou uma baixa densidade de HOMO localizada sobre o sistema tieno-piridina em todos os derivados (**2**, **2a-m**) quando comparados aos derivados com os mesmos substituintes na série 1 (**1**, **1a-m**) (vide Figura 39 e 40).

5.3.4 MAPAS DE DENSIDADE LUMO

A avaliação da densidade eletrônica de LUMO, codificada sobre uma *isosurface* de 0,002 eV/ua³, dos derivados da série 1 (**1**, **1a-m**) estão descritos na Figura 41. As regiões em azul caracterizam baixos valores de densidade eletrônica (baixo valor de LUMO) e em vermelho delineam áreas com altos valores de densidade eletrônica (alto valor de LUMO).

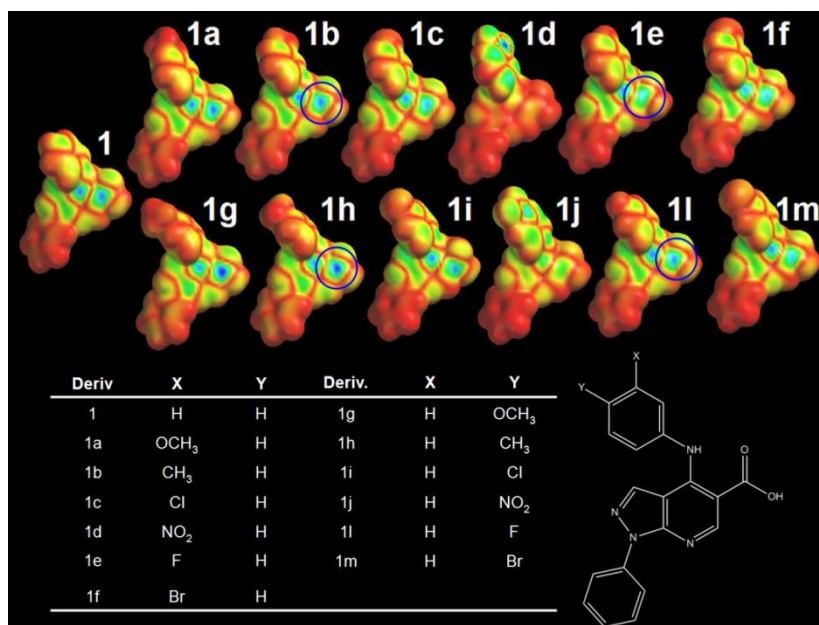


Figura 41. Mapas de densidade LUMO dos derivados da série 1 (1, 1a-m) codificados sobre uma *isosurface* de 0,002 eV/ua³.

Comparando os derivados **1a**, **1b**, **1c**, **1e** e **1f** (derivados ativos) da série 1, podemos observar diferenças na densidade de LUMO localizada na região sobre o átomo de carbono do grupo carboxila. Destes derivados, o derivado **1e** (*m*-F), o mais promissor dos derivados ativos desta série, apresentou menor densidade eletrônica de LUMO (cor azul) localizada sobre a região do grupo carboxila quando comparado com o derivado **1l** (*p*-F), onde observamos um aumento da intensidade de cor azul (maior valor de LUMO), podendo estar correlacionada com a ausência de atividade biológica observada para este derivado (círculos azuis em **1e** e **1l**, Figura 41).

O derivado **1b** (*m*-CH₃) é um dos derivados da série 1 que apresentou a menor atividade biológica (MIC de 64 µg/mL e um halo de inibição de 16 mm). Comparando-se os derivados **1b** e **1h** (*m*-CH₃ e *p*-CH₃, respectivamente), observamos um aparente aumento na intensidade de cor azul (maior LUMO)

localizada sobre a região do grupo carboxila (círculos azuis em **1b** e **1h**, Figura 41) e o derivado **1h** foi inativo.

Todos os derivados *para*-substituídos da série 1 (**1g**, **1h**, **1i**, e **1l**) apresentaram uma maior densidade de LUMO sobre a região do carbono do grupo carboxila. As exceções ocorrem com os derivados **1j** (*p*-NO₂), que devido à característica fortemente desativante do grupo nitro altera completamente o perfil eletrônico da molécula e **1m** (*p*-Br), que não apresentou um aumento na densidade LUMO nesta mesma região. Assim, apesar do baixo valor de LUMO sobre a região do grupo carboxila no derivado **1m**, outros fatores parecem estar interferindo na atividade biológica, possivelmente, uma interação estérica, uma vez que este derivado é *para*-substituído e como foi discutido anteriormente, esta posição possui restrição estérica, impedindo uma interação adequada com o sítio receptor.

A avaliação da densidade eletrônica de LUMO, codificada sobre uma *isosurface* de 0,002 eV/ua³, revela diferentes intensidades de LUMO (cor azul) localizada sobre a região do grupo carboxila dos derivados da série 2 (**2**, **2a-m**) (Figura 42).

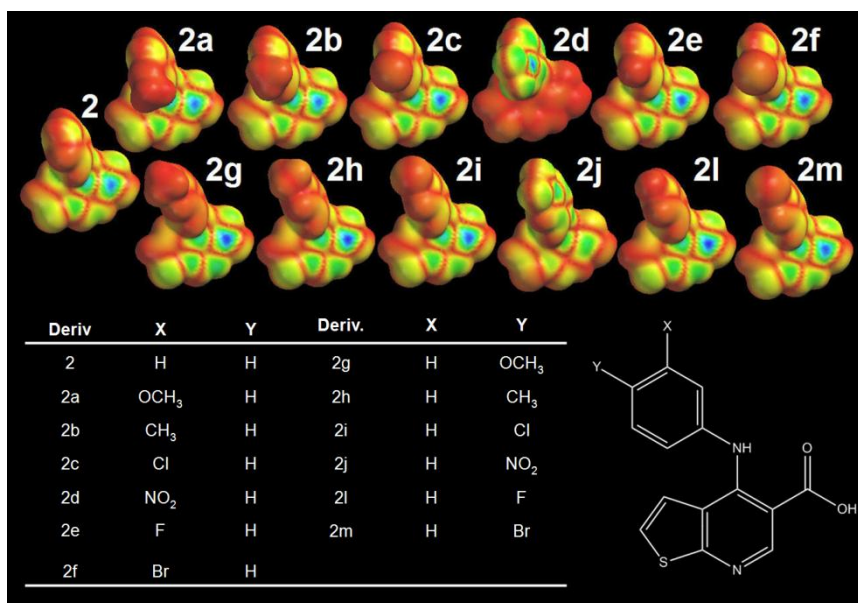


Figura 42. Mapas de densidade LUMO dos derivados da série 2 (2, 2a-m) codificados sobre uma *isosurface* de 0,002 eV/ua³.

Os mapas de densidade eletrônica LUMO dos derivados da série 2 (2, 2a-m) revelam que todos os derivados apresentam uma cor azul (maior densidade LUMO) de intensidade variável localizada sobre a região da carboxila, sendo a intensidade mais proeminente nos derivados com substituintes na posição *para* do anel fenila (2g, 2h, 2i, 2l e 2m) (Figura 42).

Comparando-se os derivados das duas séries com os mesmos substituintes, podemos observar as alterações que ocorrem na densidade eletrônica LUMO localizada sobre a região do átomo de carbono da carboxila. Por exemplo, os derivados 1c, 1e e 1f (*m*-Cl, *m*-F e *m*-Br) da série 1 foram ativos, enquanto os derivados 2c, 2e e 2f (*m*-Cl, *m*-F e *m*-Br) da série 2 foram inativos; estes últimos apresentaram uma maior densidade de LUMO (representada em azul) localizada sobre a região do carbono da carboxila quando comparados aos derivados com os mesmos substituintes da série 1 (Figuras 41 e 42).

O MIC obtido para os derivados ativos da série **1** (**1a**, **1b**, **1c**, **1e** e **1f**) sobre *Staphylococcus epidermidis* mostra um perfil de atividade semelhante ao da oxacilina ou mesmo maior do que a do cloranfenicol, dois fármacos em uso no mercado (Figura 43).

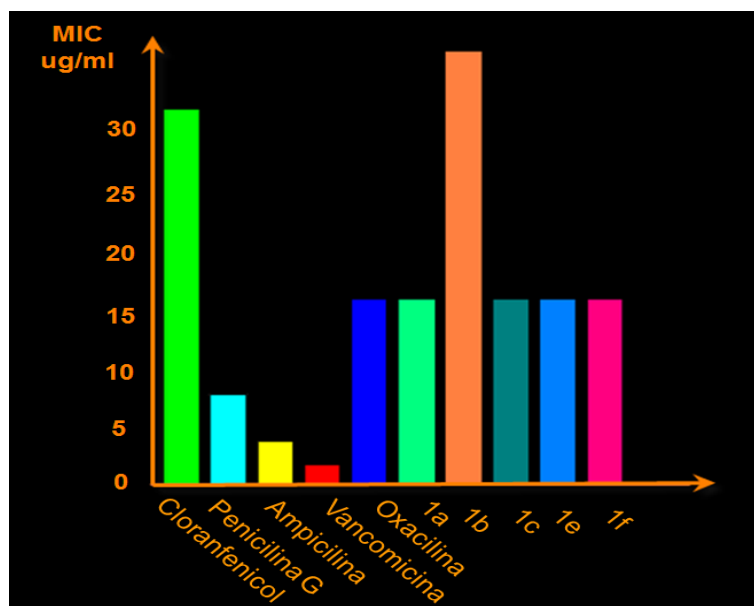


Figura 43 - Comparação entre os MIC obtidos para os derivados ativos da série 1 (1a, 1b, 1c, 1e e 1f) e fármacos atualmente em uso comercial.

