

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACOS
DERIVADOS DE METRONIDAZOL

ANTONIO TÁVORA DE ALBUQUERQUE SILVA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin

ARARAQUARA – SP

2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACOS
DERIVADOS DE METRONIDAZOL

ANTONIO TÁVORA DE ALBUQUERQUE SILVA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin

ARARAQUARA – SP

2002

Ficha Catalográfica

Elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP-Campus de Araraquara

Silva, Antonio Távora de Albuquerque.
S586 Síntese de pró-fármacos derivados de metronidazol./ Antonio Távora de
Albuquerque Silva. – Araraquara, 2002.
90 f.

Linha pesquisa: Desenvolvimento de fármacos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências
Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Chung Man Chin.

1. Metronidazol - Pró-fármaco. 2. Latenciação. 3. Química farmacêutica. I. Chung Man Chin, orientadora. II. Título.

CDD:615.19

CAPES: 4030000-5

Candidato: Antonio Távora de Albuquerque Silva.

Título da Dissertação: Síntese de pró-fármacos derivados de metronidazol.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 11/12/2002, consideraram o candidato:

() REPROVADO

(X) APROVADO *com Distinção e Louvor*

1) Examinador (*Prof. Dr. Wagner Vilegas*) _____

2) Examinador (*Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolito*) _____

3) Presidente (*Profa. Dra. Chung Man Chin*) _____

*“Even the smaller of persons can change
the course of the future”*

The Lord of the Rings: the fellowship of
the ring. (Tolkien)

AGRADECIMENTOS

A DEUS, a Nossa Senhora e todos os santos por tudo que me concederam e concederão;

A minha Família que me deu segurança e incentivo para viajar mais de 2700 Km para estudar na FCF Unesp – Araraquara;

Ao Centro de Ensino Superior do Pará (CESUPA), que me liberou para desenvolver este trabalho e no qual ganhei 4 anos de experiência como docente;

A CAPES, pois graças ao seu auxílio financeiro, na forma de bolsa de estudo, esta pesquisa pode ser desenvolvida com tranquilidade;

A Profa. Dra. Chung Man Chin, pela valiosa orientação técnico-científica e profissional, sendo muitas vezes mais do que uma simples orientadora. Mostrando-se uma amiga de todos, estando sempre pronta a ajudar a quem precise, independentemente de sua titulação;

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas pela disciplina de espectrometria, pelo auxílio na interpretação dos espectros e pela grande contribuição a esta dissertação durante a qualificação e defesa;

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira (UFSCar) pela obtenção dos espectros de RMN, sem os quais seria impossível a elucidação estrutural dos compostos aqui sintetizados;

A Profa. Dra. Eliana Varanda por ter aberto as portas de seu laboratório, para a avaliação mutagênica dos compostos obtidos neste trabalho, e por sua grande contribuição a este durante a qualificação;

A Profa. Dra. Adélia Emíla de Almeida, pelas importantes sugestões técnico científicas e amizade;

Ao Prof. Dr. José Carlos Nassute, pela compreensão e pelo valioso espaço cedido em sua sala e computador;

Aos membros da banca de qualificação e de defesa pela contribuição significativa para o aprimoramento deste, em especial ao Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolito;

A Maria do Rosário Guerra de Araújo, Luciene Regina de Araújo e Luiz Eduardo dos Santos, por todo o apoio técnico no desenvolvimento e acompanhamento das sínteses desta pesquisa;

Aos pós-graduandos Lúcia Fioravanti de Castro, Elias José da Silva, Gisele Lima Bachiega, Luciana M M Trevizani, Eduardo Testa, João Marcelo Nabas, Regiane Rocha Gonçalves e Alberto Camilo Alécio, pelo incentivo e discussões técnicas durante e ao término deste trabalho;

A toda equipe do *Lapdesf* (Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos), pela confiança depositada. em especial a estagiária Andressa Munhoz;

A toda equipe do laboratório de mutagênese (Unesp), pelo auxílio técnico, em especial a Marisa Fernandes e Soraya Duarte Varela;

A toda equipe da biblioteca da FCF (Unesp), pelo auxílio na busca e aquisição do material bibliográfico utilizado durante o trabalho;

A toda equipe de pós-graduação, em especial a Cláudia Lúcia Molina e Sônia Ornallas Silva, pelo excelente trabalho e valiosas orientações frente a secretaria da pós-graduação;

Aos amigos Adriana Taveira, Carlos Maciel, Érika Tonelli “Maria”, Leandro Barbosa, Alex Heller “Manuel”, Rosely Scodeler, Eliana Pavan e Regina Bonifácio da Silva pela amizade e apoio em todos os sentidos para a conclusão deste trabalho;

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente ao desenvolvimento deste trabalho, incluindo os amigos de Belém, *Nuer*, argentinos, professores da Unoeste e funcionários da Unesp.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE QUADROS.....	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ESQUEMAS	ix
LISTA DE ESPECTROS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVO	5
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Metronidazol.....	6
3.1.1. Histórico.....	6
3.1.2. Espectro de ação.....	9
3.1.3. Mecanismo de ação.	11
3.1.4. Mutagenicidade.	13
3.1.5. Resistência bacteriana.....	15
3.1.6. Relação estrutura atividade (SAR).....	24
3.1.7. Síntese do metronidazol.	26
3.2. Planejamento de pró-fármacos de metronidazol.	27
3.2.1. Latenciação.	27
3.2.2. Derivados do metronidazol.....	32

IV. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Material.....	36
4.2. Métodos.....	38
4.2.1. Métodos de síntese dos derivados do metronidazol.	38
4.2.2. Métodos analíticos.	40
4.2.3. Teste de Ames para atividade mutagênica.	41
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Identificação do fármaco matriz.....	43
5.2. Obtenção dos compostos A, B e C.	46
5.3. Identificação dos compostos A, B e C.	50
5.4. Obtenção do composto D.	63
5.5. Atividade mutagênica.	68
VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	74
VII. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	75
7.1. Síntese do composto A.....	75
7.2. Síntese do composto B.	76
7.3. Síntese do composto C.	77
7.4. Síntese do composto D.....	78
7.5. Teste de Ames para atividade mutagênica.	79
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AMG	Ágar Mínimo Glicosado
CCD	Cromatografia em camada delgada
CHO	Células de Ovário de Hamster
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FTR	Fator de Transferência de Resistência
HMBC	Coerência heteronuclear em ligações múltiplas
HSQC	Coerência heteronuclear simples quântica
IR	Espectrometria de Infravermelho
MDZ	metronidazol
N	Normal ou normalidade
NPD	4-nitro-fenilenediamina
RM	Razão de mutagenicidade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UV	Espectrometria de Ultravioleta
VB	Vogel Bonner E
X	Contaminante

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Espectro de ação do metronidazol	09
Quadro 2: Protozoários e bactéria sensíveis ao metronidazol	10
Quadro 3: Efeitos do grupo nitro na molécula do metronidazol	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do imidazol e de seu derivado, o metronidazol ...	07
Figura 2: Estrutura química dos diversos derivados imidazólicos	08
Figura 3: Representação esquemática do mecanismo de ação do metronidazol	12
Figura 4: Seleção de mutantes resistentes a um antibiótico durante a terapia antimicrobiana	16
Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de resistência mediada por mutações cromossômicas	17
Figura 6: Representação esquemática do fator R (Plasmídio), r-determinante e FTR	18
Figura 7: Representação esquemática do mecanismo de resistência mediada por plasmídios	19
Figura 8: Foto ilustrando a troca de material genético entre duas células de <i>E. coli</i> durante a conjugação por meio do <i>Sex pillus</i> . Uma é a célula doadora do material genético e a outra é a receptora	19
Figura 9: Representação esquemática da migração do Transposon no cromossomo para o plasmídio	20
Figura 10: Representação esquemática do mecanismo de transferência do gene que confere a resistência a determinado antimicrobiano entre plasmídios (1) e entre plasmídio e cromossomo (2)	21
Figura 11: Representação esquemática dos mecanismos comuns de resistência bacteriana a antimicrobianos	22
Figura 12: Esquema de síntese do metronidazol	26
Figura 13: Diferenças entre fármaco, pró-fármaco e análogo	29
Figura 14: (a) Fosfato de metronidazol e (b) sal hidrocloreto de <i>N,N</i> -dimetilglicinato de metronidazol	32
Figura 15: Pró-fármacos de ésteres duplos de metronidazol.	34
Figura 16: Triéster de metronidazol	34

Figura 17: Três ésteres de metronidazol sintetizados por Mahfouz e Hassan ..	35
Figura 18: Representação esquemática do teste de Ames	41
Figura 19: Atividade mutagênica do metronidazol, utilizando a linhagem de <i>S. typhimurium</i> TA-98, TA-100 e YG-1024 na ausência de ativação metabólica ...	69
Figura 20: Atividade mutagênica do metronidazol e seus derivados, utilizando a linhagem de <i>S. typhimurium</i> TA-100 na ausência de ativação metabólica	70
Figura 21: Atividade mutagênica do metronidazol e seus derivados, utilizando a linhagem de <i>S. typhimurium</i> TA-100 na presença de ativação metabólica	72
Figura 22: Imagem obtida do sistema ProtoCOL Colony Counter dos controles negativos, positivo e espontâneo	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos reversíveis utilizados no desenvolvimento de pró-fármacos ...	31
Tabela 2: Bandas de absorção do espectro no infravermelho do metronidazol ..	43
Tabela 3: Atribuições dos sinais de RMN ¹ H em CH ₃ OH-d ₄ do metronidazol	45
Tabela 4: Rendimentos obtidos das sínteses dos compostos A – C	48
Tabela 5: Bandas de absorção do espectro no infravermelho do Composto A ...	52
Tabela 6: Atribuições dos sinais de RMN ¹ H em CH ₃ OH-d ₄ do Composto A...	53
Tabela 7: Atribuições dos sinais de RMN ¹³ C em CH ₃ OH-d ₄ do Composto A...	54
Tabela 8: Bandas de absorção do espectro no infravermelho do Composto B	55
Tabela 9: Atribuições dos sinais de RMN ¹ H em CH ₃ OH-d ₄ do Composto B...	56
Tabela 10: Bandas de absorção do espectro no infravermelho do Composto C .	59
Tabela 11: Atribuições dos sinais de RMN ¹ H em CH ₃ OH-d ₄ do Composto C..	60
Tabela 12: Rendimento obtido das sínteses do composto D	63
Tabela 13: Bandas de absorção do espectro no infravermelho do Composto D .	65
Tabela 14: Atribuições dos sinais de RMN ¹ H em CH ₃ OH-d ₄ do Composto D.	66
Tabela 15: Atribuições dos sinais de RMN ¹³ C em CH ₃ OH-d ₄ do Composto D	67
Tabela 16: Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão (M ± SD) do número de revertentes / placa e razão de mutagenicidade (RM) do metronidazol utilizando as linhagens de <i>S. typhimurium</i> TA-98, TA-100 e YG ¹⁰²⁴ na ausência de ativação metabólica (-S9)	68
Tabela 17: Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão (M ± SD) do número de revertentes / placa e razão de mutagenicidade (RM) do metronidazol e seus derivados utilizando a linhagem de <i>S. typhimurium</i> TA-100 na ausência de ativação metabólica (-S9)	70
Tabela 18: Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão (M ± SD) do número de revertentes / placa e razão de mutagenicidade (RM) do metronidazol e seus derivados utilizando a linhagem de <i>S. typhimurium</i> TA-100 na presença de ativação metabólica (+S9)	71

Tabela 19: Porcentagem (%) de redução da atividade mutagênica utilizando a linhagem de *S. typhimurium* TA-100 na ausência (-S9) e na presença de ativação metabólica (+S9) dos derivados de metronidazol 73

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema A: Síntese do composto A	38
Esquema B: Síntese do composto B	39
Esquema C: Síntese do composto C	39
Esquema D: Síntese do composto D	39

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1: Infravermelho do metronidazol (KBr)	44
Espectro 2: RMN ^1H do metronidazol em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$	45
Espectro 3: Infravermelho do Composto A (KBr)	52
Espectro 4: RMN de ^1H do Composto A em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$	53
Espectro 5: RMN de ^{13}C do Composto A em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$	54
Espectro 6: Infravermelho do Composto B (KBr)	55
Espectro 7: RMN de ^1H do Composto B em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$	56
Espectro 8: HSQC do Composto B em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$	57
Espectro 9: HMBC do Composto B em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$	58
Espectro 10: Infravermelho do Composto C (KBr)	59
Espectro 11: RMN de ^1H do Composto C em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$	60
Espectro 12: HSQC do Composto C em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$	61
Espectro 13: HMBC do Composto C em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$	62
Espectro 14: Infravermelho do Composto D (KBr)	65
Espectro 15: RMN de ^1H do Composto D em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$	66
Espectro 16: RMN de ^{13}C do Composto D em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$	67

RESUMO

Em terapêutica, cada fármaco produz uma série de efeitos, sendo usualmente, apenas um associado ao objetivo primário da farmacoterapia e todos os efeitos secundários referidos como indesejáveis. Para compostos contendo nitrogrupos, um destes efeitos é a mutagenicidade, a qual está relacionada com a gênese de metaplasias, carcinomas e na promoção do surgimento de cepas bacterianas resistentes. Dentre tais compostos encontra-se o metronidazol, um antimicrobiano de amplo espectro, largamente utilizado no mercado brasileiro, que possui atividade mutagênica para bactérias e sistemas eucariontes primitivos, e que em doses terapêuticas produz dano no DNA de linfócitos circulantes.

Com a finalidade de reduzir os efeitos tóxicos, os processos de modificação molecular são amplamente utilizados. Entre eles, merece destaque a latenciação, definida como a transformação do fármaco em forma de transporte inativo (pró-fármaco) que, *in vivo*, sofre biotransformação, liberando a porção ativa no local de ação ou próximo dele.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi obter pró-fármacos de metronidazol e estudar a influência desta modificação molecular na atividade mutagênica. Para tanto foram sintetizados os compostos: ácido 4-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etóxi]-4-oxobutanóico (**A**), ácido 5-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etóxi]-5-oxopentanóico (**B**), ácido {2-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etóxi]-2-oxoetóxi} acético (**C**) e ácido [2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etóxi] acético (**D**), os quais foram submetidos ao teste de Ames para avaliar seus potenciais mutagênicos. Os resultados demonstraram que todos os compostos sintetizados mostraram significativa redução de tal efeito quando comparados ao fármaco matriz (metronidazol).

ABSTRACT

In therapeutic, each drug produces several effects, but usually, just one is associate to the primary objective of the drug therapy, and the secondary effects are referred as undesirable. In compounds with nitrogroups, one of these effects is mutagenicity, which is related with metaplasias genesis, carcinomas and in the promotion of bacterial resistance strain. One of such compound is metronidazole, an antimicrobial with wide spectrum, broadly used in the Brazilian market, that has possesses mutagen activity for bacteria and primitive systems, and that in therapeutic doses produces DNA damage in circulating lymphocytes.

With the purpose to reduce the toxic effects, the processes of molecular modification are used thoroughly. Among them, latentiation, defined as the transformation of the drug in a inactive transport form (prodrug) that, *in vivo*, after enzymatic cleavage, release the active portion *in situ*.

In this way, the objective of this research was to obtain metronidazole prodrugs, and study the molecular modification on mutagen activity. Were synthesized the compounds: 4-[2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)etoxi]-4-oxobutanoic acid (**A**), 5-[2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)etoxi]-5-oxopentanoic acid (**B**), {2-[2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)etoxi]-2-oxoetoxic}acetic acid (**C**) and [2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)etoxi] acetic acid (**D**). Mutagenic activity were evaluated by Ames test and the results showed that all synthetized compounds decreased mutagenic effect when compared to the main drug (metronidazole).

I. INTRODUÇÃO

Durante os últimos 25 anos, um alarmante número de cepas bacterianas tem desenvolvido resistência a diversos agentes antimicrobianos. Microbiologistas do setor de Saúde Pública observaram a associação do aumento de bactérias resistentes com a elevação dos casos de doenças do trato intestinal, urinário, do sistema pulmonar e de pele, sendo as crianças os pacientes mais vulneráveis (Alcama, 2001).

Patologias como pneumonia bacteriana, tuberculose, faringite, laringite e gonorréia, que seriam de fácil tratamento com doses simples de antimicrobianos, atualmente, são de difícil tratamento (Alcama, 2001).

O maior problema associado à quimioterapia é a seleção de microrganismos resistentes, pois os microrganismos podem sofrer mutação de forma espontânea contra qualquer agente em seu meio, uma vez a cada 10^5 a 10^{10} divisões celulares (Jensen *et al*, 1997).

Devido a essa alta e rápida taxa de multiplicação, a probabilidade de um microrganismo sofrer mutação por um agente antimicrobiano é muito alta.

Nessas condições, o mutante pode se multiplicar rapidamente na presença do agente antimicrobiano, produzindo uma nova população de microrganismos resistentes (Jensen *et al*, 1997).

Quando a penicilina G foi inicialmente introduzida, cerca de 3% das cepas de *S. aureus* eram resistentes a ela. Mas com o elevado uso deste antimicrobiano, mensurado em centenas de toneladas por ano, houve a eliminação progressiva das cepas sensíveis, estimando-se atualmente que 90% ou mais das cepas de *S. aureus* já são resistentes a penicilina G (Nester *et al*, 2001).

A resistência aos antimicrobianos é uma questão de grau. Na prática médica, o termo resistente é definido como, “aquele organismo que não é inibido ou destruído por um antimicrobiano estando na presença do mesmo em

concentrações normais do fármaco após a administração do mesmo” (Roitt *et al*, 1999).

O surgimento de cepas resistentes aos antimicrobianos, tem sido fator constante na diminuição do valor terapêutico dos mesmos (Trabulsi *et al*, 2000).

Durante o tratamento de um processo infeccioso, os antimicrobianos podem selecionar mutantes previamente existentes que mantêm o processo infeccioso (Trabulsi *et al*, 2000).

A seleção de mutantes resistentes pode ser prevenida pela associação de dois ou mais fármacos, tendo-se como fundamento o fato de que mutantes resistentes a dois ou mais antimicrobianos são raros. Esta conduta terapêutica é muito empregada no tratamento da tuberculose, podendo ser aplicada no tratamento de outras infecções (Trabulsi *et al*, 2000).

Atualmente, o mundo todo reconhece como uma grande ameaça ao tratamento de doenças infecciosas, que representam risco à vida, a incrível capacidade das bactérias em desenvolver resistência a cada novo antimicrobiano utilizado. Além do fato de que nos dias de hoje, diferentemente de 1940, há uma progressiva redução no ritmo de descoberta de novos antimicrobianos (Roitt *et al*, 1999).

São diversos os fatores humanos que levam à resistência aos antimicrobianos, como por exemplo, o uso dos mesmos: (1) de forma incorreta e extensiva pelos médicos, (2) em resfriados e gripes, (3) para profilaxia após cirurgias e em pacientes imunodeprimidos, (4) na nutrição animal, (5) em tratamentos longos contra acne, (6) por pacientes com dificuldade de seguir o tratamento prescrito, (7) pela automedicação e (8) pela disseminação de bactérias resistentes através de regiões geográficas distintas (Alcama, 2001; Tortora *et al*, 2002).

Normalmente, linhagens de bactérias resistentes são comuns à indivíduos que trabalham em ambientes hospitalares. Nestes locais, a utilização de antimicrobianos é, muitas vezes, indiscriminada. (Tortora *et al*, 2002).

Entretanto, em países em desenvolvimento, a resistência a esses fármacos é mais comum, pois esta disseminação não é restrita aos hospitais, mas também devido ao largo consumo sem prescrição médica e onde as condições sanitárias não são adequadas (Alcama, 2001; Nester *et al*, 2001).

Alguns países como México, Guatemala e Brasil, permitem a venda de antimicrobianos potentes no balcão, facilitando o desenvolvimento da resistência bacteriana (Alcama, 2001).

Entre 1968 e 1971, cerca de 12.000 pessoas morreram na Guatemala de infecção por *Shigella dysenteriae* resistente a antimicrobianos (Alcama, 2001).

Aliado ao problema da resistência bacteriana, também observa-se a transferência de tal resistência entre as bactérias por meio de plasmídios e / ou transposons, salientando que tal transferência pode ocorrer entre bactérias de espécies distintas, prejudicando os protocolos de tratamento já padronizados (Alcama, 2001; Nester *et al*, 2001).

Os antimicrobianos já foram considerados fármacos “milagrosos”, mas em vista do fator de resistência esse ponto de vista não permanece, tendo sido sugerido por alguns pesquisadores o controle restrito dos antimicrobianos de forma semelhante aos dos narcóticos (Alcama, 2001).

A resistência bacteriana emergente é um desafio aos pesquisadores atuais, tendo-se como possibilidades para enfrentá-la: (1) melhorar o sistema imune do hospedeiro, (2) o uso de bacteriófagos para inibir o crescimento de determinadas bactérias e (3) a busca de novos fármacos capazes de vencer a resistência bacteriana (Alcama, 2001).

Segundo dados recentes, o metronidazol, um antimicrobiano imidazólico de amplo espectro, é também um potente agente mutagênico para bactérias e sistemas eucariontes primitivos, sendo utilizado como controle positivo em artigos que utilizam o teste de Ames para verificar atividade mutagênica (Zhang & Wang, 2000; Menéndez *et al*, 2001).

O grande responsável pela atividade antiparasitária, antimicrobiana e mutagênica do metronidazol é seu grupo nitro (NO₂) que também causa dano no DNA de linfócitos (humanos) circulantes. Contudo, estes se recuperam (reparam seu DNA) em até 15 dias após o fim do tratamento, permanecendo ainda discutível seu efeito carcinogênico (Menéndez *et al*, 2001).

Considerando o potente efeito mutagênico do metronidazol para bactérias, aliado à alta velocidade de multiplicação bacteriana e o surgimento de cepas resistentes é de suma importância o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, que apresentem além de boa atividade, um menor efeito mutagênico e conseqüentemente menor capacidade de gerar cepas resistentes.

Sendo assim, dentro do campo de busca de novos fármacos por meio de síntese orgânica, a latenciação mostra-se como um processo de modificação molecular amplamente utilizado no melhoramento das propriedades físico-químicas para otimizar a farmacocinética e reduzir a toxicidade de diversos fármacos. Além do fato de que, estudos recentes de Guido e colaboradores (2001), demonstram que a utilização desta metodologia pode diminuir o efeito mutagênico do nitrocomposto nitrofural em 300 a 400%.

II. OBJETIVO

O presente objeto de estudo utiliza o processo de latenciação para modificar a estrutura do metronidazol, a fim de obter derivados com atividade mutagênica reduzida.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Metronidazol.

3.1.1. Histórico.

A grande maioria dos agentes quimioterápicos foram introduzidos na terapêutica clínica entre os anos de 1940 a 1980, sendo que alguns já eram conhecidos no início do século XX e outros existentes há séculos bem anteriores à nossa era.

Grandes povos antigos como Maias, Incas, Hindus e Chineses já conheciam preparações antimicrobianas eficazes.

O imperador chinês Shen Nung (2735 a.c.) elaborou um livro sobre ervas terapêuticas, onde havia entre as mesmas até ervas com atividade antimalárica. O papiro de Ebers (~1500 a.c.) recomenda a utilização de substâncias dos reinos animal, vegetal e mineral e alguns desses são hoje conhecidos pela sua atividade quimioterápica.

No século IV (460-370 a.c.) Hipócrates recomendou o emprego de sais metálicos para algumas doenças, hoje atribuídas a organismos patogênicos. E, em 50 d.c., Dioscórides (grego) prescreveu produtos naturais para o tratamento dessas mesmas moléstias em seu livro *De Materia Medica*.

Galeno, em 131-201 d.c., defendeu o emprego de misturas herbáceas para qualquer tipo de moléstia. Os árabes entre os séculos VII e VIII disseminaram sua cultura e prática médica pelos países da Europa, assim como o uso da pomada mercurial. Cabe lembrar que em 1495, Cumano indicou o mercúrio para o alívio dos sintomas da sífilis.

Na Idade Média, no período de 1493 a 1541, Paracelso afirmou que o corpo humano era um grande laboratório químico e que poderia ser tratado pela administração de substâncias químicas (Korolkovas, 1988).

De Paracelso em diante, a quimioterapia europeia fez poucos avanços. E o grande novo impulso fora dado por Paul Ehrlich no período de 1854 a 1915 (**paída quimioterapia moderna**) (Korolkovas, 1988).

Os imidazóis são substâncias caracterizadas pela presença de um núcleo cíclico pentagonal contendo dois átomos de nitrogênio (*figura 1*) e o interesse por este grupo químico teve seu início com a descoberta da azomicina (2-nitroimidazol) (Tavares, 1999).

O isolamento da azomicina (2-nitroimidazol) de um estreptomiceto por Maeda e colaboradores, em 1953, e a demonstração de sua propriedade trichomonocida por Horie em 1956, gerou a síntese química e ensaios biológicos de diversos compostos nitroimidazólicos. Dentre estes, surge o metronidazol, de nome químico 1-(β -hidroxiethyl)-2-metil-5-nitroimidazol (*figura 1*) (Hardman *et al*, 2001).

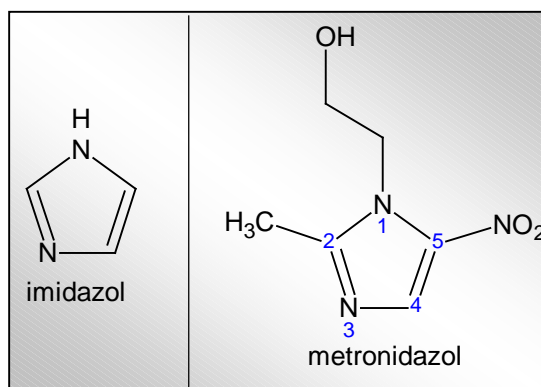


Figura 1. Estrutura química do imidazol e de seu derivado, o metronidazol.

O metronidazol foi sintetizado em 1957 por Anon no laboratório Rhône-Poulenc, tendo-se descoberto sua atividade contra *Trichomonas* spp por Cosar e Julou em 1959 e contra *Entamoeba* em 1961 (Voogd, 1981; Korolkovas, 1988; Murray *et al*, 1999).

Durel e associados em 1960 observaram atividade tricomonocida em sêmen e urina após administrações orais do fármaco e que altas taxas de cura poderiam ser obtidas em pacientes tanto do sexo masculino quanto feminino com tricomoníase. Estudos posteriores demonstraram que o metronidazol possui uma ótima atividade e utilidade clínica contra uma variedade de agentes patogênicos anaeróbios, incluindo bactérias Gram - e Gram + além de atividade contra *Giardia lamblia* (Hardman *et al*, 2001).

Em 1962, Shinn descobriu que o metronidazol possuía atividade contra bactérias anaeróbias, quando o mesmo verificou que pacientes com tricomoníase e estomatite de Vicent ficavam curados de ambas as doenças com o uso do metronidazol (Tavares, 1999).

O metronidazol foi o primeiro derivado 5-nitroimidazol introduzido na terapêutica humana e continua até hoje como o principal representante do grupo (Tavares, 1999).

Outros derivados 5-nitroimidazóis com estrutura química e atividade biológica semelhante ao metronidazol foram desenvolvidos, sendo estes: tinidazol, secnidazol e ornidazol (*figura 2*) (Murray *et al*, 1999; Hardman *et al*, 2001).

O benznidazol é outro derivado de 5-nitroimidazol que diferentemente, possui atividade contra *T. cruzi*, na Doença de Chagas (*figura 2*) (Hardman *et al*, 2001).

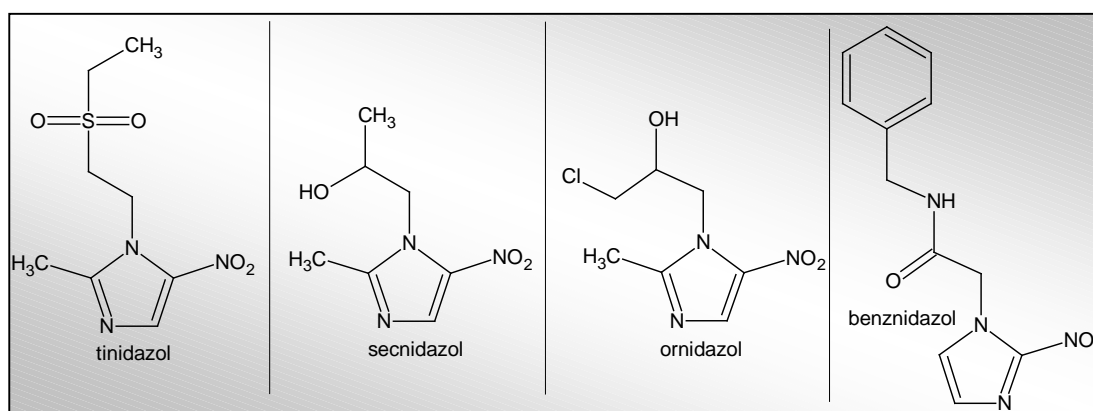


Figura 2. Estrutura química dos diversos derivados imidazólicos.

3.1.2. Espectro de ação.

O metronidazol é classificado como agente antiprotozoário e agente antibacteriano diverso (Rang *et al*, 2001). O quadro abaixo mostra o espectro de ação deste fármaco em ambas as classificações.

Quadro 1. Espectro de ação do metronidazol.