A importância da posição do substituinte (*meta* ou *para*) no anel benzênico (anel C) para a atividade biológica foi avaliada testando-se o efeito dos derivados fluorados (*m*-F, *p*-F e *o*-F) em ensaios com cepas resistentes de *Staphylococcus epidermidis*. Culturas com estas cepas na fase logarítmica de crescimento foram incubadas com os três derivados fluorados e os valores de densidade óptica observados representam o crescimento percentual comparado ao do controle.

O derivado *m*-F da série 1 (**1e**), com um MIC de 16 µg/mL e um halo de inibição de 20mm, foi considerado o mais promissor da série. O seu análogo, o derivado *p*-F (**1l**), entretanto, foi inativo. A fim de avaliar a importância da posição de substituição no anel C, foi sintetizado o derivado *o*-F (**1n**) e foram realizados os ensaios de halo de inibição.

O mapa de densidade LUMO dos três derivados fluorados nas posições *orto*, *meta* e *para* (**1n**, **1e** e **1f**, respectivamente) mostrou um aumento da densidade de LUMO sobre a região do átomo de carbono do grupo carboxila para os compostos **1n** e **1f** (Figura 44).

Está hipótese pode ser reforçada quando comparamos todos os derivados fluorados, *meta* e *para*-substituídos, das duas séries (pirazolo e tieno-piridina), onde os derivados inativos apresentam um maior valor de LUMO sobre a região do átomo de carbono do grupo carboxila (Figura 45).

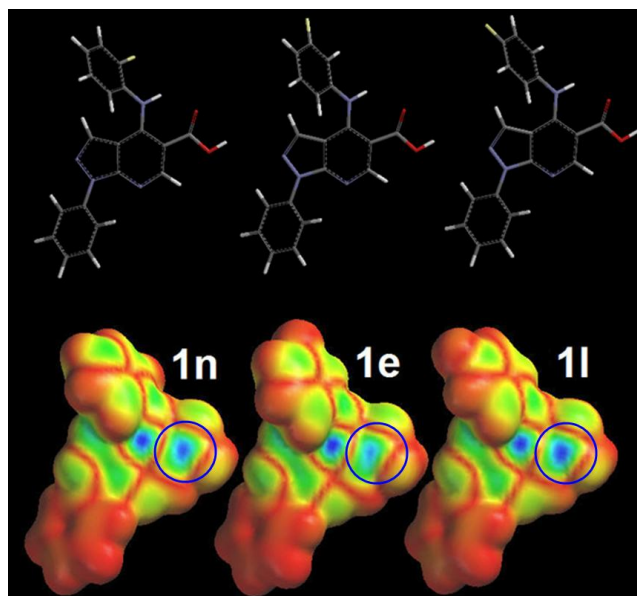


Figura 44. Mapas de densidade LUMO dos derivados 1n, 1e e 1l (*o*-F, *m*-F e *p*-F, respectivamente) da série 1 codificado sobre uma *isosurface* de $0,002 \text{ eV/ua}^3$, mostrando a variação de densidade de LUMO sobre a região do átomo de carbono do grupo carboxila (círculos azuis).

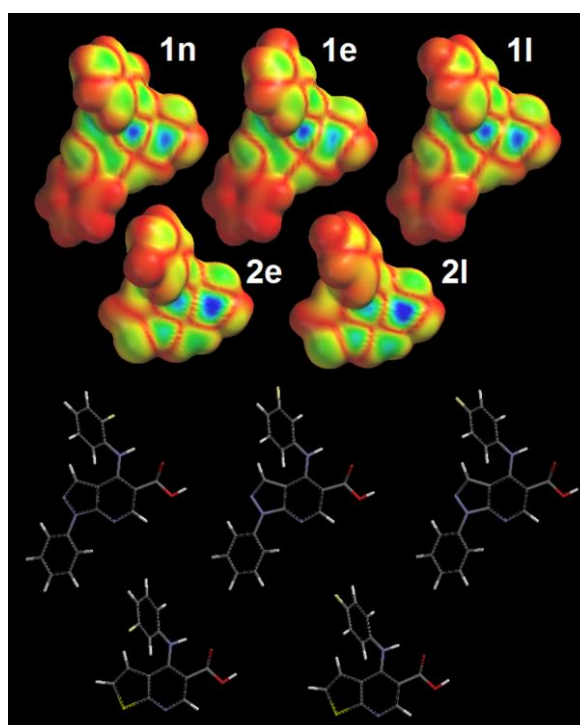


Figura 45. Mapas de densidade LUMO dos derivados 1n, 1e e 1l (*o*-F, *m*-F e *p*-F, respectivamente) da série 1 e 2e, 2l (*m*-F e *p*-F, respectivamente) da série tieno piridina codificado sobre uma *isosurface* de $0,002 \text{ eV/ua}^3$, mostrando a variação de densidade de LUMO sobre a região do átomo de carbono do grupo carboxila.

Assim a atividade antibacteriana foi determinada comparativamente para os derivados fluorados da série 1 (**1e**, **1l** e **1n**; respectivamente, *m*-F, *p*-F e *o*-F). Os resultados demonstraram que o derivado *o*-F foi inativo, possivelmente, devido aos fatores estereoeletrônicos descritos anteriormente (Figura 46).

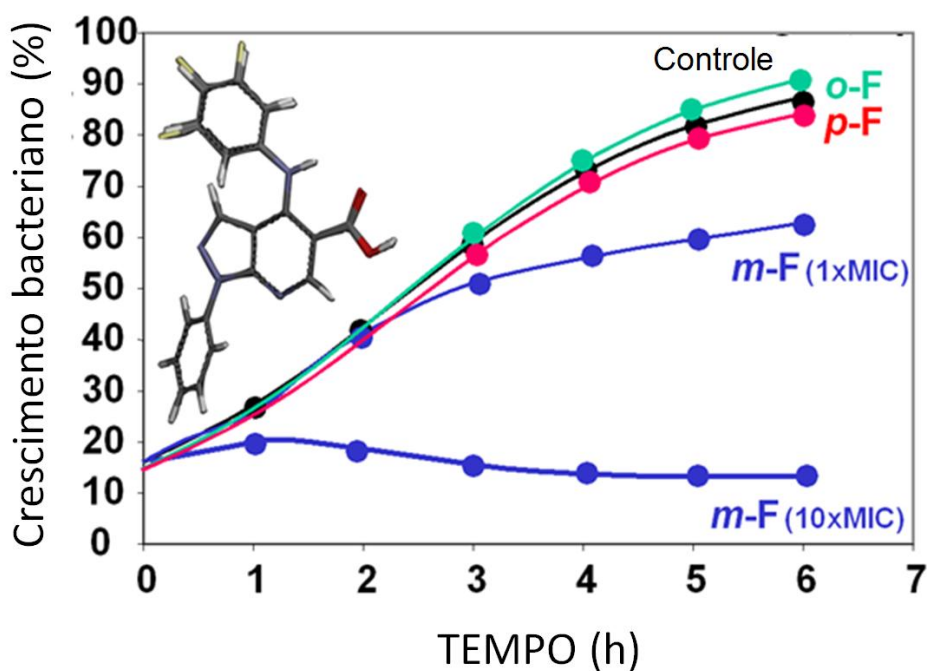


Figura 46. Gráfico do crescimento bacteriano percentual em função do tempo para os derivados fluorados da série 1 (*o*-F, *m*-F e *p*-F). O controle é representado em preto.

5.4 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E TOXICOLÓGICAS “in silico”

5.4.1 “REGRA DOS CINCO” (LIPINSKI)

Um fármaco para ter boa absorção oral deve satisfazer, teoricamente, a “Regra dos Cinco” de Lipinski, que estabelece (LIPINSKI, 2004):

- ✓ Peso molecular menor do que 500 daltons;
- ✓ cLogP menor do que 5;
- ✓ Máximo de cinco grupos doadores de ligação hidrogênio;
- ✓ Máximo de dez grupos aceptores de ligação hidrogênio.

Os dados para avaliação da “Regra dos Cinco”, de todos os derivados das duas séries (pirazolo e tieno-piridina) podem ser observados na Tabela 9.

Os dados mostram que os compostos da série 1 apresentam valores maiores de lipofilicidade, peso molecular, número de grupos aceptores de ligação hidrogênio e PSA (área de superfície polar) do que os compostos da série 2.

Uma análise mais detalhada dos compostos ativos da série 1 (1a, 1b, 1c, 1e e 1f) mostrou que todos satisfazem a “Regra dos Cinco” de Lipinski (peso molecular = 344,37-409,24, cLogP = 3,15-4,11, nHBA = 6-7 e nHBD = 2) (Tabela 9) e são semelhantes aos fármacos comerciais tais como cloranfenicol, oxacilina, ampicilina, penicilina G e linezolid (www.molinspiration.com/cgi-bin/properties).

Tabela 9. Valores de cLogP, HBA (aceptores de ligação hidrogênio), HBD (doadores de ligação hidrogênio), PM (peso molecular) e PSA (área de superfície polar) dos derivados pirazolo e tieno-piridina.