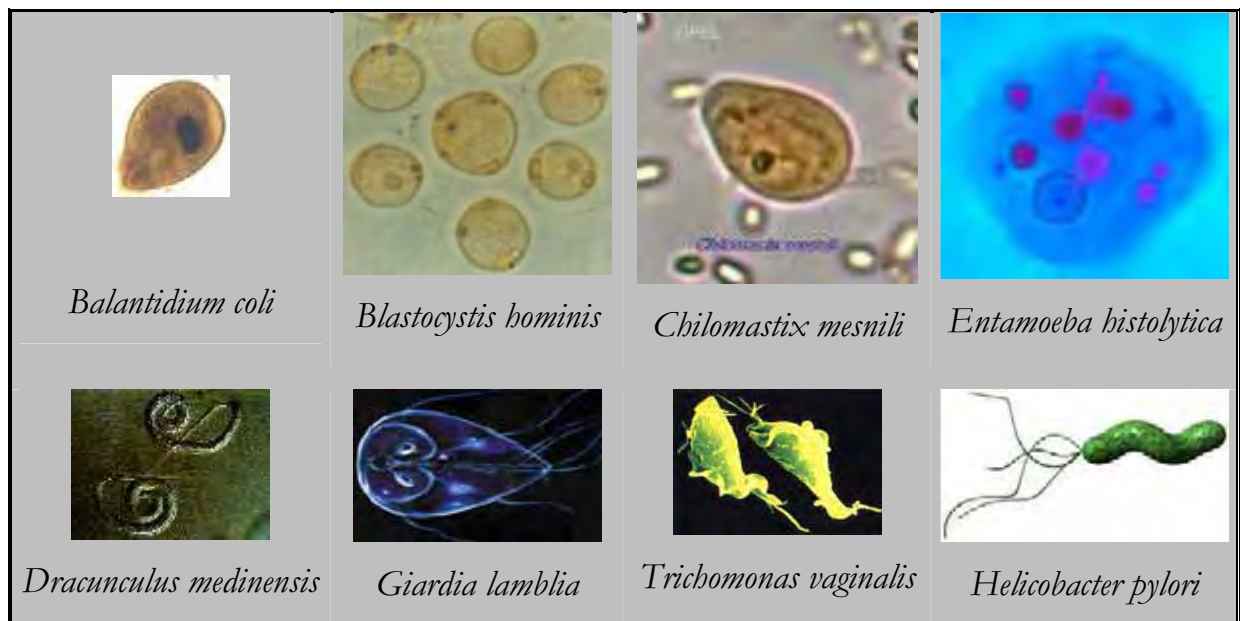
Antiprotozoário (ver quadro 2)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Balantidium coli</i>; • <i>Blastocystis hominis</i>; • <i>Chilomastix mesnili</i>; • <i>Dracunculus medinensis</i>; 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Entamoeba histolytica</i>; • <i>Giardia lamblia</i>; • <i>Trichomonas vaginalis</i>.
Antibacteriano	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Bactérias Gram -</u> ⇒ <i>Acidaminococcus</i> spp, <i>Bacteroides fragilis</i>, <i>Bacteroides distasonis</i>, <i>Bacteroides ovatus</i>, <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>, <i>Bacteroides vulgatus</i>, <i>Fusobacterium varium</i>, <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Megasphaera</i>, <i>Veillonella parvula</i>, e <i>Veillonella</i> spp. • <u>Bactérias Gram +</u> ⇒ <i>Clostridium difficile</i>, <i>Clostridium perfringens</i>, <i>Clostridium ramosum</i>, <i>Clostridium</i> spp., <i>Eubacterium</i> spp., <i>Peptococcus</i> spp. e <i>Peptostreptococcus</i> spp.; • <u>Bactérias anaeróbias facultativas</u> ⇒ <i>Gardnerella vaginalis</i> e <i>Helicobacter pylori</i>; • <i>Campylobacter</i> spp e <i>Mycobacterium tuberculosis</i>. 	

Fonte: (Cho *et al*, 1982; Korolkovas, 1988; Baron, 1991; Silva, 1998; Murray *et al*, 1999; Parfitt, 1999; Roitt *et al*, 1999; Tavares, 1999; Land & Johnson, 1999; USP DI, 1999; Barry *et al*, 2000; Salles & Salles, 2000; Trabulsi *et al*, 2000; Hardman *et al*, 2001; Rang *et al*, 2001; Tortora *et al*, 2002).

Bactérias Gram + não formadoras de esporos, geralmente são resistentes ao metronidazol.

O metronidazol pode ser usado na doença de Crohn (leve a moderada), pois o mesmo parece apresentar, também, atividade imunomodulatória (Hardman *et al*, 2001).

Quadro 2. Protozoários e bactéria sensíveis ao metronidazol.



Fonte: Google – Brasil (imagens), disponível em <http://www.google.com.br/>. Acesso em 08/08/2002.

3.1.3. Mecanismo de ação.

Como descrito, o metronidazol é um fármaco com atividade contra agentes patogênicos anaeróbios e microaerofílicos, os quais possuem elétrons provenientes de seu metabolismo energético (Baron, 1991; Drug Information, 111; Roitt *et al*, 1999; Land & Johnson, 1999; Trabulsi *et al*, 2000; Hardman *et al*, 2001; Bendesky *et al*, 2002).

Os organismos supracitados, diferentemente dos aeróbios, possuem componentes transportadores de elétrons, as ferridoxinas, pequenas proteínas Fe-S com suficiente potencial redox negativo para doar elétrons ao metronidazol (Hardman *et al*, 2001).

Organismos anaeróbios ou microaerofílicos susceptíveis ao metronidazol, geram sua energia por meio da fermentação oxidativa de cetoácidos como o pirúvico. A descarboxilação do piruvato catalisada por ferridoxina-piruvato oxidoreductase produz elétrons que reduzem a ferridoxina a qual cataliticamente doa seus elétrons para **aceptores de elétrons biológicos** ou ao **metronidazol** (Hardman *et al*, 2001).

A transferência de um único elétron forma um radical aniônico nitro (NO^-) altamente reativo, o qual elimina os organismos susceptíveis por mecanismos de metilação direcionados ao DNA e possivelmente outras biomoléculas vitais (Hardman *et al*, 2001; Bendesky *et al*, 2002; Drug Information, 111).

No *Helicobacter pylori*, o metronidazol é ativado por uma nitroreductase (proteína **RdxA**) codificada pelo gene **rdxA**, a qual reduz o grupo nitro (NO_2) doando 2 elétrons, gerando intermediários nitrosos e hidroxilamina como produto final, ambos citotóxicos para a bactéria, causando ruptura da simples fita de DNA (Van der Wouden *et al*, 2001; Jenks & Edwards, 2002).

O mecanismo de ação do metronidazol, pode ser visto resumidamente na figura 3.

O metronidazol é cataliticamente reciclado, pois a perda do elétron do metabólito ativo regenera o composto original.

Com o aumento dos níveis de O_2 , pode-se observar uma diminuição na citotoxicidade do metronidazol, devido o O_2 competir com o fármaco pelos elétrons gerados no metabolismo energético dos organismos anaeróbios.

Portanto, o O_2 é capaz de diminuir a citotoxicidade do metronidazol e de aumentar a reciclagem do fármaco ativado (Hardman *et al*, 2001).

A ausência de proteínas transportadoras de elétrons, com suficiente potencial redox para reduzir o grupo nitro (NO_2) do metronidazol em células aeróbias tornam o fármaco ineficiente para atuar contra as mesmas (Land & Johnson, 1999).

As células de mamíferos não são danificadas devido a falta de enzimas necessárias para reduzir o grupo nitro do metronidazol (Baron, 1991).

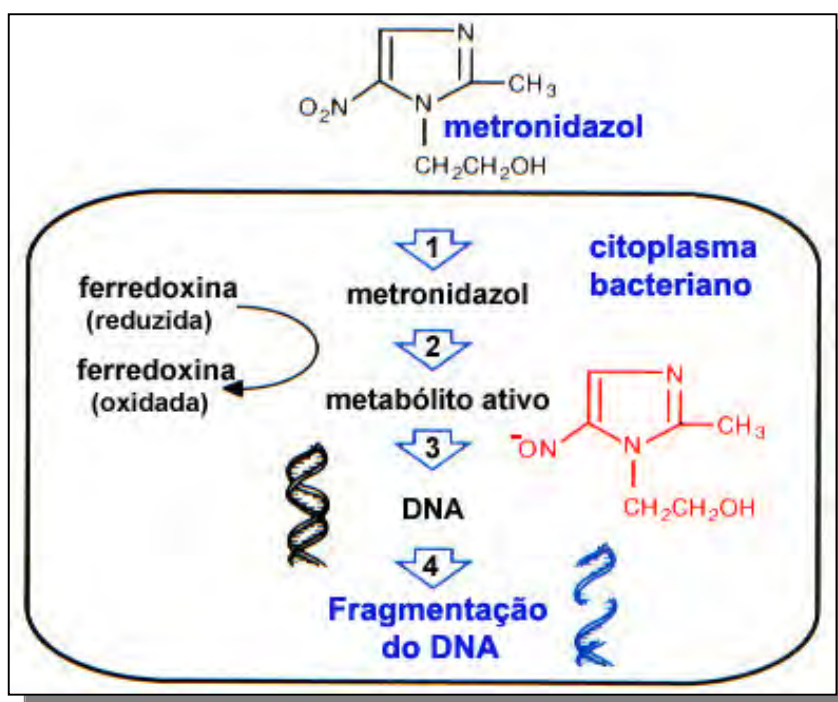


Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação do metronidazol. (modificada de Baron, 1991). Onde observa-se: (1) penetração do metronidazol pela parede e membrana celular bacteriana; (2) ação da enzima nitroreductase sobre o grupo nitro do metronidazol gerando intermediários altamente citotóxicos, mas com curta vida média; (3) ação dos intermediários (tóxicos) sobre o DNA e (4) fragmentação do DNA do microrganismo.

3.1.4. Mutagenicidade.

Mutação é toda alteração do material genético de uma célula que não resulta de segregação ou recombinação. Quando não é letal a própria célula, ela pode propagar-se pelo corpo em crescimento (mutação somática) ou transmitir-se às gerações (mutação germinal). A mutação pode ser espontânea ou induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos; incidindo sobre células somáticas, pode levar a um processo carcinogênico no próprio indivíduo. Se ocorrer em células germinativas, pode produzir doenças ou malformações nas gerações futuras (Maron & Ames, 1983).

As mutações e neoplasias estão estreitamente associadas, porque ambas representam alterações abruptas em uma única célula, permanentes e herdadas pelas células-filhas. Por isso os testes de mutagenicidade são recomendados para pré seleção de agentes químicos (Maron & Ames, 1983).

Em 1974, Voogd e colaboradores verificaram a evidente atividade mutagênica do metronidazol e de outros imidazóis frente a testes em *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* e *Citrobacter freundii*.

Existem algumas controvérsias no que se diz respeito a carcinogenicidade do metronidazol (Cho *et al*, 1982), mas sabe-se que o mesmo é cancerígeno para roedores, contudo nenhum risco real foi ainda verificado para humanos, faltando a realização de mais experimentos para confirmar tal informação (Jenks & Edwards, 2002).

O metronidazol tem se mostrado como potente agente mutagênico para bactérias e sistemas eucariontes primitivos, atuando principalmente por substituições de pares de base (Menéndez *et al*, 2001).

A relação estrutura atividade mutagênica do metronidazol e dos 5-nitroimidazóis estão relacionados ao fato da presença do grupo nitro (NO₂), assim como a substituição em N-1 e/ou N-3, onde neste último caso, a atividade mutagênica pode ser completamente inibida (Rosenkranz *et al*, 1976; Voogd, 1981).

O efeito mutagênico do metronidazol é amplificado pela ativação microsomal, sendo necessário uma redução enzimática do grupo nitro (NO₂) para dar origem aos produtos intermediários mutagênicos, processo este, não tão comum em células de mamíferos (Voogd, 1981; Menéndez *et al*, 2001).

Nas células humanas, o metronidazol não induz seja *in vitro* ou *in vivo* a troca entre cromátides irmãs ou indução de micronúcleos (Menéndez *et al*, 2001).

Contudo Mudry e colaboradores em 1995, relatam que o metronidazol possui um efeito clastogênico, verificado por aumento de aberrações cromossômicas e indução de micronúcleos, em células CHO e em linfócitos humanos.

A capacidade do metronidazol e de seus metabólitos de produzir quebras no DNA de células humanas tem sido discutida.

Em 1991, Reitz e colaboradores verificaram que o metronidazol provocou a quebra do DNA de linfócitos humanos em pacientes tratados com 4800mg do fármaco. Tal dano foi reparado 7 dias após o término da terapia com o metronidazol. Estes pesquisadores também verificaram a quebra do DNA simples fita de linfócitos humanos em meio de cultura, dado esse confirmado em 1997 por Ré e colaboradores.

Outro estudo feito por Fahrig e colaboradores (1997), demonstra que não há diferenças entre os danos no DNA antes e após o tratamento com o metronidazol, contudo tais dados foram questionados devido ao não controle de fatores como: sexo, idade, peso e tipo de infecção (Menéndez *et al*, 2001).

Por fim, Menéndez e colaboradores (2001), confirmaram os dados de Reitz e colaboradores (1991), concluindo que doses terapêuticas de metronidazol produzem dano no DNA de linfócitos circulantes. Contudo, o dano parece ter sido reparado 15 dias após o fim do tratamento, com exceção de dois pacientes.

Ainda faltam estudos para saber se os danos causados pelo metronidazol ao DNA podem auxiliar na gênese de neoplasmas (Bendesky *et al*, 2002).

3.1.5. Resistência bacteriana.

A capacidade de adquirir resistência e o grau de resistência adquirida é muito variável entre as bactérias, pois enquanto algumas adquirem resistência com mais frequência outras adquirem a resistência de forma mais rara, podendo esta ser de moderada a intensa.

Quando a resistência é moderada a bactéria pode ser eliminada com um simples aumento de dose, uma vez que mesmo possuindo mecanismos de defesa contra o fármaco, este não consegue sobrepujar quantitativamente a concentração do fármaco no local de ação, mas quando a resistência é intensa, o antimicrobiano não pode ser usado, pois por mais que se aumente a concentração do fármaco no local de ação, o mecanismo de defesa parasitário já é tão eficiente, que sobrepuja o aumento de dose (Trabulsi *et al*, 2000).

Quanto a vulnerabilidade aos antimicrobianos, as bactérias podem ser classificadas em sensíveis ou resistentes.

As bactérias sensíveis são aquelas que não crescem, *in vitro*, na presença da concentração plasmática média que os antimicrobianos atingem em tal fluido após administração oral. Ao contrário das resistentes, que crescem em tais concentrações (Roitt *et al*, 1999; Trabulsi *et al*, 2000).

A resistência bacteriana pode ser classificada em natural (inata) ou adquirida.

A resistência natural corresponde a uma característica da espécie bacteriana, ou seja, todas as amostras da espécie, independente do local de isolamento, são sempre resistentes. Diferentemente da resistência adquirida, onde somente parte das amostras são resistentes, dependendo do local de coleta e da intensidade do uso.

Como exemplo de resistência natural temos a *Escherichia coli*, que é resistente a benzilpenicilina. E de resistência adquirida, a mesma *E. coli* com cepas resistentes a ampicilina.

De uma forma geral, a resistência natural bacteriana é alcançada, devido a incapacidade dos mesmos em atingir seu sítio de ação, seja por não existir alvo

suscetível ou por ser impermeável ao agente antimicrobiano (Roitt *et al*, 1999; Trabulsi *et al*, 2000; Nester *et al*, 2001).

A resistência adquirida é um fenômeno casual da bactéria, onde o antimicrobiano funciona como um simples seletor das cepas resistentes. Tal resistência é decorrente de uma alteração genética expressada bioquimicamente. Enfatizando que as bactérias resistentes são capazes de crescer na presença do antimicrobiano, tomando o espaço das sensíveis (*figura 4*).

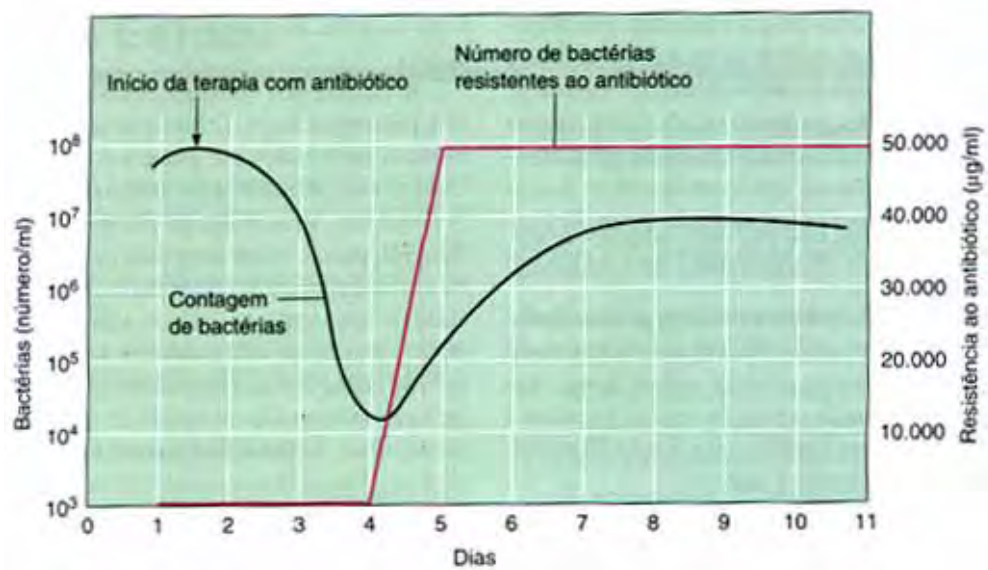


Figura 4. Seleção de mutantes resistentes a um antibiótico durante a terapia antimicrobiana. (Tortora *et al*, 2002).

As alterações genéticas podem ser determinadas por mutações cromossômicas ou por aquisição de *fatores R* (plasmídios) (Jensen *et al*, 1997; Trabulsi *et al*, 2000; Nester *et al*, 2001).

⊗ Resistência cromossômica.

É mediada por mutações cromossômicas, sendo geralmente simples, levando a resistência a um antimicrobiano, pois dificilmente ocorrem mutações simultâneas (figura 5) (Trabulsi *et al*, 2000).

Na presença do antimicrobiano, estes mutantes espontâneos possuem uma vantagem seletiva, sobrevivendo e superando em número a população suscetível. Tais bactérias podem infectar outros pacientes por infecção cruzada ou migrar para outros tecidos do mesmo paciente (Roitt *et al*, 1999).

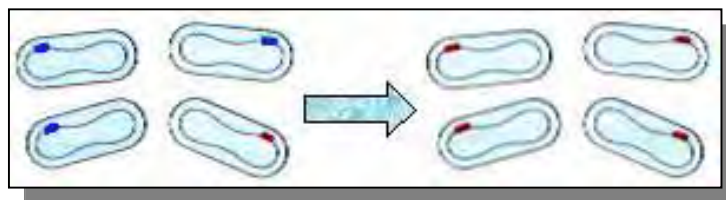


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de resistência mediada por mutações cromossômicas (modificada de Roitt *et al*, 1999).

⊗ Resistência extracromossômica.

Tem sido a mais estudada, uma vez que sua importância é maior, já que fornece resistência a um maior número de agentes antimicrobianos (Trabulsi *et al*, 2000; Tortora *et al*, 2002).

É mediada por fatores R, pois além da sobrevivência das bactérias aos antimicrobianos, baseada na mutação cromossômica ao acaso, estes organismos também podem adquirir genes para resistência por *plasmídios transferíveis* também conhecidos como *fatores R* (Jensen *et al*, 1997; Roitt *et al*, 1999; Alcamo, 2001).

Os **fatores R** são plasmídios que transportam um ou mais grupos de genes que codificam resistência a um ou mais antimicrobianos, estes plasmídios foram descobertos no Japão na década de 50 (~1955) após várias epidemias de disenteria, onde detectou-se que o agente patogênico era resistente a vários antibióticos

utilizados na época. Mas, atualmente é sabido que tal evento é comum a todo o mundo bacteriano (Alcamo, 2001; Nester *et al*, 2001; Tortora *et al*, 2002).

Muitos **fatores R** contém 02 grupos de genes: um responsável pela resistência antimicrobiana (**r-determinante**) e outro responsável pela conjugação e replicação do plasmídeo sendo este último denominado Fator de Transferência de Resistência (**FTR**) (*figura 6*) (Roitt *et al*, 1999; Nester *et al*, 2001; Tortora *et al*, 2002).

Dois plasmídios dentro de uma mesma célula bacteriana podem, se necessário, sofrer recombinação para unir os grupos de genes FTR e r-determinante (Nester *et al*, 2001).

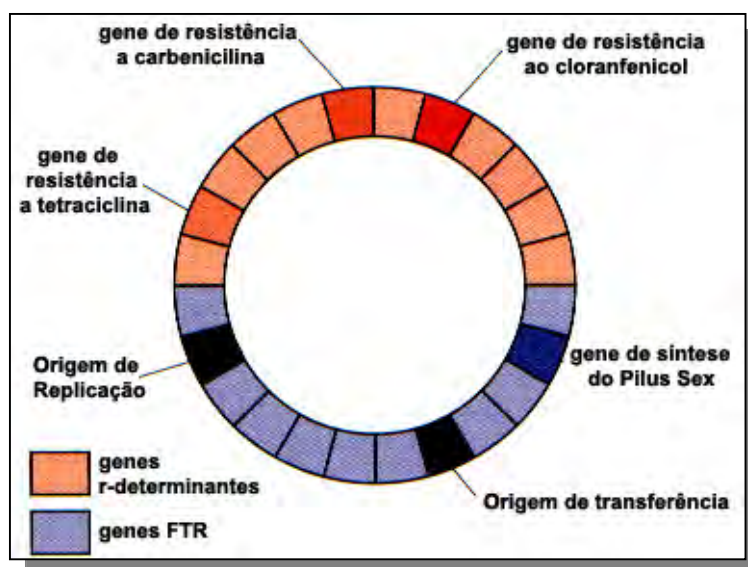


Figura 6. Representação esquemática do fator R (Plasmídeo), r-determinante e FTR (modificada de Nester *et al*, 2001).

A resistência extracromossômica pode ser simples, mas na maioria das vezes é múltipla, conferindo à bactéria, resistência a dois ou até seis antimicrobianos, devido à presença de genes de resistência de vários antimicrobianos em um único plasmídeo (*figura 7*) ou em plasmídios diferentes dentro de uma mesma bactéria. Tal tipo de resistência é mais observada em hospitais onde o uso de antimicrobianos é intenso (Jensen *et al*, 1997; Roitt *et al*, 1999; Trabulsi *et al*, 2000; Nester *et al*, 2001).



Figura 7. Representação esquemática do mecanismo de resistência mediada por plasmídios (modificada de Roitt *et al*, 1999)

É sabido que a resistência extracromossômica pode ser transferida durante o processo de recombinação por conjugação, podendo ser muito elevada a frequência (numero) de transferência. Sabe-se também que o fenômeno ocorre entre bactérias de espécies bastante distintas, devido um determinado plasmídio com genes de resistência ser comum a diferentes famílias de bactérias (*figura 8*) (Roitt *et al*, 1999; Trabulsi *et al*, 2000; Alcamo, 2001; Nester *et al*, 2001; Tortora *et al*, 2002).

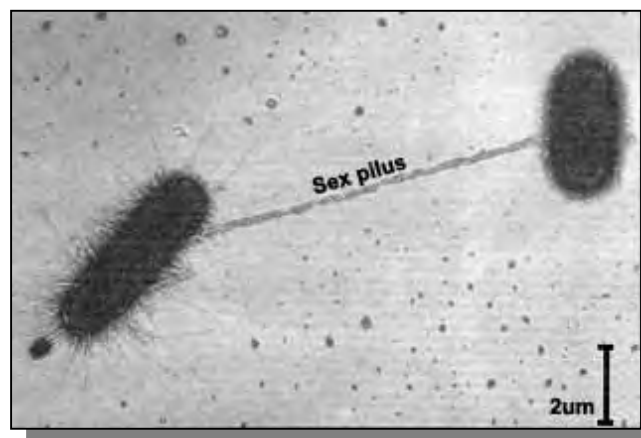


Figura 8. Foto ilustrando a troca de material genético entre duas células de *E. coli* durante a conjugação por meio do *Sex pilus*. Uma é a célula doadora do material genético e a outra é a receptora (modificada de Nester *et al*, 2001).

Bactérias que não estejam causando doença como a *E. coli* em um indivíduo sadio, podem ter a função de reservatórios de **fatores R**, os quais podem ser transferidos para bactérias patogênicas (Nester *et al*, 2001).

Como exemplo de **fator R** pode-se citar o gene TEM-1, mediado por plasmídeo, que confere resistência bacteriana contra beta-lactamases em bactérias Gram negativas, que está difundido entre as enterobactérias como a *Escherichia coli* e também conferindo resistência a penicilina e ampicilina em *Neisseria gonorrhoeae* e *H. influenzae* respectivamente (Roitt *et al*, 1999).

⊗ Transposons ou “genes saltadores”.

Tanto a resistência cromossômica quanto a extracromossômica podem ser transferidas de uma bactéria para outra por **fatores R** ou por pequenos segmentos de DNA denominados **transposons** ou “genes saltadores”, os quais são responsáveis pela resistência antimicrobiana capazes de integrar-se no cromossomo ou nos plasmídios (*figura 9*), constituindo-se num poderoso mecanismo natural para o movimento de genes de um cromossomo para outro. Cabe ainda ressaltar que os transposons contém a informação para sua própria transposição ou salto (Roitt *et al*, 1999; Trabulsi *et al*, 2000; Nester *et al*, 2001; Tortora *et al*, 2002).

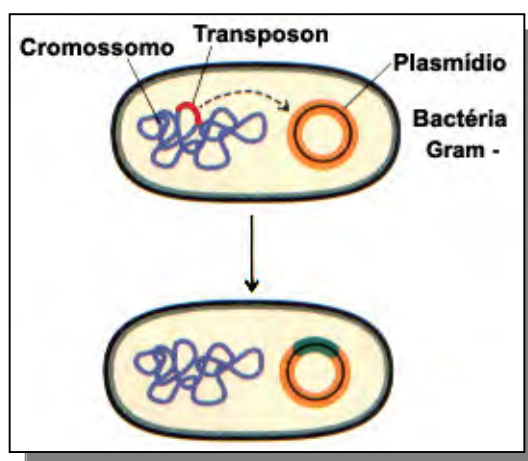


Figura 9. Representação esquemática da migração do Transposon no cromossomo para o plasmídeo (modificada de Nester *et al*, 2001).

O cromossomo é o sítio mais seguro para os genes, contudo a disseminação do gene fica condicionada a divisão celular bacteriana. Porém, quando deslocam-se para os plasmídios, conseguem uma disseminação muito mais rápida (*figura 10*).

Os transposons aumentam muito a possibilidade de migração do gene resistente, podendo deslocar-se de um cromossomo para um plasmídio (e vice versa) e entre os plasmídios: de um não transmissível para um transmissível acelerando novamente a disseminação (*figura 10*). Tal processo explica como o mesmo gene para resistência antimicrobiana pode ser encontrado em bactérias Gram negativas (*E. coli*) e Gram positivas (*Clostridium* spp) (Roitt *et al*, 1999; Nester *et al*, 2001).

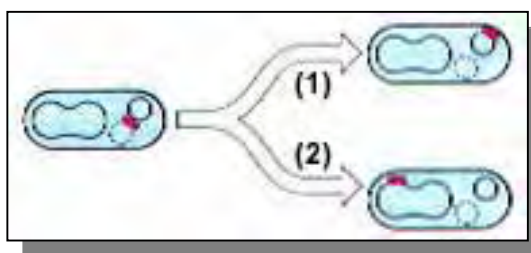


Figura 10. Representação esquemática do mecanismo de transferência do gene que confere a resistência a determinado antimicrobiano entre plasmídios (1) e entre plasmídio e cromossomo (2) (modificada de Roitt *et al*, 1999)

⊗ Mecanismos químicos de resistência.

As mutações cromossômicas e aquisição de plasmídios transferíveis, podem dar origem a uma bactéria resistente por diversos mecanismos químicos, sendo estes (figura 11) (Baron, 1991; Jensen *et al*, 1997; Roitt *et al*, 1999; Trabulsi *et al*, 2000; Alcamo, 2001; Tortora *et al*, 2002):

1. Síntese de enzimas capazes de modificar o grupamento ativo da molécula do antimicrobiano, tornando a molécula inativa (sendo este mecanismo o mais freqüente);
2. Alteração das moléculas onde se fixam os antimicrobianos;
3. Síntese de novas enzimas ou proteínas (sítio de ação) que não sofrem ação do antimicrobiano, e que possuem as mesmas funções das enzimas ou proteínas que são inativadas pelo fármaco;
4. Diminuição da permeabilidade da membrana celular bacteriana;
5. Utilização de mecanismo de efluxo para eliminação do antimicrobiano do interior da célula bacteriana;
6. Outros.

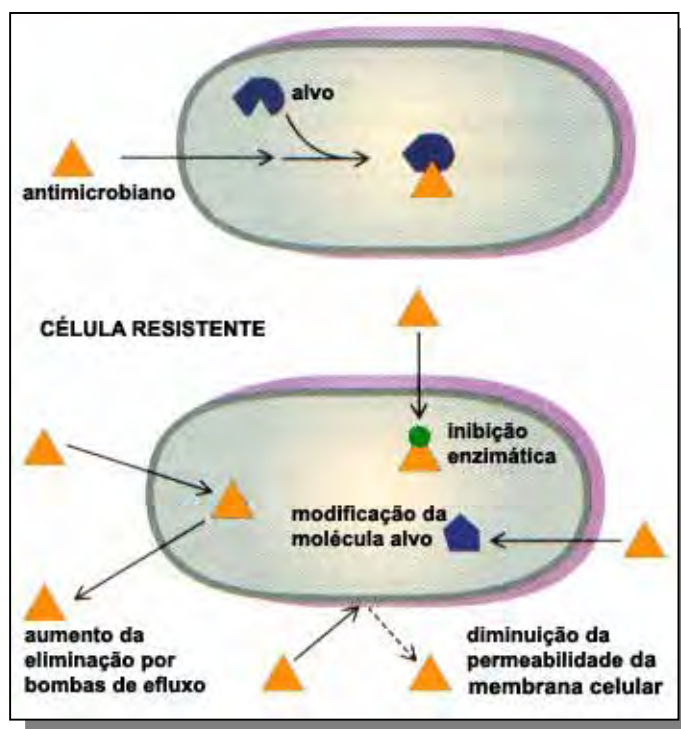


Figura 11. Representação esquemática dos mecanismos comuns de resistência bacteriana a antimicrobianos (modificada de Nester *et al*, 2001).

Os microrganismos resistentes a β -lactâmicos, macrolídeos, lincomicina, sulfonamidas, trimetoprima e as quinolonas, utilizam o mecanismo de alteração de seus receptores.

Os microrganismos resistentes a tetraciclina, fosfomicina e aminoglicosídeos, utilizam o mecanismo de diminuição da permeabilidade da membrana celular.

Os microrganismos resistentes a cloranfenicol e β -lactâmicos, utilizam o mecanismo de inativação enzimática do agente antimicrobiano (Baron, 1991).

A resistência clínica ao metronidazol é bem documentada para *T. vaginalis*; e *G. lamblia*, faltando ainda ser demonstrada para *E. histolytica* (Murray *et al*, 1999; Hardman *et al*, 2001).

Hardman e colaboradores (2001) citam que a resistência ao metronidazol, pode ser explicada por 2 processos:

- 1^o \Rightarrow pela alta concentração local de O₂;
- 2^o \Rightarrow pelos baixos níveis de ferridoxina e ferridoxina-piruvato oxidoreductase, devido diminuição da transcrição do gene que codifica a ferridoxina.

O segundo processo pode ser contornado pelo ajuste de dose seguido do prolongamento da terapia com o metronidazol, uma vez que continua existindo ferridoxina e ferridoxina-piruvato oxidoreductase no meio (Hardman *et al*, 2001).

Land e Johnson (1999) propõem 04 mecanismos de resistência do *H. pylori* contra o metronidazol, sendo estes: (1) diminuição da captação ou aumento do efluxo do fármaco, (2) deficiência na ativação do fármaco, (3) modificação da enzima alvo, (4) aumento da capacidade de reparo do DNA lesado.