Derivado	cLogP	HBA	HBD	PM (g/mol)	PSA (Å²)
1	3,28	5	2	330,35	58,49
1a	3,15	6	2	360,37	65,59
1b	3,76	5	2	344,37	58,49
1c	3,83	5	2	364,79	58,48
1d	3,31	8	2	375,34	97,18
1e	3,43	5	2	348,34	59,65
1f	4,11	5	2	409,24	58,43
1g	3,15	6	2	360,37	65,73
1h	3,76	5	2	344,37	58,53
1i	3,83	5	2	364,79	58,18
1j	3,31	8	2	375,34	97,24
1l	3,43	5	2	348,34	58,47
1m	4,11	5	2	409,24	59,39
2	2,97	4	2	270,31	46,27
2a	2,85	5	2	300,34	53,20
2b	3,46	4	2	284,34	46,28
2c	3,53	4	2	304,76	46,14
2d	3,01	7	2	315,31	84,15
2e	3,13	4	2	288,30	46,20
2f	3,80	4	2	349,21	46,20
2g	2,85	5	2	300,34	53,29
2h	3,46	4	2	284,34	46,33
2i	3,53	4	2	304,76	46,22
2j	3,01	7	2	315,31	84,12
2l	3,13	4	2	288,30	46,32
2m	3,80	4	2	349,21	46,23

A toxicidade “*in silico*” foi avaliada utilizando-se o programa Osiris® Property Explorer. Os dados obtidos de toxicidade estão na Tabela 10 e indicam os riscos toxicidade teóricos para os derivados ativos da série 1 (**1a**, **1b**, **1c**, **1e** e **1f**) comparados com fármacos comerciais:

Tabela 10. Toxicidade teórica dos derivados ativos da série 1 (1a, 1b, 1c, 1e e 1f) obtidos com o programa Osiris® Property Explorer.

Derivado	Toxicidade			
	Risco Mutagenico	Risco Tumorigenico	Risco Irritante	Risco Reprodutivo
1a	Médio	Baixo	Baixo	Alto
1b	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
1c	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
1e	Baixo	Baixo	Baixo	Médio
1f	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
Oxacilina	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
Penicillina G	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
Cloranfenicol	Alto	Alto	Baixo	Alto
Linezolida	Alto	Alto	Baixo	Baixo
Ampicilina	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo

O derivado **1a** (*m*-OCH₃) da série 1 apresentou um risco teórico de efeito mutagênico médio e um risco teórico alto de efeito desfavorável sobre o sistema reprodutor. Um risco teórico médio sobre o sistema reprodutor foi atribuído ao derivado **1e** (*m*-F) da série 1. Entretanto, comparando-se estes dois derivados com os fármacos Cloranfenicol e Linezolida, comercialmente disponíveis e em uso atualmente, os efeitos desfavoráveis teóricos atribuídos aos dois derivados (**1a** e **1e**) são menores do que os mesmos efeitos computados para os fármacos comerciais mencionados.

Deve-se ter em mente que o baixo efeito tóxico atribuído aos demais derivados não significa ausência de possíveis efeitos tóxicos graves mas uma probabilidade de um bom desempenho no aspecto avaliado. A avaliação “*in silico*” da toxicidade, não elimina a necessidade dos testes toxicológicos tradicionais.

O índice de “*druglikeness*” indica se um composto apresenta determinadas características essenciais observadas na maioria dos fármacos disponíveis no mercado. Assim, este índice mostra a capacidade de um determinado composto em ser um candidato potencial a se tornar um fármaco. O gráfico abaixo mostra os valores computados e atribuídos pelo programa Osiris[®] aos derivados **1a**, **1b**, **1c**, **1e** e **1f** comparados com os valores de alguns fármacos comercialmente disponíveis no mercado (oxacilina, cloranfenicol e linezolida) (Figura 47).

Todos os derivados ativos da série 1 obtiveram um valor teórico de *druglikeness* melhor que o cloranfenicol e a linezolida.

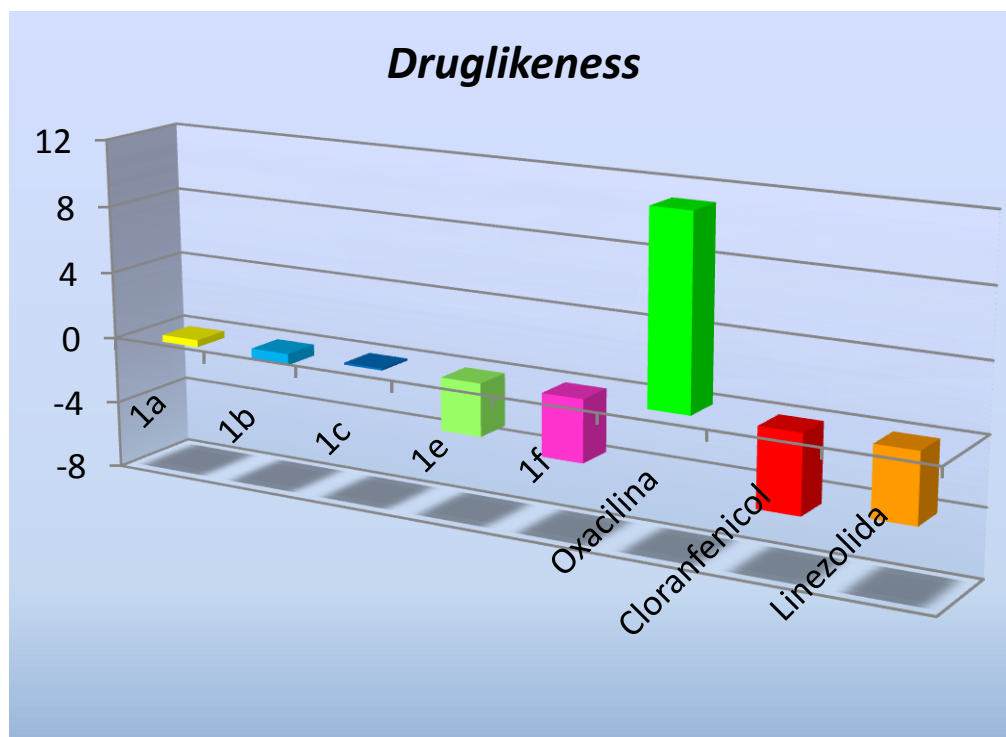


Figura 47. *Druglikeness* dos derivados 1a, 1b, 1c 1e e 1f (série 1) ativos comparados com fármacos comerciais (oxacilina, cloranfenicol e linezolida).

O índice “*drugscore*” é a soma de todas as características do composto (cLogP, solubilidade, toxicidade teórica, *druglikeness* e peso molecular) calculadas pelo sistema Osiris[®] que permite avaliar o quanto um determinado composto pode vir a ser habilitado como um futuro fármaco. Segundo os critérios estabelecidos, quanto mais próximo de 1 (um), maior é a probabilidade teórica de sucesso (Figura 48).

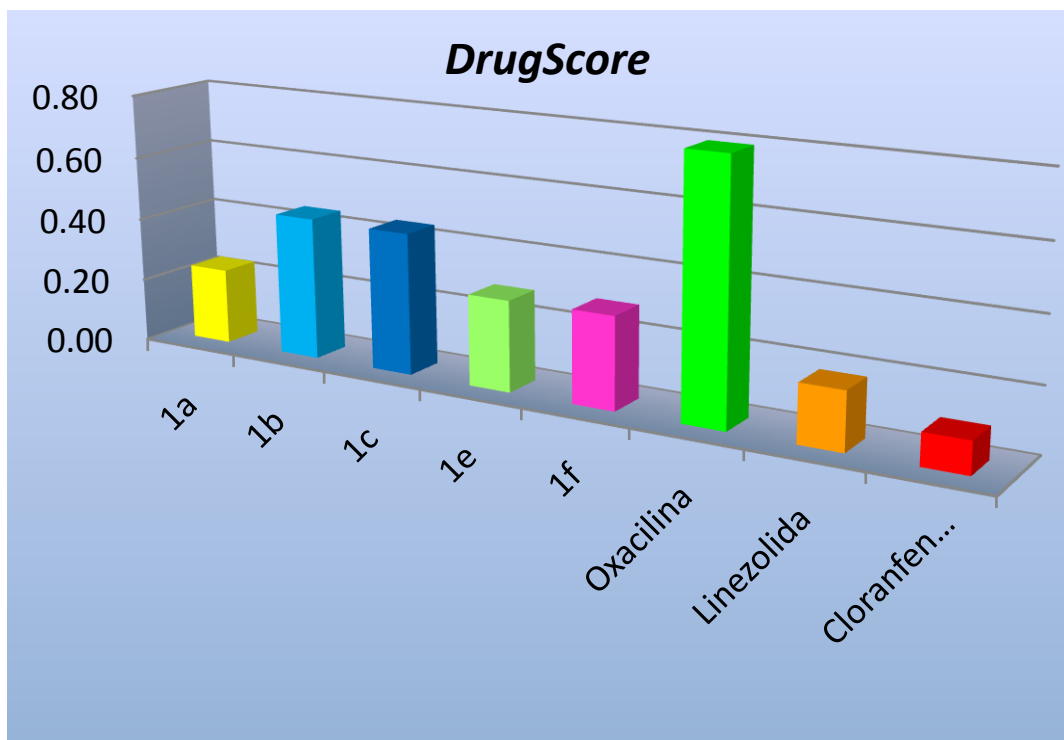


Figura 48. *DrugScore* do derivados ativos 1a, 1b, 1c, 1e e 1f da série 1 comparados com fármacos comerciais atualmente em uso.

Todos os derivados ativos da série 1 (1a, 1b, 1c, 1e e 1f) apresentaram um melhor desempenho teórico na avaliação do índice *drugscore* pelo programa Osiris[®] comparados com o mesmo índice obtido por fármacos como o cloranfenicol ou linezolida.