A resistência ao metronidazol pelo *H. pylori* ocorre em função de mutações tipo *frameship* e alterações no quadro de leitura, assim como, inserções e deleções, no gene **rdxA** que codifica para a proteína **RdxA** (Van der Wouden *et al*, 2001; Jenks & Edwards, 2002).

A proteína **RdxA** é homóloga as nitroredutases clássicas (*NfsB*, *NfnB* e *Cnr*) das bactérias entéricas, que são capazes de reduzir compostos nitroaromáticos e o metronidazol, gerando produtos finais mutagênicos também em *Salmonella typhimurium* (Jenks & Edwards, 2002).

Recentemente verificou-se que a inativação de outros genes que codificam redutases, como **frxA** (que codifica para NADPH flavin oxidoreductase) e **fdxA** (que codifica para uma proteína semelhante a ferredoxina), também estão relacionadas a resistência do *H. pylori* ao metronidazol. Portanto, ainda é possível existir outros mecanismos de resistência do *H. pylori* ao metronidazol ainda desconhecidos, como o do transporte via membrana celular (Jenks & Edwards, 2002).

3.1.6. Relação estrutura atividade (SAR).

Existem diversos fármacos com o grupo nitro (NO₂), sendo que este pode estar ligado ao anel benzênico (como no caso do nitrazepam) ou fazer parte de anéis heterocíclicos (Korolkovas, 1988).

O grupo nitro (NO₂) é favorável, e indispensável, para a atividade antiparasitária de vários derivados nitrados, principalmente do furano, tiofeno e tiazol. Estando representado no quadro 3, os diversos efeitos do grupo nitro (Korolkovas, 1988).

Quadro 3. Efeitos do grupo nitro na molécula do metronidazol.

Efeitos Observados	
Físico-químicos	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Aumento do peso e volume da molécula; ⇒ Redução da hidrossolubilidade; ⇒ Aumento da lipossolubilidade; ⇒ Aumento do tempo de permanência no organismo, gerando aumento na duração de ação terapêutica e tóxica; ⇒ Modificação do pKa; ⇒ Aumento do momento dipolar; ⇒ Formação de derivados aci-nitratos.
Bioquímicos	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Metabolismo especial caracterizado por: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Redução enzimática; ✓ Geração de metabólito ativo; ✓ Aumento do catabolismo; ✓ Inibição específica de certos sistemas enzimáticos.
Farmacológicos	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Em função de seu efeito eletrônico (atração de elétrons) pode: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Formar quelatos; ✓ Modificar uma quelação preexistente; ✓ Modificar a polarização da molécula.

Fonte: (Korolkovas, 1988).

O aumento da atividade antiprotozoária geralmente ocorre, por substituições na posição 2 do anel imidazólico, a qual origina um aumento do efeito de ressonância.

Em contraste, a diminuição da atividade antiprotozoária geralmente ocorre, pela substituição na posição 2 do grupo metila por um grupo acila, a qual estende o efeito de conjugação (Hardman *et al*, 2001).

Para melhorar a hidrossolubilidade de moléculas com grupos nitro, adiciona-se grupos -COOH ou -SO₃ (Korolkovas, 1988).

Portanto, as posições 1 e 2 são as mais indicadas para modificações na molécula do metronidazol (Barry *et al*, 2000).

3.1.7. Síntese do metronidazol.

O metronidazol é obtido por uma reação S_N2 relativamente simples, onde realiza-se a nitração do 2-metilimidazol (I) gerando uma mistura de 4 e 5-nitroisômeros; em seguida realiza-se a alquilação do 5-nitro-2-metilimidazol (II) com etileno cloridrina em dimetilformamida e em presença de base forte (como o etóxido de sódio) finalmente gerando o metronidazol (III) (figura 12) (Korolkovas, 1988).

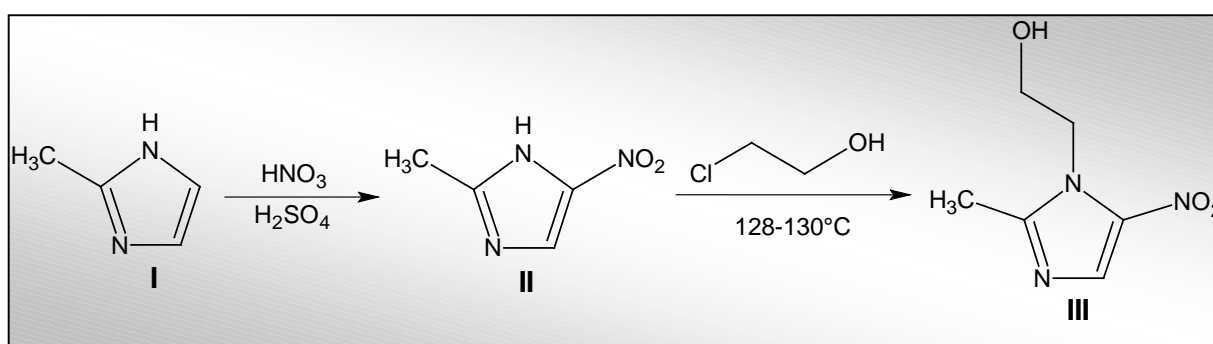


Figura 12. Esquema de síntese do metronidazol.

3.2. Planejamento de pró-fármacos de metronidazol.

Por mais de uma década, interesses crescentes tem sido dirigidos para otimização das propriedades farmacocinéticas e farmacológicas dos fármacos atualmente conhecidos por meio de modificação química, tendo-se o desenvolvimento de pró-fármacos como uma abordagem promissora (Mahfouz *et al*, 1998).

3.2.1. Latenciação.

Um dos processos existentes para a busca de novos compostos químicos terapêuticos é a latenciação de fármacos, onde o termo **latente** significa: presente ou existente, mas não manifestada, exibida ou desenvolvida.

A latenciação de fármacos fora proposta em 1959 por Harper, a qual consiste na transformação do fármaco em forma de transporte inativo que, *in vivo*, mediante reação química ou enzimática, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele. Entretanto, somente em meados da década de 70, quando pesquisadores começaram a localizar os alvos dos fármacos no organismo e compreender a farmacocinética dos mesmos é que o processo de latenciação tomou uma direção mais definida (Korolkovas, 1988; Chung & Ferreira, 1999).

Hoffman, em 1989, transformou o ácido salicílico em ácido acetilsalicílico, utilizando o princípio da latenciação (Chung & Ferreira, 1999).

O **fármaco latente** é uma espécie de “Cavalo de Tróia”, uma vez que este engana o organismo, mas não para destruí-lo e sim para ajuda-lo.

Tanto o fármaco latente quanto o **análogo**, possuem estruturas químicas similares, mas as propriedades biológicas desses compostos diferem à do **fármaco matriz** quanto a(o): atividade, potência, biodisponibilidade, síntese, espectro de ação, índice terapêutico, entre outros (Korolkovas, 1988).

Um análogo muitas vezes difere do **fármaco protótipo** em um só átomo ou em um grupo de átomos que geralmente sustentam o fármaco matriz. Todavia, estruturalmente, o fármaco protótipo e o análogo possuem características farmacológicas próprias, oriundas de sua estrutura química. Como exemplos pode-se citar: (1) o isoproterenol, que é um análogo da epinefrina a qual a dipivefrina é a forma latente (pró-fármaco), e (2) a norepinefrina, que é um análogo da dopamina, enquanto que a levodopa é a forma latente (bioprecursor) (Korolkovas, 1988).

Nos últimos anos a latenciação tornou-se uma das principais ferramentas no desenvolvimento de novos quimioterápicos para o combate às maiores enfermidades na atualidade como câncer e SIDA (Chung & Ferreira, 1999).

Muitas razões justificam a busca por novos fármacos latentes. São elas:

1. Inconvenientes farmacocinéticos do fármaco matriz;
2. Alta toxicidade do fármaco matriz;
3. Estabilidade química pobre do fármaco matriz;
4. Solubilidade inapropriada em água do fármaco matriz;
5. Odor e paladar inconvenientes do fármaco matriz;
6. Formulação farmacêutica de difícil preparo do fármaco matriz.

Os principais problemas farmacocinéticos incluem: a deficiência de biodisponibilidade oral (devido à polaridade e/ou solubilidade), insignificante distribuição específica no local de ação e a incapacidade de atravessar diversos tipos de barreiras (como: pele, mucosa gástrica, córnea e barreira hematoencefálica) que separam o fármaco de seu local de ação (Korolkovas, 1988).

As formas latentes de fármacos podem ser divididas em **pró-fármacos** e **fármacos alvo**.

Em 1958 Albert definiu pró-fármaco como: qualquer composto o qual sofre biotransformação antes de exibir seus efeitos farmacológicos. Uma definição expandida, considera um pró-fármaco como um fármaco ativo, quimicamente transformado em um derivado inativo, por um ataque químico ou enzimático ou de

ambos; o qual é convertido no fármaco matriz dentro do organismo antes ou após alcançar seu local de ação (*figura-13*).

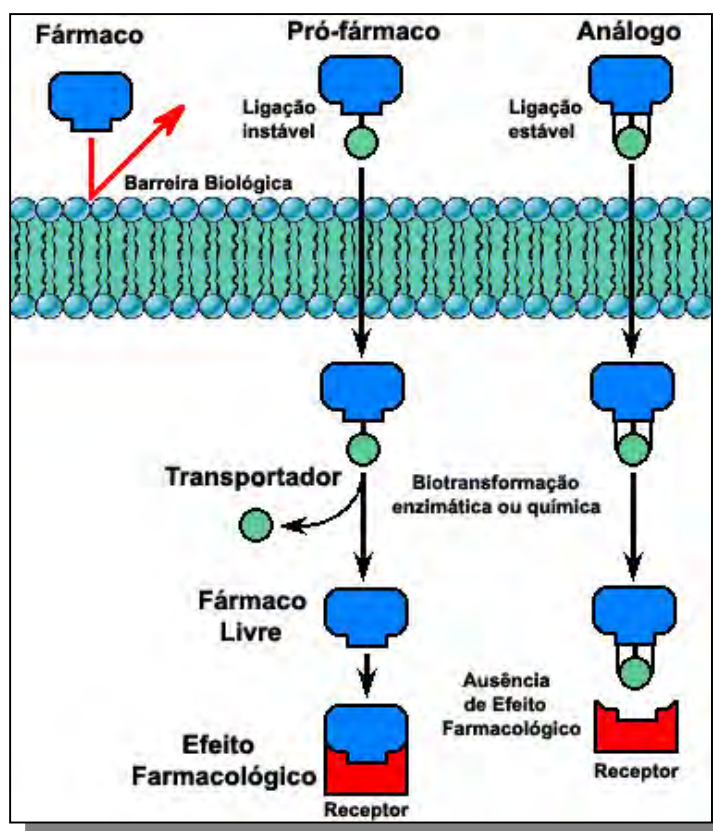


Figura 13. Diferenças entre fármaco, pró-fármaco e análogo.

Os pró-fármacos possuem alguns fatores importantes em seu desenvolvimento, para permitir o aprimoramento das propriedades do fármaco matriz, tais como:

1. O pró-fármaco é inativo ou menos ativo do que o fármaco matriz;
2. A síntese do pró-fármaco não deve ser significativamente mais complexa do que a do fármaco matriz;
3. A ligação entre o fármaco matriz e o transportador deve ser desfeita *in vivo*, por via química ou enzimática;
4. O transportador não deve ser tóxico e preferencialmente biologicamente inativo;

5. Possuir cinética rápida, para assegurar níveis eficazes do fármaco no local de ação e para minimizar tanto a biotransformação direta do fármaco quanto sua inativação.

Os pró-fármacos não são tão recentes, pois alguns já eram utilizadas há bastante tempo, como a codeína (século IX) que é um pró-fármaco da morfina (Chung & Ferreira, 1999).

As principais vias para o desenvolvimento de pró-fármacos, são:

1. Formação de ésteres, hemi-ésteres, carbonatos de ésteres, nitrato de ésteres, amidas, iminas, carbamatos, ácido hidroxâmico, bases Mannich e enaminas do fármaco matriz;
2. Introdução de função éster, ligações azo, glicosídeos e peptídeos;
3. Preparação de polímeros, sais, complexos, fosfamidas, acetais, hemiacetais e acetais do fármaco matriz.

Entre os diversos métodos de preparação de pró-fármacos, a esterificação é o mais empregado, seguido da formação de amidas, imidas e carbamatos. Outros processos também estão merecendo a atenção na obtenção de pró-fármacos como as bases de Mannich, enaminas e iminas (Chung & Ferreira, 1999).

Atualmente alguns grupos funcionais de fármacos podem ser modificados por reações químicas, produzindo grupos reversíveis muito utilizados no desenvolvimento de pró-fármacos. A lista de tais grupos pode ser vista na *tabela-1*.

O desenvolvimento de pró-fármacos tem como objetivo resolver diversos problemas relacionados aos fármacos atuais, tais como:

1. Alterar a farmacocinética do fármaco *in vivo*, para melhorar sua absorção, distribuição, biotransformação e excreção;
2. Diminuir a sua toxicidade e efeitos adversos;
3. Aumentar sua especificidade;
4. Melhorar sua solubilidade, estabilidade e duração de ação.

Tabela 1. Grupos reversíveis utilizados no desenvolvimento de pró-fármacos.

Grupo modificável no fármaco matriz	Grupo revertente	Grupo modificável no fármaco matriz	Grupo revertente	
$\begin{array}{c} \text{C-X} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	<p>Onde X = R, Ar, H</p> <p>X = H</p> <p>X = R, Ar, H</p> <p>X = R, Ar, H</p> <p>X = H</p>	<p>-CX(OR)_2</p> <p>-CX(O-C-Z)_2</p> <p>$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-C=C-OR} \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{NR}_1\text{R}_2 \\ \parallel \\ \text{-C=C} \end{array}$</p> <p>$\text{-CHCl-(O-C-Z)}$</p>	<p>-OH</p> <p>Onde X = R, Ar, H</p> <p>X = R, Ar, H</p>	<p>$\begin{array}{c} \text{-O-C-Z} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$</p> <p>$\text{(-O)}_2\text{-CZ}$</p> <p>$\text{(-O)}_2\text{-CX}^1\text{X}^2$</p> <p>-OR</p> <p>$\begin{array}{c} \text{-O-C=C-} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{-O-C-N-X}^1\text{X}^2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{-O-C-O-C-Z} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array}$</p>
$\text{-CO}_2\text{H}$	<p>X = R, Ar, H</p> <p>X = R, Ar</p>	<p>$\begin{array}{c} \text{X} \\ \\ \text{-C=N-Z} \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-C-OX} \end{array}$</p>		<p>-O-Si-R₃</p> <p>$\text{(-O)}_2\text{-C=O}$</p> <p>$\text{(-O)}_2\text{-P=O}$</p> <p>$\text{(-O)}_3\text{P}$</p> <p>$\text{(-O)}_2\text{-SO}_2$</p>
$\text{-CO}_2\text{H}$	<p>X = R, Ar</p> <p>X = H, R</p>	<p>$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-C-SX} \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-C-NX}^1\text{X}^2 \end{array}$</p>	<p>-NHX</p> <p>X = H, R</p>	<p>$\begin{array}{c} \text{-O-C-Z} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$</p>
		<p>$\begin{array}{c} \text{-C-NHNH}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{-C-NHOH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$</p> <p>X = H, Ph</p> <p>$\begin{array}{c} \text{-C-OCHXOC-Z} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{-C-OCHRCl} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$</p> <p>$\text{-C(OR)}_3$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{-C-O-C-OR} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array}$</p>	<p>-NHX</p> <p>X = H, R</p> <p>X = R</p> <p>X = H, R</p>	<p>-NX-C-OR</p> <p>$\begin{array}{c} \text{-NR-C=C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$</p> <p>$\text{-NX-C-NHZ}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{-S-C-Z} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$</p>
				-SH

Fonte: Korolkovas, 1988.

3.2.2. Derivados do metronidazol.

Uma grande quantidade de pró-fármacos de ésteres e hemiésteres de metronidazol foram sintetizados a fim de melhorar a hidrossolubilidade para a administração parenteral, estabilidade química, permeabilidade da membrana celular e redução da suscetibilidade a degradação enzimática.

Em 1982, Cho e colaboradores sintetizaram o fosfato de metronidazol, melhorando em 50x sua hidrossolubilidade quando comparado ao metronidazol para uso parenteral (*figura 14a*).

Em 1984, Bundgaard e colaboradores sintetizaram outro éster de metronidazol, melhorando em 50% sua hidrossolubilidade para uso parenteral (*figura 14b*).

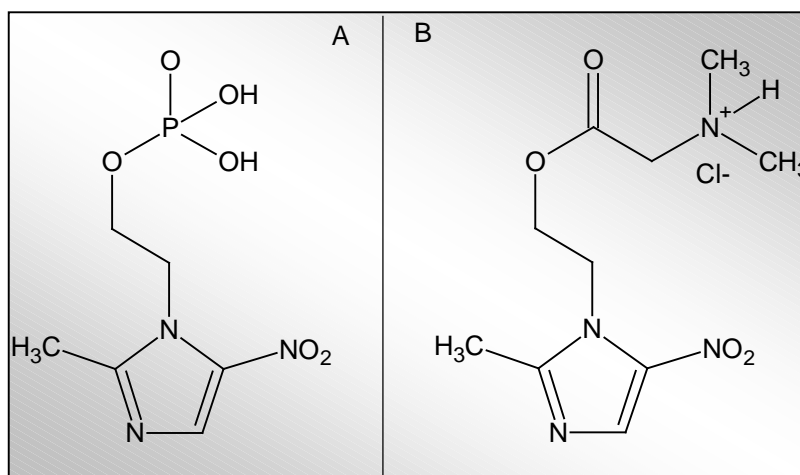


Figura 14. (a) Fosfato de metronidazol e (b) sal hidrocloreto de *N,N*-dimetilglicinato de metronidazol.

Cho e Haynes em 1985, sintetizaram ésteres de metronidazol utilizando aminoácidos (glicina, alanina, fenilalanina, lisina, valina, leucina e isoleucina), melhorando a solubilidade do mesmo para uso parenteral, com liberação plasmática de MDZ + aminoácido.

Em 1992, Permentier e colaboradores sintetizaram ésteres dipeptídios de metronidazol, verificando que os mesmos sofrem hidrólise lenta em pH ácido e acelerada em pH 7 e básico, regenerando o fármaco matriz (metronidazol), informação interessante para o desenvolvimento de pró-fármacos dirigidos ao intestino (cólon).

No final da década de 90, do século XX, os ésteres duplos idênticos tornaram-se uma estratégia comum no desenvolvimento de novos pró-fármacos, onde duas moléculas do mesmo fármaco são ligadas por meio de um espaçante e após a administração são convertidos no fármaco matriz. Tal modificação fornece melhorias das propriedades físico-químicas do fármaco matriz, aumentando sua concentração no local de ação, assim como a duração de seu efeito farmacológico e diminui sua toxicidade (Mahfouz *et al*, 1998).

Em 1998 Mahfouz e colaboradores sintetizaram uma série de ésteres duplos de metronidazol utilizando diferentes ácidos carboxílicos (adípico, fitálico, glutárico, succínico e sebáico) como agentes espaçantes. Tal estudo demonstrou que os mesmos são mais lipofílicos que o fármaco matriz e suficientemente estáveis em solução glicofisiológica, assim como em pH fisiológico para serem absorvidos de forma intacta. Os pró-fármacos foram convertidos à metronidazol com liberação rápida da primeira molécula e hidrólise lenta da outra. Além disso, o estudo *in vivo* (em camundongos e coelhos) dos pró-fármacos de a-e, (*figura 15*), administrados por via oral demonstrou que os mesmos eram absorvidos na forma não ionizada, com liberação plasmática prolongada.

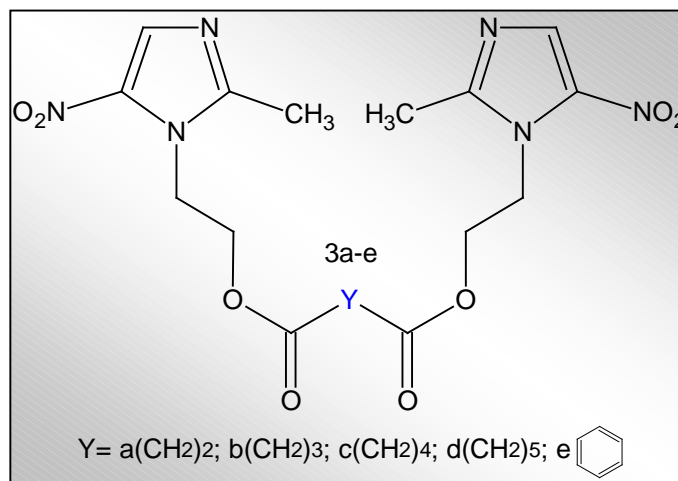


Figura 15. Pró-fármacos de ésteres duplos de metronidazol.

Em 1998, Bowden e Izadi desenvolveram um triéster de metronidazol (C₂₇H₂₇N₉O₁₂), (*figura 16*) o qual possui uma atividade antimicrobiana significativamente maior, quando comparado ao metronidazol.

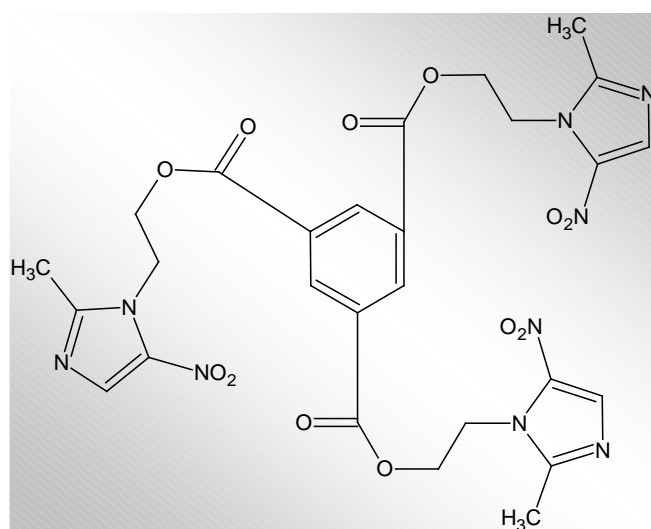


Figura 16. Triéster de metronidazol.

Com a mesma finalidade de Cho e colaboradores (1982) Mahfouz e Hassan (2001), sintetizaram ésteres de metronidazol (*figura 17*), obtendo excelentes resultados quanto a hidrossolubilidade, estabilidade química e liberação plasmática do pró-fármaco.

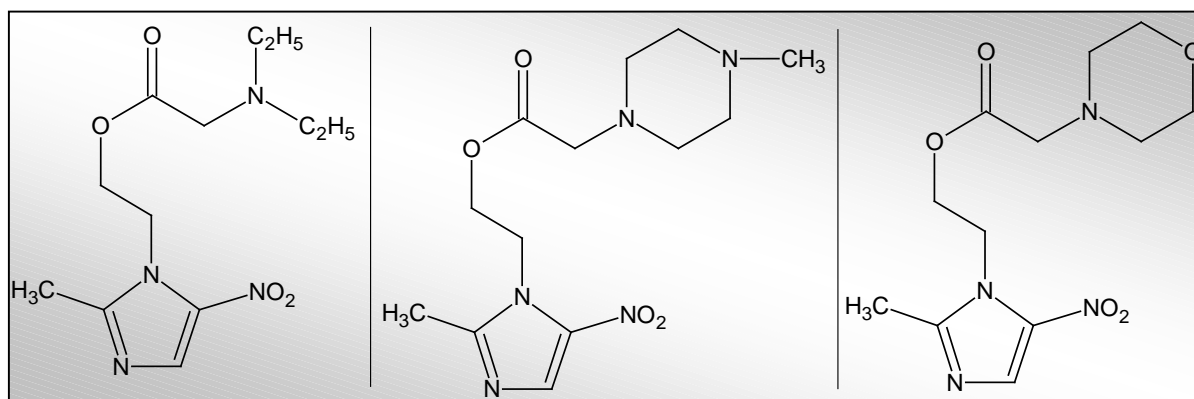


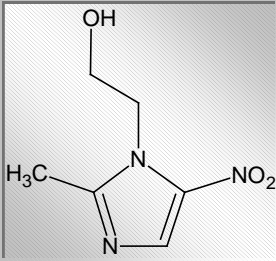
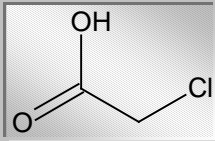
Figura 17. Três ésteres de metronidazol sintetizados por Mahfouz e Hassan.

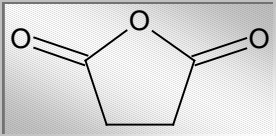
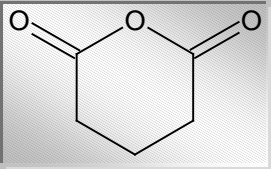
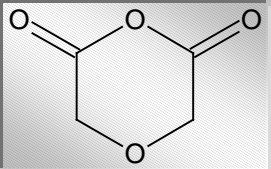
Todos os compostos supracitados foram sintetizados, contudo não foram testados quanto à atividade mutagênica.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material.

- metronidazol (EMS), ácido monocloroacético (Acros), anidrido succínico (Merck), anidrido glutárico (Aldrich) e anidrido diglicólico (Aldrich).
- Solução de hidróxido de sódio 1N, metanol P.A (Merck), clorofórmio P.A (Merck) e ácido acético P.A (Merck).

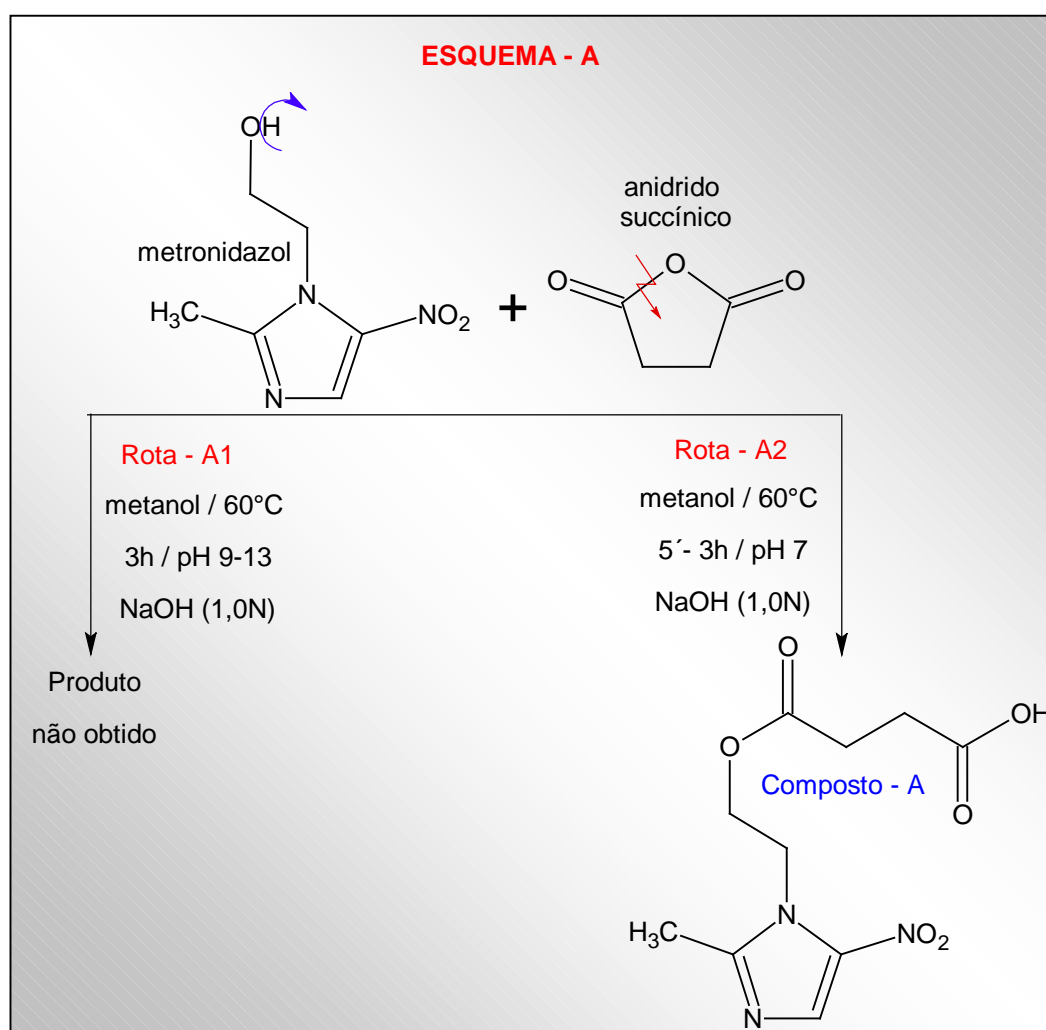
Reagentes	Características	Referência
<p>metronidazol ou 2-metil-5-nitroimidazol-1-</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • $C_6H_9N_3O_3$, pm 171,15. • Faixa de fusão: 158-160°C. • Solúvel em água, etanol, éter, e clorofórmio. • Pouco solúvel em DMF. • Classe terapêutica: antiparasitário e antibacteriano. 	-The Merck Index, 2001
<p>ácido monocloroacético</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • $C_2H_3ClO_2$, pm 94,50. • Faixa de fusão da forma: <ul style="list-style-type: none"> ✓ α: 63°C. ✓ β: 55-56°C. ✓ γ: 50°C. • Muito solúvel em água. • Solúvel em álcool, benzeno, clorofórmio e éter. 	-The Merck Index, 2001