5.5. MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DO ANEL TIENO-PIRIDINA

Visando observar se alterações de grupos substituintes do anel tieno-piridina pode influenciar na atividade antibacteriana, o grupo ácido carboxílico foi substituído pelo isótero tetrazol (Figura 49).

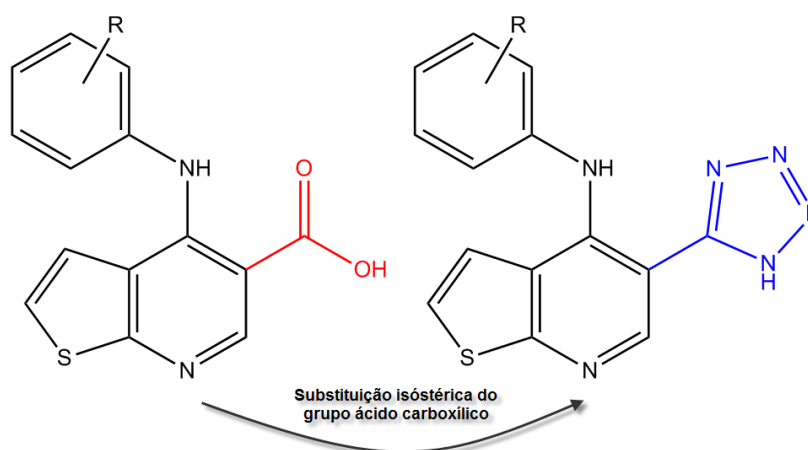
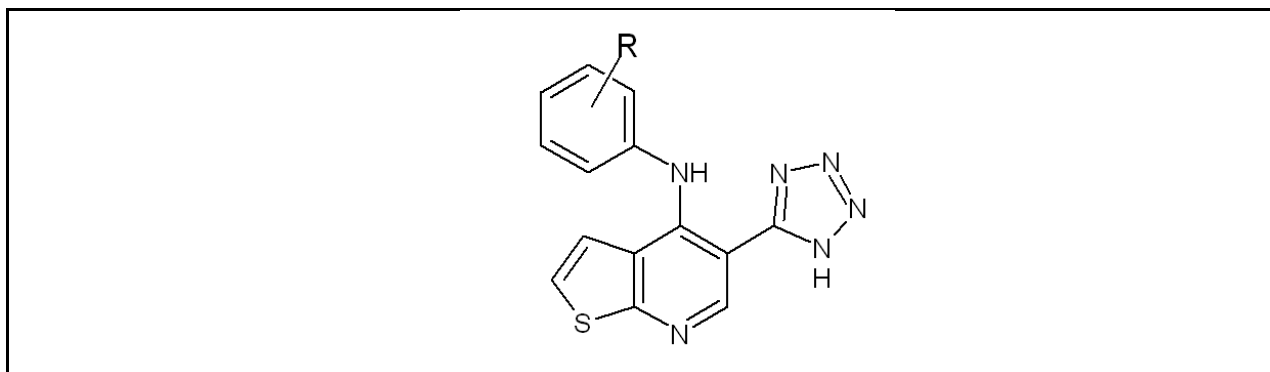


Figura 49. Substituição isostérica do grupo ácido carboxílico do sistema tieno-piridina pelo grupo tetrazol.

Foram sintetizados derivados *meta* e *para*-substituídos com os mesmos grupos funcionais (OMe, Me, Cl, NO₂, F e Br) das séries anteriores. Esta nova série (série 3) deu origem aos derivados (**3**, **3a-m**) (Tabela 11).

Tabela 11. Valores dos derivados tetrazóis da série 3 (3, 3a-m): ensaio de halo de inibição (Halo) e energia de HOMO (E_{HOMO}), energia de LUMO (E_{LUMO}), momento de dipolo, cLogP, peso molecular, PSA, HBD e HBA.



“Regra dos Cinco” de Lipinski

Deriv	R	Halo (mm)	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	Dipole (debye)	cLogP	PM (g/mol)	PSA (\AA^2)	HBD	HBA
3	H	0	-6,14	-1,82	8,01	3,55	294,34	67,77	1	6
3a	<i>m</i> -OCH ₃	0	-5,86	-1,86	7,27	3,43	324,37	75,24	1	7
3b	<i>m</i> -CH ₃	18	-6,07	-1,80	7,70	4,04	308,37	67,74	1	6
3c	<i>m</i> -Cl	18	-6,34	-1,97	7,16	4,11	328,79	68,09	1	6
3d	<i>m</i> -NO ₂	0	-6,66	-2,48	6,57	4,08	339,34	107,53	1	6
3e	<i>m</i> -F	0	-6,30	-1,94	7,25	3,71	312,33	68,14	1	6
3f	<i>m</i> -Br	0	-6,35	-1,98	7,12	4,38	373,24	68,12	1	6
3g	<i>p</i> -OCH ₃	0	-5,71	-1,72	7,15	3,43	324,37	74,91	1	7
3h	<i>p</i> -CH ₃	0	-5,96	-1,77	7,94	4,04	308,37	67,72	1	6
3i	<i>p</i> -Cl	0	-6,15	-1,96	8,33	4,11	328,79	68,06	1	6
3j	<i>p</i> -NO ₂	0	-6,73	-2,34	10,00	3,59	339,34	107,56	1	9
3l	<i>p</i> -F	0	-6,12	-1,91	8,26	3,71	312,33	68,08	1	6
3m	<i>p</i> -Br	0	-6,17	-1,99	8,35	4,87	373,24	68,14	1	3

Todos os derivados desta nova série foram submetidos aos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana (ensaio de halo de inibição – 5 mg/mL). Baseados nestes resultados, os compostos **3b** e **3c** apresentaram atividade antimicrobiana e foi determinado o MIC (concentração mínima inibitória) para estes derivados.

Foi observado que o grupo metila na posição *meta* do anel fenila no derivado **3b** favorece um melhor perfil antimicrobiano uma vez que o MIC determinado para este derivado foi menor (MIC = 64 $\mu\text{g/mL}$) do que o derivado **3c** (*m*-Cl) com o substituinte na mesma posição, mas com um MIC mais elevado (MIC = 512 $\mu\text{g/mL}$). A atividade antimicrobiana do derivado **3b** foi da mesma ordem de grandeza dos fármacos cloranfenicol (MIC = 32 $\mu\text{g/mL}$) e oxacilina (MIC = 16 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 50)

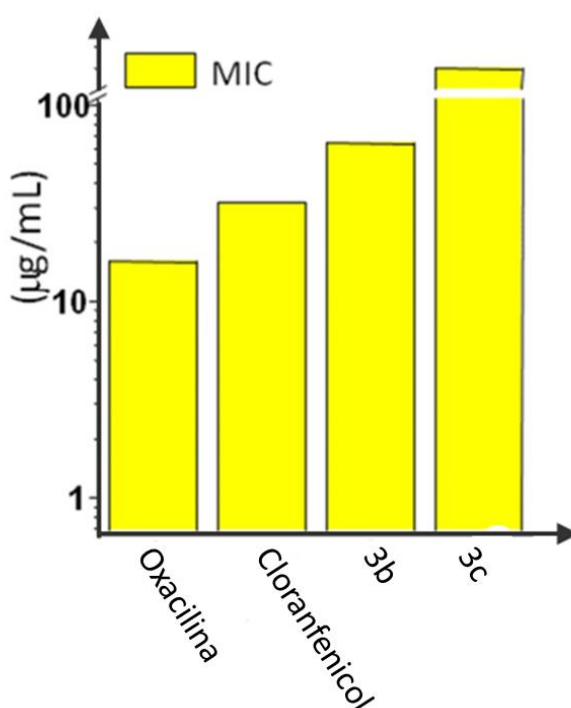
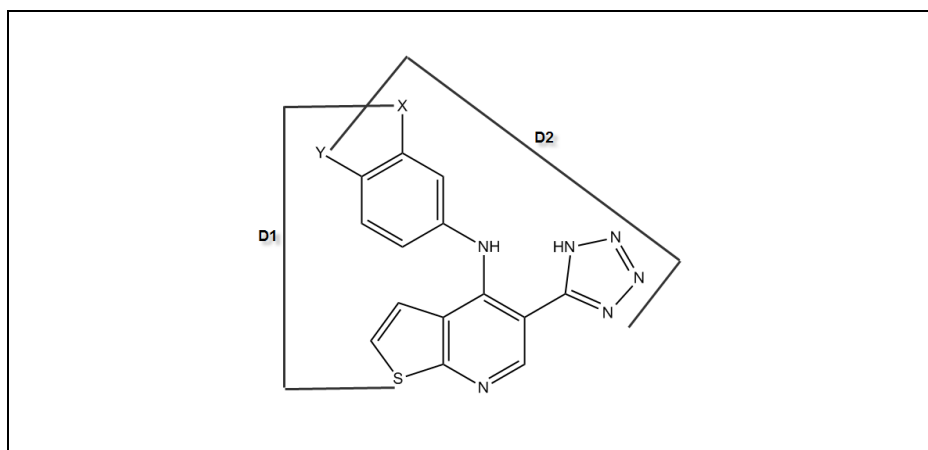


Figura 50. Comparação entre as concentrações inibitórias mínimas (MIC) dos derivados 3b e 3c com fármacos comerciais.

Foram realizadas também as medidas D1 e D2 para a série 3 (tetrazol). A distância D1 foi efetuada entre os átomos pesados ou o átomo de hidrogênio nas posições *meta* e o átomo de enxofre do sistema tieno-piridina (**3**). A distância D2 foi realizada entre os átomos pesados ou o átomo de hidrogênio nas posições *meta* e o

átomo de nitrogênio (N1) do grupo tetrazol (3). Foi também avaliada a área CPK, em \AA^2 (Tabela 12) conforme realizado para a série 1 e 2.

Tabela 12 - Distâncias em D1 e D2 (\AA) e área CPK (\AA^2) da série 3.



Derivado	X	Y	D1 (\AA)	D2 (\AA)	CPK Area (\AA^2)
3	H	H	9,20	6,43	281,86
3a	OCH ₃	H	9,34	6,46	311,68
3b	CH ₃	H	9,56	6,42	301,56
3c	Cl	H	9,60	6,52	297,56
3d	NO ₂	H	9,30	6,58	309,73
3e	F	H	9,31	6,53	288,61
3f	Br	H	9,76	6,50	302,34
3g	H	OCH ₃	9,33	6,50	311,37
3h	H	CH ₃	9,23	6,68	301,53
3i	H	Cl	9,11	6,99	297,61
3j	H	NO ₂	8,99	6,94	310,18
3l	H	F	9,15	6,68	288,51
3m	H	Br	9,07	7,17	302,60

Os derivados *meta*-substituídos apresentaram uma distância média D1 igual a 9,47 \AA e uma distância média D2 igual a 6,50 \AA . Os mesmos substituintes na posição *para* do anel C revelaram uma distância média D1 igual a 9,14 \AA e a distância média D2 igual a 6,82 \AA . A área CPK (Corey-Pauling-Kotton) dos derivados *meta*-substituídos é 301,91 \AA^2 e dos derivados *para*-substituídos é 301,96 \AA^2 . Estes

dados mostram que não existe uma diferença entre as distâncias calculadas (D1 e D2) para as posições *meta* e *para* e o perfil de atividade apresentado pelos derivados **3b** e **3c**.

Foi observado que as distâncias D1 e D2 foram diferentes quando comparados para as séries **1** e **2**. Assim, não foi possível elaborar um modelo farmacofórico de distâncias que explicasse um perfil de interação com o sítio receptor das séries sintetizadas.

O estudo das propriedades eletrônicas desta série (E_{HOMO} , E_{LUMO} e momento de dipolo) não mostrou nenhum dado que pudesse ser correlacionado com a atividade antimicrobiana.

Uma análise inicial do mapa de potencial eletrostático molecular dos derivados da série **3** (**3**, **3a-m**) mostrou uma densidade eletrônica semelhante para todos os compostos. Entretanto, uma comparação com as séries 1 e 2 revelaram que a presença do grupo tetrazol inseriu uma região com maior densidade eletrônica no anel heterocíclico aromático (Figura 51).

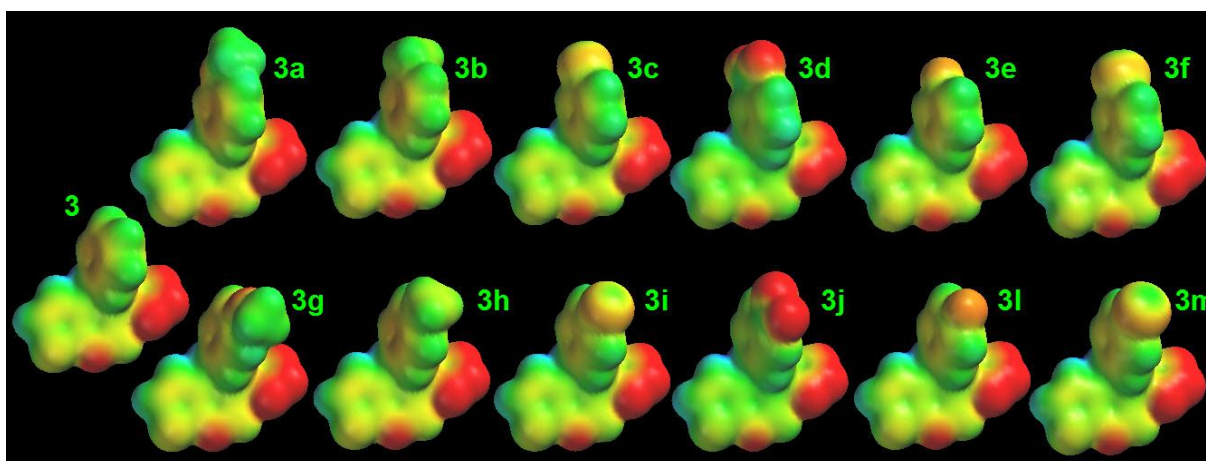


Figura 51. Mapa de potencial eletrostático molecular dos derivados da série **3** (**3**, **3a-m**), codificado numa faixa de -25 a +55 kcal/mol sobre uma superfície de densidade eletrônica constante de $0,002 \text{ eV/ua}^3$.

A atividade antimicrobiana observada no derivado **3b** (*m*-CH₃) não pode ser explicada com base no mapa de potencial eletrônico, pois as características são semelhantes aos dos derivados inativos da série 2 (Figura 51).

Entretanto, também foi observado que a posição do substituinte no anel fenila é um fator importante, uma vez que apenas os derivados **3b** e **3c** (*m*-CH₃ e *m*-Cl, respectivamente) apresentaram atividade biológica e estes derivados contendo os mesmos substituintes na posição *para* do anel fenila foram inativos. Isto pode sugerir a presença de uma região favorável (verde) ou desfavorável (vermelha) dos substituintes na posição *para* restringindo a interação com o sítio receptor (Figura 52), conforme observado para a série 1.

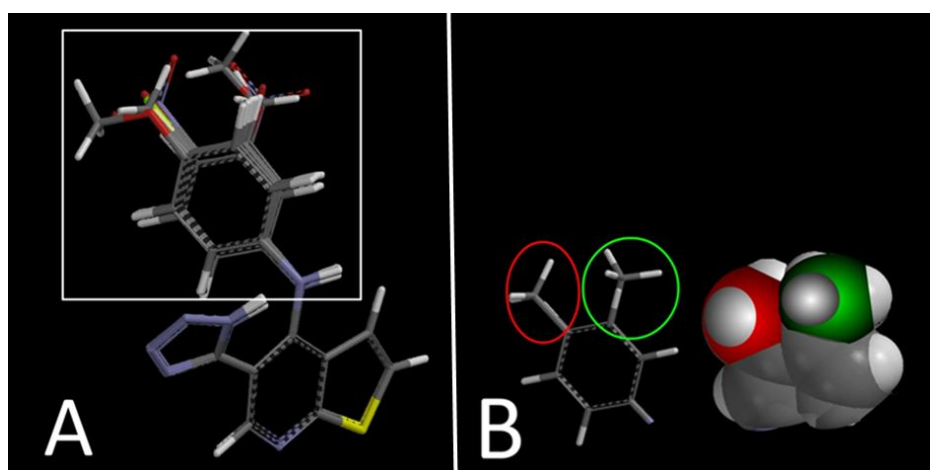


Figura 52. Sobreposição dos derivados da série 3 (**3**, **3a-m**) (A); detalhe do anel fenila substituído do derivado ativo *m*-CH₃ (**3b**, verde) e do derivado inativo *p*-CH₃ (**3h**, vermelho).

Comparando o mapa de densidade eletrônica de LUMO dos derivados da série 3 (tetrazóis), obtidos pela substituição isostérica não clássica do grupo ácido carboxílico presente na série 2, observamos que a maior densidade de LUMO (cor azul) está distribuída sobre o sistema tieno-piridina da série 3, ao contrário das séries 1 e 2 onde essa concentração foi observada na região do grupo carboxila (Figura 53

e 42). Assim, podemos inferir que a atividade do derivado **3b** pode atuar através de um modo de interação diferente com o sítio receptor ou por outro mecanismo de ação ao dos derivados da série **1**.

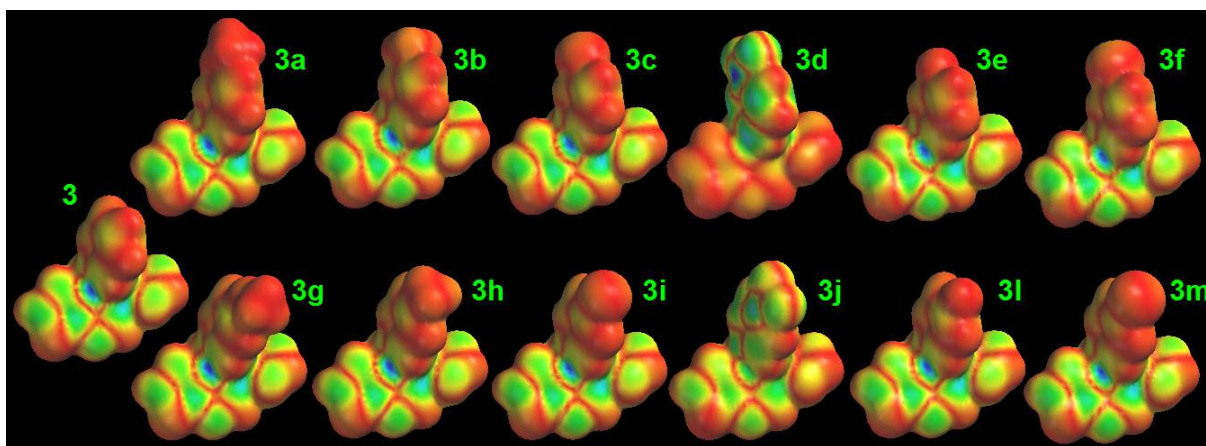


Figura 53. Densidade eletrônica LUMO dos derivados da série **3** (**3**, **3a-m**) (tetrazol) codificada sobre uma *isosurface* de $0,002 \text{ eV/ua}^3$.