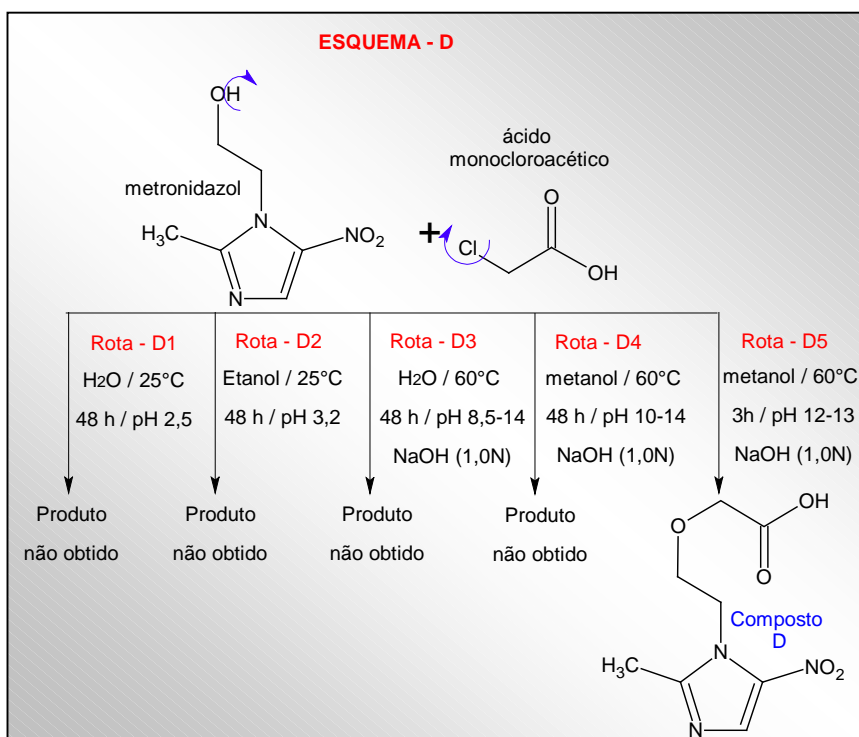
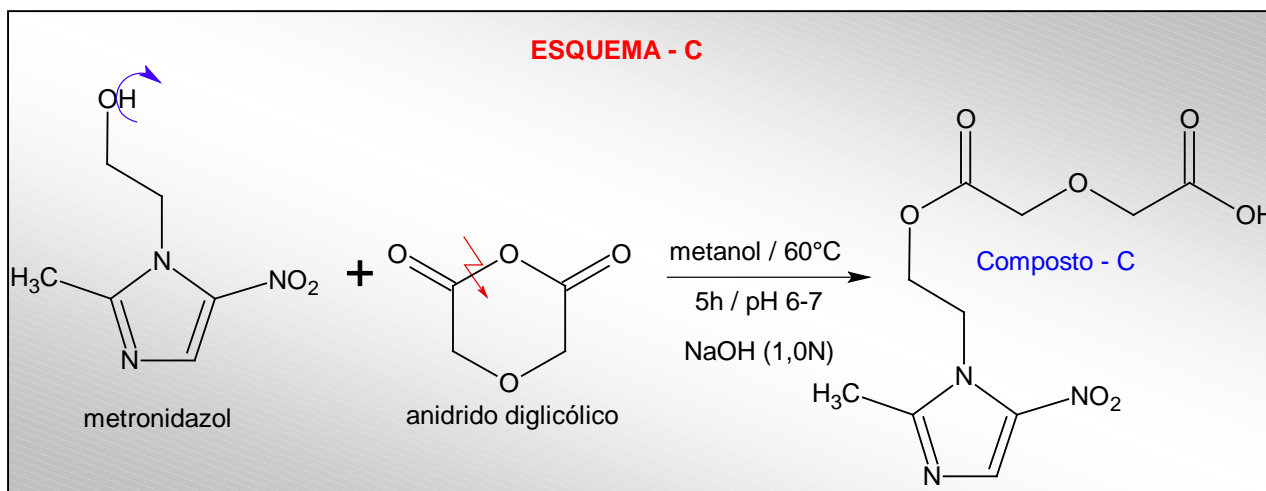
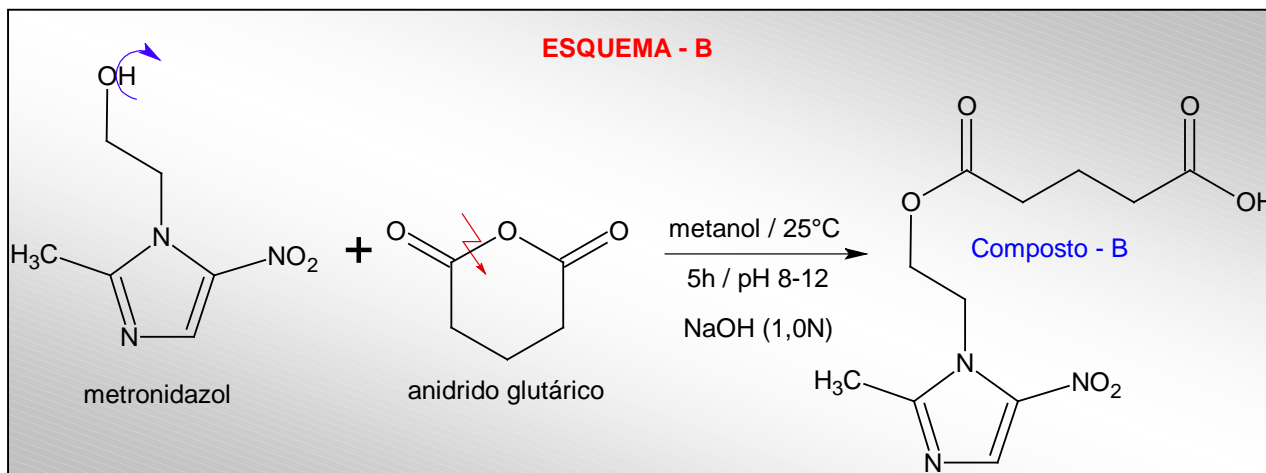
Reagentes	Características	Referência
anidrido succínico 	<ul style="list-style-type: none">• $C_4H_4O_3$, pm 100,07.• Faixa de fusão: 119,6°C.• Solúvel em álcool, clorofórmio e tetracloreto de carbono.• Muito pouco solúvel em água e éter.	-The Merck Index, 2001
anidrido glutárico 	<ul style="list-style-type: none">• $C_5H_6O_3$, pm 114,10.• Ponto de fusão: 55-57°C.• Solúvel em metanol.	-The Merck Index, 2001
anidrido diglicólico 	<ul style="list-style-type: none">• $C_4H_4O_4$, pm 116,07.• Ponto de fusão: 92-93°C.• Solúvel em metanol.	-The Merck Index, 2001

4.2. Métodos.

4.2.1. Métodos de síntese dos derivados do metronidazol.

Para a obtenção dos pró-fármacos de ésteres de metronidazol reagiu-se o mesmo com anidrido succínico, anidrido glutárico e anidrido diglicólico. Para obtenção de outro fármaco derivado de metronidazol, reagiu-se o mesmo com ácido monocloroacético, como apresentado nos esquemas A, B, C e D.





4.2.2. Métodos analíticos.

⊗ Cromatografia de camada delgada (CCD).

Utilizou-se cromatofolhas de alumínio 20x20 cm Sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) para o acompanhamento das reações, com os seguintes sistemas eluentes (v/v/v):

- metanol/clorofórmio/ácido acético (95:05:03);
- metanol/clorofórmio/ácido acético (70:20:10);
- metanol/clorofórmio (70:20).

As placas de cromatografia foram reveladas com luz UV e iodo.

⊗ Determinação da faixa de fusão.

As faixas de fusão experimentais dos compostos foram verificadas em aparelho para determinação de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific. Sendo importante salientar que, a calibração do aparelho era sempre verificada com um padrão antes de seu uso.

⊗ Espectrometria no infravermelho (IR).

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro infravermelho FTIR-8300 da SHIMADZU Corporation, o qual utiliza o método de transformação de Fourier com a amostra dispersa em KBr.

⊗ Espectrometria de RMN ¹H e ¹³C.

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram obtidos no espectrômetro Bruker, modelo DRX-400, 9,4 T (400 MHz para a frequência do hidrogênio), utilizando-se como solventes metanol-d₄ e DMSO-d₆ do laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Para auxílio na interpretação dos espectros de massas, IR e RMN, foram utilizadas as seguintes referências: Dyer, 1965; Silverstain *et al*, 1994 e Pavia *et al*, 1996.

4.2.3. Teste de Ames para atividade mutagênica.

Entre as diferentes abordagens para se avaliar a atividade mutagênica de uma substância e, conseqüentemente, o seu potencial cancerígeno, está o teste de Ames ou teste com *Salmonella* (Maron & Ames, 1983).

O teste de Ames caracteriza-se pela utilização de linhagens indicadoras de *Salmonella typhimurium* sensíveis às substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutação. Na presença de agentes mutagênicos, estas linhagens revertem o caráter de auxotrofia para síntese de histidina e passam a formar colônias em meio desprovido deste aminoácido. Desta forma, através da contagem de colônias por placa é possível estabelecer a ação mutagênica de um composto em função de sua concentração (*figura 18*).

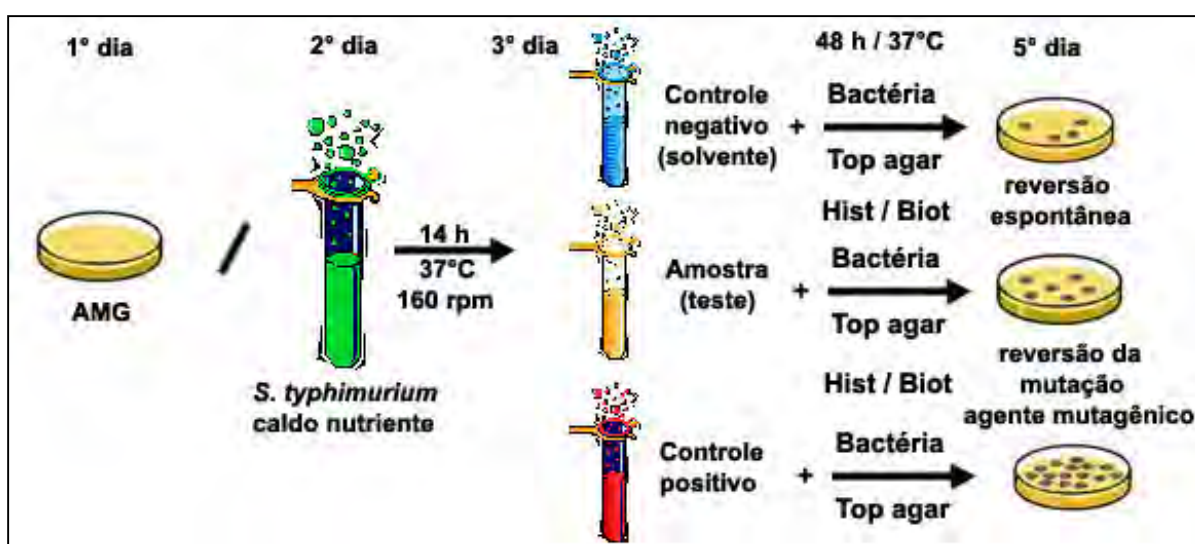


Figura 18. Representação esquemática do teste de Ames.

Os dados finais obtidos serão analisados utilizando-se o programa estatístico Salanal (*Salmonella Assay Analysis*) versão 1.0 do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA. Tal programa permite avaliar o efeito dose-resposta por meio do cálculo de análise de variância (ANOVA – teste F) entre a medida do número de revertentes nas diferentes concentrações (doses) testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. O modelo do programa escolhido para análise dos dados foi o de Bernstein (Bernstein *et al*, 1982). A inclinação da reta da parte linear da curva dose-resposta é também fornecida por este programa e corresponde ao número de revertentes induzidos por mg da amostra analisada.

A partir dos resultados obtidos, foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada concentração (dose) analisada, de cada composto.

A RM é dada pela seguinte equação:

$$RM = \frac{\text{média do nº de revertentes por placas teste (espontâneos + induzidos)}}{\text{média do nº de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos)}}$$

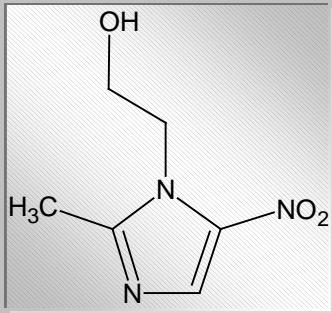
O crescimento espontâneo significa o número de revertentes que desenvolveram na placa, independente de serem ou não induzidos, onde considera-se como resposta positiva valores ≥ 2 (Valent *et al*, 1993).

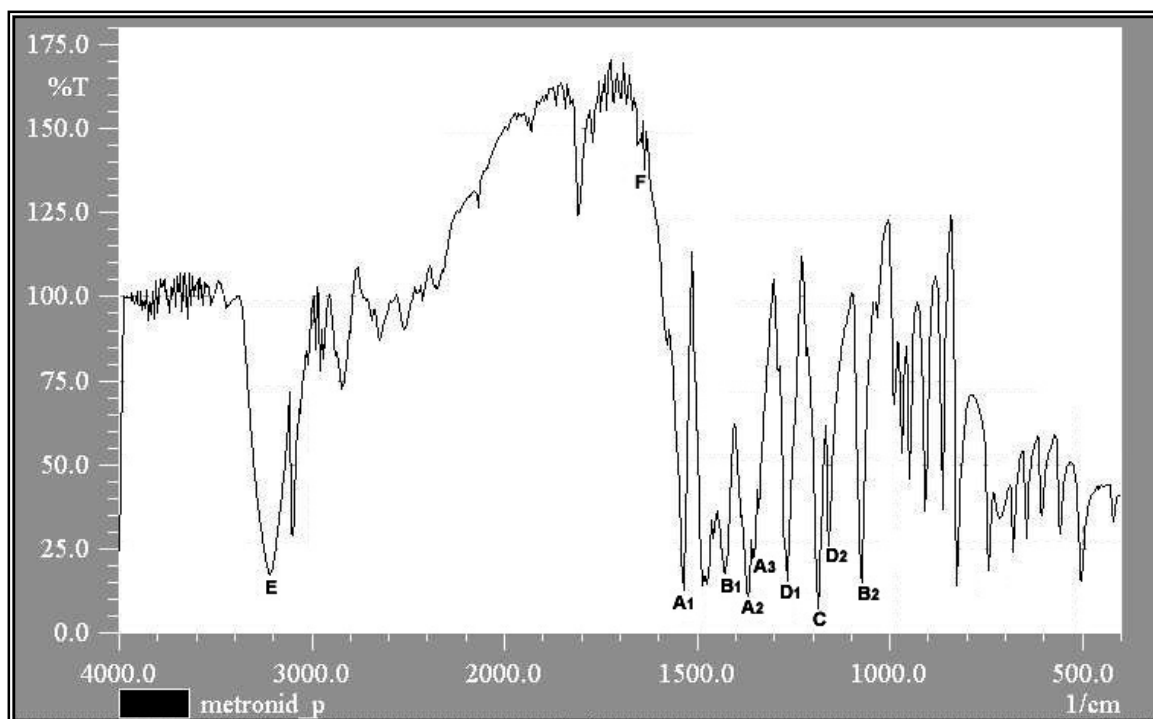
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação do fármaco matriz.

Para a síntese dos pró-fármacos derivados de metronidazol partiu-se da matéria prima, a qual foi verificado sua faixa de fusão entre 158 – 160°C, dentro do estabelecido na literatura, assim como seu espectro no infravermelho e RMN ¹H (Mills & Roberson, 1987; The Merck Index, 2001). Tal identificação foi necessária para comprovação da pureza da matéria prima, além do fato de que tais dados servem como base para interpretação dos espectros dos derivados obtidos.

Tabela 2. Bandas de absorção do espectro no infravermelho do metronidazol (KBr).