Uma vez que todos os derivados da série **2** (**2**, **2a-m**) foram inativos e na série **3** (**3**, **3a-m**) observamos 2 derivados ativos (**3b** e **3c**) é possível que a alteração na distribuição eletrônica da densidade de LUMO observada seja importante para atividade antimicrobiana.

Os derivados **3b** e **3c** da série de tetrazóis, também foram avaliados quanto a farmacocinética e toxicologia teórica *in silico* comparados com o cloranfenicol e a oxacilina. Os valores de *drugscore* e *druglikeness* se mostraram melhores que os índices calculados para o cloranfenicol e semelhantes aos índices da oxacilina (Figura 54). A avaliação da toxicologia *in silico* para os derivados **3b** e **3c** é apresentada na Figura 55.

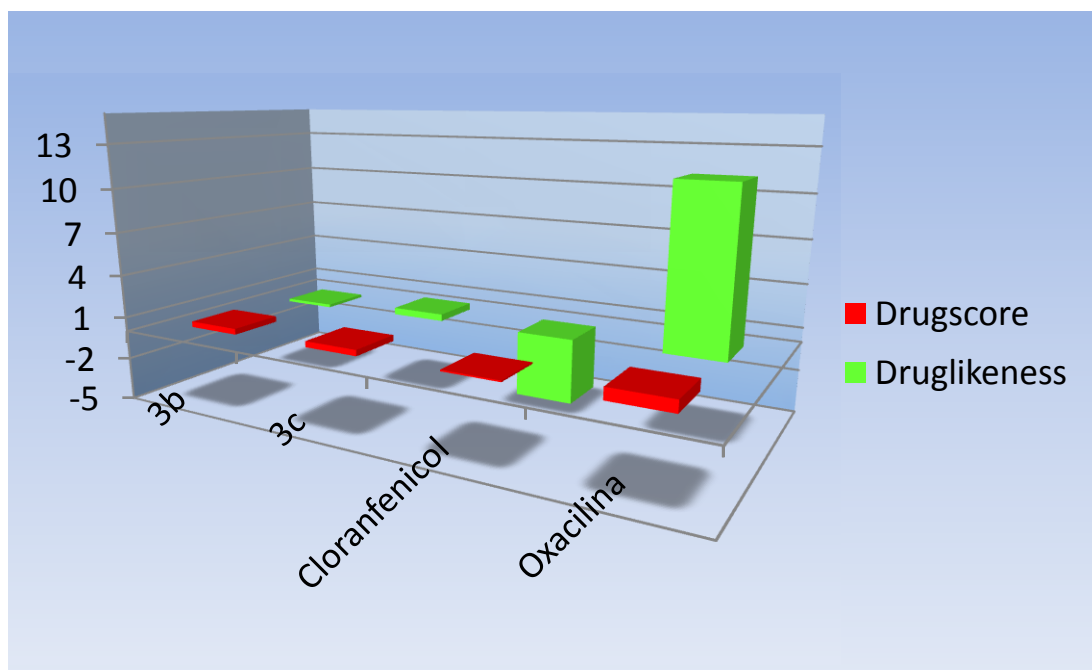


Figura 54. Comparação dos valores calculados de “drugscore” e “druglikeness” para os derivados 3b e 3c (tetrazóis) com o cloranfenicol e oxacilina obtidos do Osiris® Property Explorer.

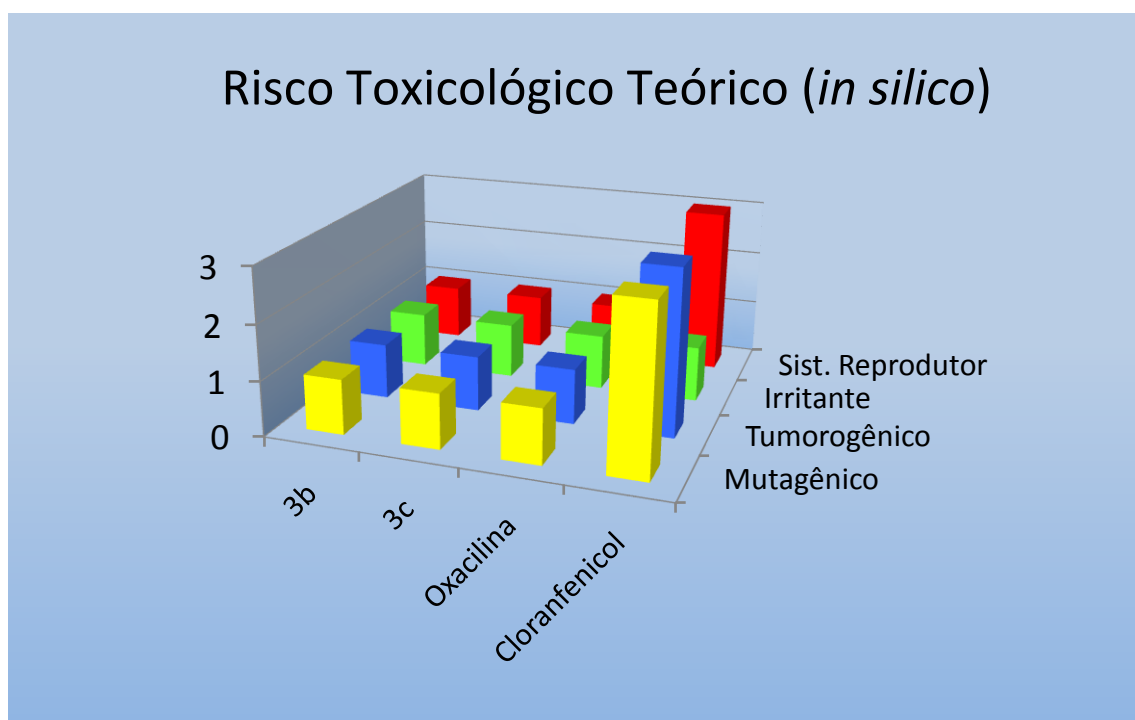


Figura 55. Comparação da toxicologia *in silico* para os derivados 3b e 3c (tetrazóis) com o cloranfenicol e a oxacilina (fármacos comerciais) obtida através do Osiris® Property Explorer.

Por último, os valores avaliados para a “Regra dos Cinco” de Lipinski ($c\text{LogP} \leq 5$, $\text{PM} \leq 500$, $\text{PSA} \leq 140$, $\text{HBD} \leq 5$ e $\text{HBA} \leq 10$) dos derivados **3b** e **3c** atenderam os parâmetros para um provável candidato a fármaco. A lipofilicidade ($c\text{LogP}$) média dos derivados **3b** e **3c** apresentaram valor próximo a 4 e apesar deste valor ser maior do que aos calculados para o cloranfenicol e oxacilina (0,73 e 2,03 respectivamente) é inferior a 5 (cinco), o que é importante para uma boa absorção por via oral segundo Lipinski.

6. CONCLUSÕES

Foram sintetizados, inicialmente, duas séries de derivados pirazolo-piridina (Série 1), tieno-piridina (Série 2) e ensaiados contra cepas de bactérias resistentes. Os derivados da série 1, substituídos na posição *meta* foram ativos contra cepa de *S. epidermidis* enquanto os derivados da série 2 foram inativos. A introdução de mudanças estruturais no sistema tieno-piridina, através da substituição do grupamento carboxila pelo isómero tetrazol, gerou os derivados da série 3.

Estudos teóricos foram realizados para as três séries e um modelo farmacofórico preliminar foi elaborado. Os resultados mostraram que a série 1 possui distâncias (D1 e D2) maiores do que as séries 2 e 3. Assim, as diferenças de distâncias D1 e D2 entre as séries 1 e 3 (ativas) sugerem que o arranjo geométrico desses grupos não permite adotar este modelo farmacofórico para propor novas derivados

A avaliação dos parâmetros estéricos realizados para a série 1 foi possível evidenciar que os substituintes na posição *meta* favorecem uma melhor geometria de interação com o sítio receptor, diferente dos derivados *para* e *orto* substituídos que possivelmente direcionam tais substituintes para regiões restritivas (proibitivas) impedindo um perfeito encaixe com o alvo terapêutico.

Uma análise eletrônica dos derivados das séries 1 e 2 através do mapa de potencial eletrostático molecular revelou que a densidade eletrônica, na série 1, está localizada sobre o sistema pirazolo-piridina, ao contrário do observado na série 2. A análise dos orbitais de fronteira revelou que a intensidade da densidade de LUMO é menor na posição *meta* do que nas posições *orto* e *para* em ambas as séries (1 e 2)

enquanto que a densidade HOMO está concentrada sobre o núcleo 1-*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina quando comparado com o sistema tieno[2,3-*b*]piridina.

Os derivados da série **3** foram ensaiados contra *S. epidermidis* e apenas dois compostos na posição *meta* (**3b** e **3c**) foram ativos. Uma análise sobre o mapa de potencial eletrostático molecular mostrou que a presença do grupo tetrazol inseriu uma região com maior densidade eletrônica no anel heterocíclico aromático

Os dados dos parâmetros físico-químicos, associados com a Regra dos Cinco de Lipinski mostraram que os compostos ativos das séries **1** e **3** foram melhores ou semelhantes aos fármacos comerciais.

Neste estudo também foi verificado que o “*drugscore*” o qual combina “*druglikenes*”, cLogP, LogS e peso molecular é um parâmetro que pode ser usado para avaliar o perfil potencial de um composto se tornar um fármaco. Foi observado que os derivados ativos da série **1** apresentam valores maiores do que o cloranfenicol e linezolidina.

Os dados teóricos de toxicidade também foram avaliados e os derivados ativos apresentam um baixo risco de toxicidade similar à oxacilina, ampicilina e penicilina G e estes mesmos riscos foram inferiores quando comparados ao cloranfenicol e linezolidina. Estes dados teóricos reforçam que os dados experimentais de citotoxicidade apontam estes compostos como candidatos a futuros protótipos com baixa citotoxicidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANIS, A. J. - **Resistance to Antibiotics: Are We in The Post-Antibiotic Era?** *Archives of Medical Research*, 36, 607-705, 2005

ALI, A.; TAYLOR, G.E.; ELLSWORTH, K.; HARRIS, G.; PAINTER, R.; SILVER, L.; YOUNG, K. - **Novel pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine based inhibitors of *Staphylococcus aureus* DNA Polymerase III: Design, Synthesis and Biological Evaluation.** *J. Med. Chem.* 46, 1824-1830, 2003.

ÁLVAREZ-LERMA, F.; ALVAREZ, B.; LUQUE, P.; RUIZ, F.; J DOMINGUEZ-ROLDAN J. M.; QUINTANA, E.; SANZ-RODRIGUEZ, C.; ADANN STUDY GROUP. - **Empiric broad-spectrum antibiotic therapy of nosocomial pneumonia in the intensive care unit: a prospective observational study,** *Critical Care*, 3, 1-11, 2006.

ANSLYN, E.V.; DOUGHERTY, D.A. - **Modern Physical Organic Chemistry.** *University Science Books*, 2004.

AZEVEDO, A.R.; FRUGULHETTI, I.C.C.P.; KHAN, M.A.; KHAKWANI, S.; BERNARDINO, A.M.R. - **Synthesis and biological evaluation of 1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]Pyridine-5-carboxilic acids against vaccinia virus.** *Heteroc Comm*; 8: 47-50, 2002.

BAMBEKE, F.V.; MINGEOT-LECLERCQ, M.; STRUELENS, M.J.; TULKENS, P.M. - **The Bacterial Envelope as a Target for Novel anti-MRSA Antibiotics.** *Trends in Pharmacological Science*, 29, 3, 124-134, 2008.

BARREIRO, E.J.; RODRIGUES, C.R.; ALBUQUERQUE, M.G.; SANT'ANNA, M.R.; ALENCASTRO, R.B. - **Modelagem Molecular: Uma Ferramenta Para O Planejamento Racional De Fármacos Em Química Medicinal.** *Quím Nova*, 20 (3), 300-10, 1997.

BENNET, J.W.; MURRAY, C.K.; HOLMES, R.J.; PATTERSON, J.E.; JORGENSEN, J.H. - **Diminished vancomycin and daptomycin susceptibility during prolonged bacteremia with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60, 437-440, 2008.

BERNARDINO, A.M.R.; PINHEIRO, L.C.S.; RODRIGUES, C.R.; LOUREIRO, N.I.; CASTRO, H.C.; LANFREDI-RANGEL, A.; SABATINI-LOPES, J.; BORGES, J.C.; CARVALHO, J.M.; ROMEIRO, G.A.; FERREIRA, V.F.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; VANNIER-SANTOS, M.A.. - **Design, synthesis, SAR, and biological evaluation of new 4-(phenylamino)thieno[2,3-*b*]pyridine derivatives.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 5765-5770, 2006)

BERNARDINO, A.M.R.; CASTRO, H.C.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; LOUREIRO, N.I.V.; AZEVEDO, A.R.; PINHEIRO, L.C.S.; SOUZA, T.M.L.; GIONGO, V.; PASSAMANI, F.; MAGALHÃES, U.O.; ALBUQUERQUE, M.G.; CABRAL, L. M.; RODRIGUES, C.R. - **SAR of a series of anti-HSV-1 acridone derivatives, and a rational acridone-based design of a new anti-HSV-1 3*H*-benzo[*b*]pyrazolo[3,4-*h*]-1,6-naphthyridine series.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 313-321, 2008.

BERNARDINO, A.M.R.; FERREIRA, V.F.; FONTOURA, G.A.T.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; LEE, M.Y.; SOUZA, M.C.B.V.; - **Synthesis of 4-anilino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine derivatives and their in vitro antiviral activities.** *J Braz Chem Soc*; 7: 273-77, 1996.

CAVALCANTI, S.M.M.; FRANÇA, E.R.; CABRAL, C.; VILELA, M.A.; MONTENEGRO, F.; MENEZES, D.; MEDEIROS, A.C.R. - **Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital.** *Braz J Infect Dis*, v. 9, n. 1, p. 56-63, 2005.

CARESTIATO, F.N. - **Efeitos Do Derivado : Ácido - 4 - (2'- Metoxifenil) Amino -1 - 3 - Difenil - 1 H -Pirazolo [3,4-B] Piridina - 5 - Carboxílico Sobre As Cepas de *Staphylococcus aureus* Isolados De Pacientes Do Huap Uff. 1998** (dados não publicados).

CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C.; **Introdução A Modelagem Molecular De Fármacos No Curso Experimental De Química Farmacêutica;** *Quím. Nova*, 26, 428-438, 2003.

CAVALLO, J.D.; MÉRENS, A. – **Antibacterial spectrum of an antibiotic and clinical categorization.** *Pathologie Biologie*, 56, 300-304, 2008

CLARK, D.E.; MURRAY, C.W.; LI, J. - **Current Issues In De Novo Molecular Design.** *Reviews In Computational Chemistry* 11: 67-125, 1997.

CRAMER, R.; PATTERSON, D.E.; BUNCE, J.D. – **Comparative Molecular Field Analysis (Comfa). 1. Effects of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins.** *J Am Chem Soc* 110: 5959-67, 1988.

COHEN, N.C.; BLANEY, J.M.; HUMBLET, C.; GUND, P.; BARRY, D.C. - **Molecular Modeling Software And Methods For Medicinal Chemistry.** *J Med Chem* 33 (3): 883-94, 1990.

COSTA, M.S.; BOECHAT, N.; RANGEL, E.A.; SILVA, F.C.; SOUZA, A.M.T.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H, C.; JUNIOR, I.V.; LOURENÇO, M.C.S.; WARDELL, S.M.S.V.; FERREIRA, V.F.. - **Synthesis, tuberculosis inhibitory activity, and SAR study of N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole derivatives.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 8644-8653, 2006.

DE MELLO H.; ECHEVARIA, A.; BERNARDINO A.M.R.; CANTO CAVALHEIRO, M.; LEON L.L. - **Antileishmanial pyrazolopyridine derivatives: synthesis and structure-activity relationship analysis.** *J Med Chem*; 47: 5427-32, 2004.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. - **AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model.** *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 3902-3909, 1985.

DIAS, L.R.S.; SANTOS, M.B.; ALBUQUERQUE, S.; CASTRO, H.C.; SOUZA, A.M.T.; FREITAS, A.C.C.; DIVAIO, M.A.V.; CABRAL, L.M.; RODRIGUES, C.R. – **Synthesis, in vitro evaluation, and SAR studies of a potential antichagasic 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine series.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 211-219, 2007.

EURENIUS, K.P.; CHATFIELD, D.C.; BROOKS, B.R.; HODOSCEK, M. - **Enzyme Mechanisms With Hybrid Quantum And Molecular Mechanical Potentials. I. Theoretical Considerations.** *Int J Quantum Chem* 60: 1189-200, 1996.

EKKELENKAMP, M.A.; HANSEN, M.; HSU, S.D.; JONG, A.D.; MILATOVIC, D.A.; VERHOEF, J.; NULAND, N.A.J. - **Isolation And Structural Characterization Of Epilancin 15X, A Novel Lantibiotic From A Clinical Strain Of Staphylococcus Epidermidis.** *FEBS Letters*, 2005, 579, 1917–1922.

FERNANDES, P. **Antibacterial Discovery and Development – the Failure of Success?** *Nature Biotechnology*, 24, 12, 1497-1503, 2006

FRENCH, G.L. – **Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections – the potential role of daptomycin.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 1107-1117, 2006.

GILL, S.R. - **Insights On Evolution Of Virulence And Resistance From The Complete genome Analysis Of An Early Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strain And A Biofilm-Producing Methicillin-Resistant Staphylococcus Epidermidis Strain.** *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 187:7, 2426–2438, 2005.

HANCOCK, R. E. W. - **Mechanisms of Action of Newer Antibiotics for Gram-positive Pathogens.** *Lancet Infect. Dis.* , 5, 209-218, 2005

HEHRE, W.J. - **A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations.** *Wavefunction, Inc.*; 2003.

HINCHLIFFE, A. - **Molecular Modelling for Beginners.** *John Wiley & Sons Ltd*, 2003.

HÖLTJE, H.D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. - **Molecular Modeling – Basic Principles and Applications**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, II ed, 2003.

HOU, T.; WANG, J.; ZHANG, W.; XU, X. - **ADME Evaluation in Drug Discovery. 7. Prediction of Oral Absorption by Correlation and Classification**. *J. Chem. Inf. Model.*, 47, 208-218, 2007

JANSEN, W.T.M.; van der BRUGGEN, J.T.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C. - **Bacterial Resistance: A Sensitive Issue Complexity of the Challenge and Containment Strategy in Europe**. *Drug Resistance Updates*, 9, 123-133, 2006.

JUNG, D.; ROZEK, A.; OKON, M.; HANCOCK, R.E.W - **Structural Transitions as Determinants of the Action of the Calcium-Dependent Antibiotic Daptomycin**. *Chemistry & Biology*, 11, 949-957, 2004.

KADAN, R.U., ROY, N. – **Recent Trends in Drug Likeness Prediction: A Comprehensive Review of *In Silico* Methods**. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 69, 5, 609-615, 2007.

KARELSON, V.; LOBANOV, V. - **Quantum-chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies**. *Chem. Rev.*, 1996, 96, 1027-1043.

KHAN, M.T.H.; SYLT, I. – **Predictive QSAR Modeling for Successful Predictions of the ADMET Properties of Candidate Drug Molecules**. *Current Drug Discovery Technologies*, 4, 141-149, 2007.

KELLER, T.H.; PICHOTA, A.; YIN, Z. – **A Practical view of druggability**. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 357-361, 2006.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHERECKENBERGER, P.C.; E WIN, W.C.J.R. - **Diagnóstico Microbiológico**. Guanabara-Koogan: Cap 11: Cocos Gram Positivos: Parte I: Estafilococos E Microorganismos Relacionados. 5a Edição: 2001, Rio de Janeiro.

KUMAR, V.; AGGARWAL, R.; TYAGI, P.; SINGH, S.P. - **Synthesis And Antibacterial Activity Of New 1-Heroaryl-5-Amino-4-Phenyl-3-Trifluoromethylpyrazoles** ; *Eur. J. Med. Chem.*; 7, 235-345, 2005.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, P. - **Bacterial Resistance to Antibiotics: Active Efflux and Reduced Uptake**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1486-1513, 2005.

KYAW, C.M. - Antibióticos e Quimioterápicos
www.unb.br/ib/cel/microbiologia/antibioticos/antibioticos.html,
12/03/2008. acessado em

LEACH, A. - **Molecular Modelling – Principles and Applications**. *Pearson Education Limited*, II ed., 2001.

LEAL, B.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; ABREU, P.A.; GARRET, R.; PINHEIRO, L.C.S.; AZEVEDO, A.R.; BORGES, J.C.; VEGI, F.P., SANTOS, C.C.C.; SILVEIRA, F.C.A.; CABRAL, L.M.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; BERNARDINO, A.M.R.; SANTOS, D.O.; CASTRO, H.C. – **Antibacterial profile against drug-resitant *Staphylococcus epidermidis* clinical strain and structure-activity relationship studies of 1-*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine and thieno[2,3-*b*]pyridine derivatives**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. DOI: [10.1016/j.bmc.2008.07.035](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.035), 2008.

LEMAIRE, S.; FUDA, C.; VAN BAMBEKE, F.; TULKENS, P.M.; MOBASHER, S. – **Restoration of susceptibility of methicillin-resistant *STaphylococcus aureus* to b-lactam antibiotics by acidic pH**. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 19, 12769-12776, 2008.

LENGAUER, T.; RAREY, M. - **Computational Methods For Biomolecular Docking**. *Curr Opin In Struct Biol* 6 (3): 402-5, 1996.

LIPINSKI, C.A. - **Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution**. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2004, 1, 337-341.

LOMBARDINO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. - **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.** *Adv Drug Rev*, 48, 3-26, 2001.

LOHRAY, B.B.; LOHRAY, B.V.; SRIVASTAVA, B.K.; KAPADNIS, P.B.; PANDYA, P. - **Novel tetrahydro-thieno pyridyl oxazolidinone: an antibacterial agent.** *Bioorg & Med Chem*; 12: 4557-64, 2004.

LUTZ, L.; MACHADO, A.; KUPLICH, N.; BARTH, A.L. - **Clinical Failure Of Vancomycin Treatment Of *Staphylococcus Aureus* Infection In A Tertiary Care Hospital In Southern Brazil.** *Braz. J. Infect. Dis.*;7, 224-228, 2003.

MAMISUKA, E. - **Projeto De Resistência Microbiana Em Serviços De Saúde, *Staphylococcus***, Anvisa, www.anvisa.gov.br acessado em julho de 2006.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. - **Brock Biology of Microorganisms**, 10^a Edition, *Pearson Education*, 2004.

MDLULI, K.; MELVIN, S. – **Novel targets for tuberculosis drug discovery.** *Current Opinion in Pharmacology*, 6, 459-467, 2006.

OLIVEIRA,G.A.; OKADA; GENTA, R.S.; MAMIZUKA, E.M.; **Avaliação Da Tolerância A Vancomicina Em 365 Cepas Hospitalares De *Staphylococcus Aureus* Resistentes A Oxacilina.** *J. Bras. Patol.*, 37; 239-246, 2001a.

OLIVEIRA, C.G.T.; MIRANDA, F.F.; FERREIRA, V.F.; FREITAS, C.C.; CARBALLIDO, J.M.; CORRÊA, L.C.D. - **Synthesis And Antimicrobial Evaluation Of 3-Hydrazino-Naphthoquinones As Analogs Of Lapachol.** *Journal Brazilian Chemical Society, Brasil*, 12, 339-345, 2001.

O'NEIL, M. - **The Merck Index.** Merck Research Laboratories, XIV ed.; 2006.

ROBERT, S.; CHAMBERS, S. - **Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue.** *Intern Med J*, v. 35, p. 97S-105S, 2005.

ROCHA, G.B.; FREIRE, R.O.; SIMAS, A.M.; STEWART, J.J.P. - **RM1: A Reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I.** *Journal of Computational Chemistry*, 27,1101-1111, 2006.

RODRIGUES, C.R. – **Modelagem Molecular.** *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*. N° 3, 2001.

ROZAS, I. - **On the Nature of Hydrogen Bonds: an Overview on Computational Studies and a Word about Patterns.** *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 9, 2782-2790, 2007.

SALES JUNIOR, J.A.L.; DAVID, C.D.; HATUM, R.; SOUZA, P.C.S.P.; JAPIASSÚ, A.; PINHEIRO, C.T.S.; FRIEDMAN, G.; SILVA, O.B.; DIAS, M.D.; KOTERBA, E.; DIAS, F.S.; PIRAS, C.; LUIZ, R.R. – **Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras.** *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 18, 1, 9-17, 2006.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. - ***Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar.** *Jornal Brasileiro de Medicina e Patologia Laboratorial*, 43, 413-423, 2007.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. - **Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach.** *American Society for Microbiology*, Washington DC, 1994.

SRINIVASAN, A.; DICK, J.D.; PERL, T.M. - **Vancomicine Resistance In *Staphylococci*,** *Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 430-438, 2002.

STOUCH, T.R.; KENYON, J.R.; JOHNSON, S.R.; CHEN, X.; DOWEYKO, A.; LI, Y. – ***In silico ADME/Tox: why models fail.*** *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 17, 83-92, 2003.

TAVARES, W. - **Manual De Antibióticos E Quimioterápicos Antiinfeciosos.** Ed. Atheneu, R.J. 1996

TAVARES, W. - **Bactérias Gram-Positivas Problemas: Resistência Do Estafilococo, Do Enterococo E Do Pneumococo Aos Antimicrobianos,** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 33, 281-301, 2000.

TETKO, I.V.; BRUNEAU, P.; MEWES, H.; ROHRER, D.C.; PODA, G.I. – **Can We Estimate the Accuracy of ADMET Predictions?** *Drug Discovery Today*, 11, 700-707, 2006.

THOMAS, J.R.; HERGENROTHER, P.J. – **Targeting RNA with small molecules.** *Chemical Reviews*, 108, 4, 1171-1244, 2008

TRABULSI, L.R. - **Microbiologia.** *Livraria Atheneu*, 4a Ed, 2005, São Paulo.

VEBER, D.F.; JOHNSON, R.S.; CHENG, H-Y; SMITH, B.R.; WARD, K.W.; KOPPLE, K.D. - **Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates.** *J. Med. Chem.*, 45, 2615-2623, 2002.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. - ***Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination.** *Salud Pública de México*, v. 47, p. 381-7, 2005.

VELÁZQUEZ, J.; LIZARASO, F.; WONG, W.; ALFARO, C.; VÉLIZ, J.L.; SALAZAR, J.; LARREA, H.; GAMARRA, J.; SMAQUISPE, R. - **Vigilancia De La Resistencia De *Staphylococcus aureus* A La Oxacilina-Vanconicina Y Patrones De Corresistencia.** *Rev. Per. Soc. Med. Intern.*, 15 ; 345-348, 2002.

WANG, J.; KRUDY, G.; HOU, T.; ZHANG, W.; HOLLAND, G.; XU, X. – **Development of Reliable Aqueous Solubility Models and Their Application in Druglike Analysis.** *J. Chem. Inf. Model.*, 47, 1395-1404, 2007.

WALSH, T. R; ROBIN, A.H. - **The Prevalence And Mechanisms Of Vancomycin Resistance In Staphylococcus Aureus** ; *Ann. Rev.Microbiol.*, 56, 657–675, 2002.

WALSH, C. - **Molecular Mechanisms that Confer Antibacterial Drug Resistance.** *Nature*, 406, 775-781, 2000.

WERMUTH, C.G. - **The Practice of Medicinal Chemistry.** *Elsevier Academic Press*, 2003.

WRIGHT, G. D. - **The Antibiotics Resistome: the Nexus of Chemical and Genetic Diversity.** *Nature Reviews*, 5,175-186, 2007.

WRIGHT, G.D. - **Bacterial Resistance to Antibiotics: Enzymatic Degradation and Modification.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1451-1470, 2005.