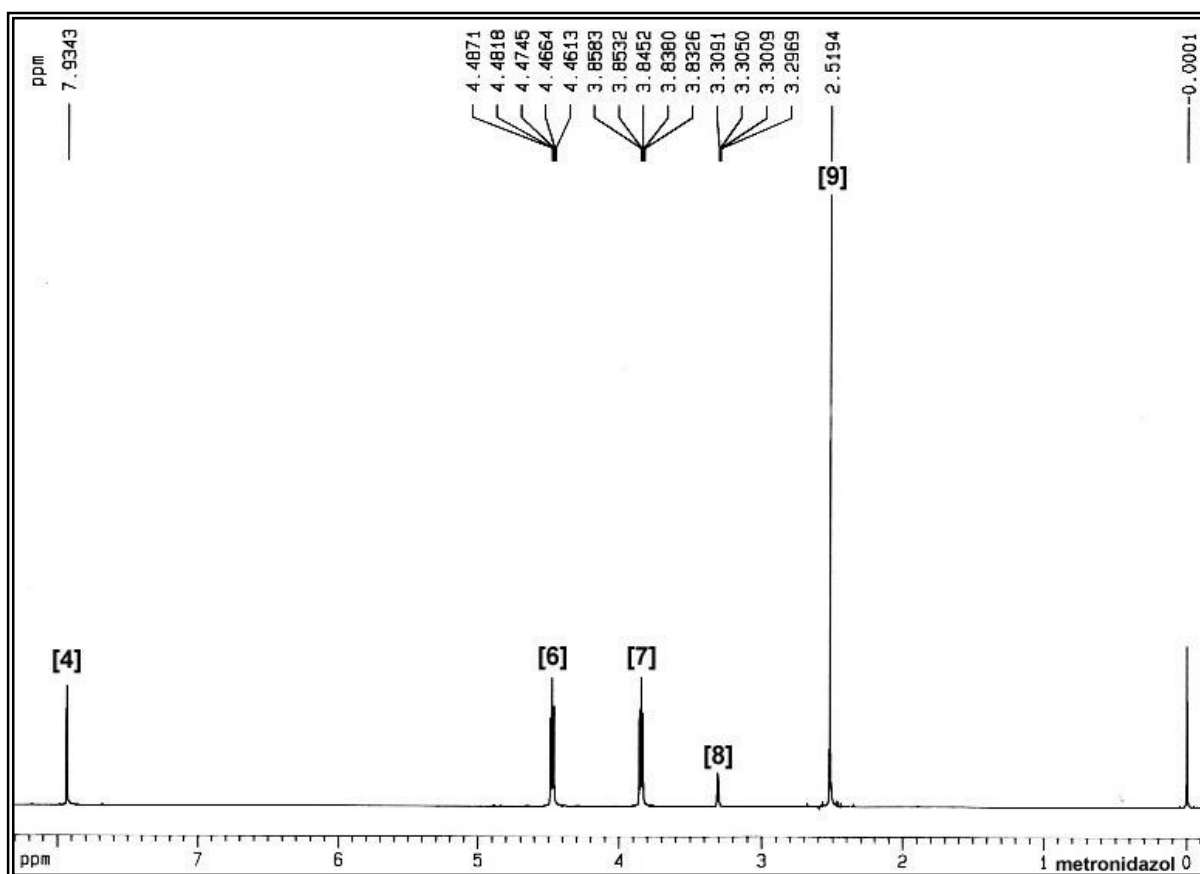
Marcador	ν (cm ⁻¹)	Grupo Funcional	
A ₁ e A ₂	1535 e 1369	NO ₂	
A ₃	1353	N=O (R-NO ₂)	
B ₁ e B ₂	1429 e 1074	C-N (alifático)	
C	1188	C-O	
D ₁ e D ₂	1265 e 1159	C-OH (primário)	
E	3219	OH	
F	1652	C=C ou C=N	



Espectro 1. Infravermelho do metronidazol (KBr).

Tabela 3. Atribuições dos sinais de RMN ^1H em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$ do metronidazol.

	$\delta \text{ } ^1\text{H J (Hz)}$	
H_4	7,93 s	
H_6	4,47 t ($J=2,5$)	
H_7	3,84 t ($J=2,5$)	
OH_8	3,30 s	
H_9	2,52 s	

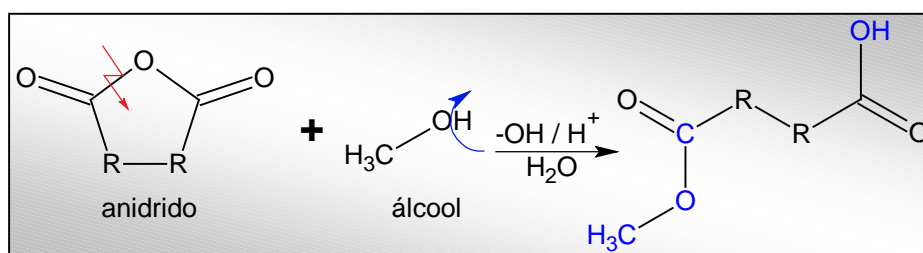
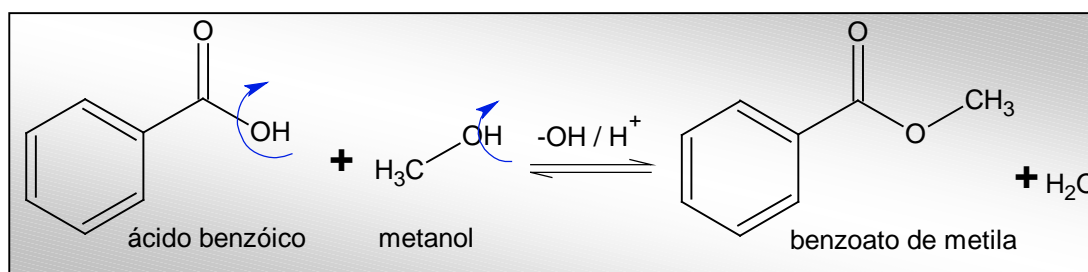


Espectro 2. RMN ^1H do metronidazol em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.

5.2. Obtenção dos compostos A, B e C.

Para obtenção dos compostos A, B e C, foi utilizado o método de síntese geral de ésteres (March, 1985; Solomons, 1986 e 1996).

O mecanismo destas reações envolve substituição nucleofílica em átomos de carbono acíclico, catalisados por bases ou ácidos, podendo ser exemplificada pela reação de ácidos carboxílicos com álcoois formando ésteres (Solomons, 1986 e 1996).

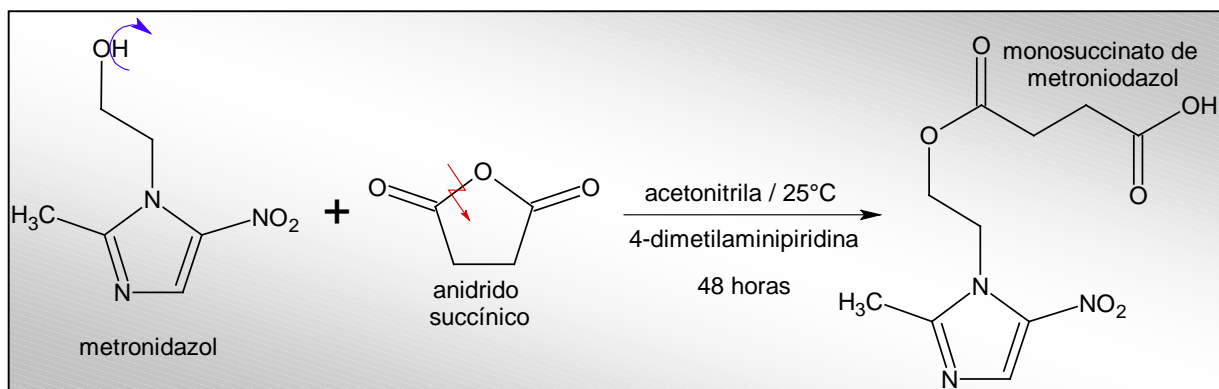


Em geral, o rendimento da reação de esterificação aumenta pelo(a):

- Remoção de água da mistura reacional a medida que a mesma se forma;
- Excesso de ácido carboxílico ou de álcool no meio reacional.

O componente escolhido para reagir em excesso depende das condições de disponibilidade e custo.

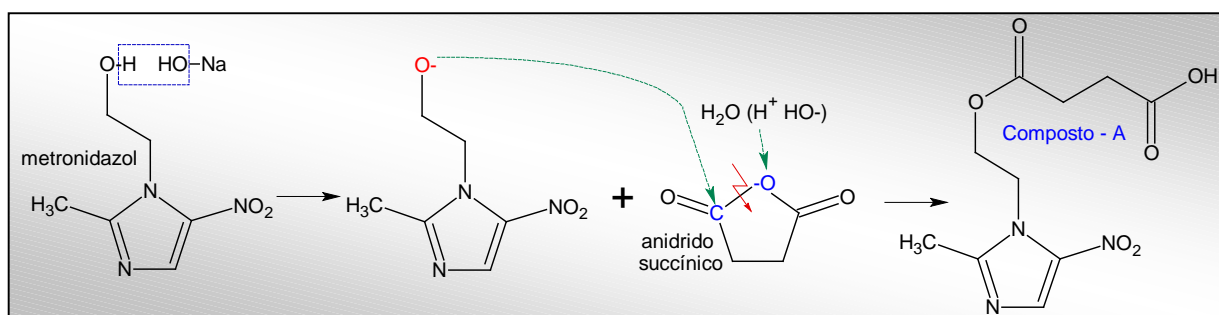
O composto A foi obtido por Vermeersch e colaboradores, em 1985, o qual utilizou o seguinte processo de síntese.



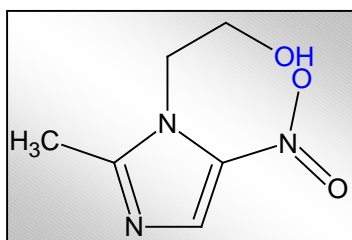
O ponto positivo deste processo é o rendimento de 95%. Contudo, observa-se um longo tempo para obtenção (2 dias), a utilização de acetonitrila e 4-dimetilaminopiridina e o uso de pentóxido de fósforo como agente secante.

As rotas A2, B e C foram realizadas em meio básico, uma vez que Vermeersch e colaboradores já haviam demonstrado que a reação se processa bem nesse meio.

O mecanismo de reação para as sínteses propostas (*mostrado a seguir*), baseia-se no fato do NaOH atuar sobre a hidroxila do metronidazol gerando um alcoolato, o qual ataca a carbonila dos anidridos succínico, glutárico e diglicólico, originando assim os compostos **A** (*ácido 4-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etóxi]-4-oxobutanóico*), **B** (*ácido 5-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etóxi]-5-oxopentanóico*) e **C** (*ácido {2-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etóxi]-2-oxoetóxi} acético*) respectivamente.



Outro motivo para que esta reação se processe em meio básico, é a possível participação do H alcoólico, na formação de uma ligação intramolecular (ponte de hidrogênio) com o oxigênio do grupo nitro, dificultando a formação do alcoolato para o ataque nucleofílico na carbonila do anidrido para a formação do éster (*ver estrutura a seguir*).



A tabela 4 mostra os rendimentos obtidos das sínteses dos compostos A – C.

Tabela 4. Rendimentos obtidos das sínteses dos compostos A – C.

Composto	Rota	Solvente	Faixa de PH	Temperatura (°C)	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
A	A1	• metanol	9-13	60	3	0
	A2	• metanol	7	60	2	94
B	B1	• metanol	8-12	25	5	60
C	C1	• metanol	6-7	60	5	40

Para obtenção do composto A a rota A1 foi ineficiente, devido a base ser adicionada logo após a adição do anidrido. Fato este já esperado, uma vez que não há formação do alcoolato para atacar a carbonila do anidrido.

A rota A2 mostrou-se como uma opção alternativa e eficaz, pois fornece rendimento de 94%, em apenas 2 horas de reação, utilizando meio básico e temperatura de 60°C.

Experimentos foram conduzidos prosseguindo-se a reação por mais tempo e os resultados demonstraram a diminuição do rendimento, provavelmente pela hidrólise do éster formado.

As rotas B1 e C1 mostram-se como opções de síntese a serem otimizadas, pois fornecem rendimento de 60 e 40% em 5 horas de reação respectivamente.

A quantidade de base adicionada no meio, foi previamente determinada através de estudo preliminar, onde observou-se que toda quantidade de base inferior à aquelas descritas no procedimento experimental para cada rota sintética, não promoveu a formação do produto, demonstrando a importância do controle do pH durante a reação, uma vez que o pH da reação decresce drasticamente logo após a adição dos anidridos e desta forma, dificulta a formação do alcoolato.

Além dos compostos A, B e C serem pró-fármacos, os mesmos também são uma forma funcionalizada do metronidazol para originar pró-fármacos recíprocos.

Os transportadores, (ácido succínico, glutárico e diglicólico) provenientes da biotransformação do fármaco matriz, deverão ser rapidamente metabolizados por reações de conjugação e excretados por via renal.

5.3. Identificação dos compostos A, B e C.

A formação do composto A foi confirmada pelo espectro no IR (3), pela presença de todas as bandas (ν) do metronidazol além das bandas (ν) em 1739 cm^{-1} (C=O de éster) e 1718 cm^{-1} (C=O de ácido carboxílico); no espectro de RMN de ^1H (4), pelos deslocamentos químicos δ (ppm) típicos do metronidazol e de mais 2 sinais em 2,41 (H_{11}) e 2,57 (H_{12}) dos CH_2 da cadeia lateral; e no espectro de RMN de ^{13}C (5), pelos deslocamentos químicos δ (ppm) típicos do metronidazol e de mais 4 sinais em 175,9 (C_{10}), 31,6 (C_{11}), 33,4 (C_{12}) e 180,5 (C_{13}).

A formação do composto B foi confirmada pelo espectro no IR (6), pela presença de todas as bandas (ν) do metronidazol além das bandas (ν) em 1739 cm^{-1} (C=O de éster) e 1718 cm^{-1} (C=O de ácido carboxílico); no espectro de RMN de ^1H (7), pelos deslocamentos químicos δ (ppm) típicos do metronidazol e de mais 3 sinais em 2,19 (H_{11}), 1,84 (H_{12}) e 2,36 (H_{13}) dos CH_2 da cadeia lateral; pelos acoplamentos demonstrados no espectro HSQC (8) entre hidrogênios (4, 6, 7, 9, 11, 12 e 13) e seus respectivos carbonos e pelos acoplamentos demonstrados no espectro HMBC (9) entre:

- H_{11} com a carbonila C_{10} e carbonos C_9 , C_{12} e C_{13} ;
- H_{13} com a carbonila C_{14} e carbonos C_{12} e C_{11} ;
- H_{12} com as carbonilas C_{10} e C_{14} ;
- H_{12} com os carbonos C_{11} e C_{13} .

A formação do composto C foi confirmada pelo espectro no IR (10), pela presença de todas as bandas (ν) do metronidazol além das bandas (ν) em 1745 cm^{-1} (C=O de éster) e 1718 cm^{-1} (C=O de ácido carboxílico).

Pelos dados de RMN o composto C teria sofrido a adição de mais uma molécula de anidrido diglicólico, originando o composto observado na tabela 11 e espectro 11.

Qualquer uma das formas do composto C é considerada como um pró-fármaco, além de também ter funcionalizado o metronidazol para originar pró-fármacos recíprocos.

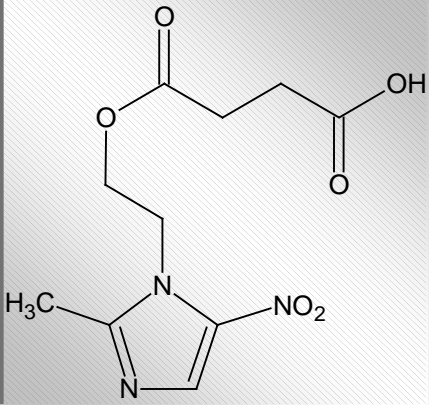
No espectro de RMN de ^1H (11), tem-se a nova proposta para a estrutura do pró-fármaco obtido pelo esquema C, segundo os deslocamentos químicos δ (ppm) típicos do metronidazol e de mais 4 sinais em 4,19 (H_{11}), 3,94 (H_{13}), 3,86 (H_{17}) e 3,76 (H_{19}) dos CH_2 da cadeia lateral; pelos acoplamentos demonstrados no espectro HSQC (12) entre hidrogênios (6, 7, 9, 11, 13, 17 e 19) e seus respectivos carbonos e pelos acoplamentos demonstrados no espectro HMBC (13) entre:

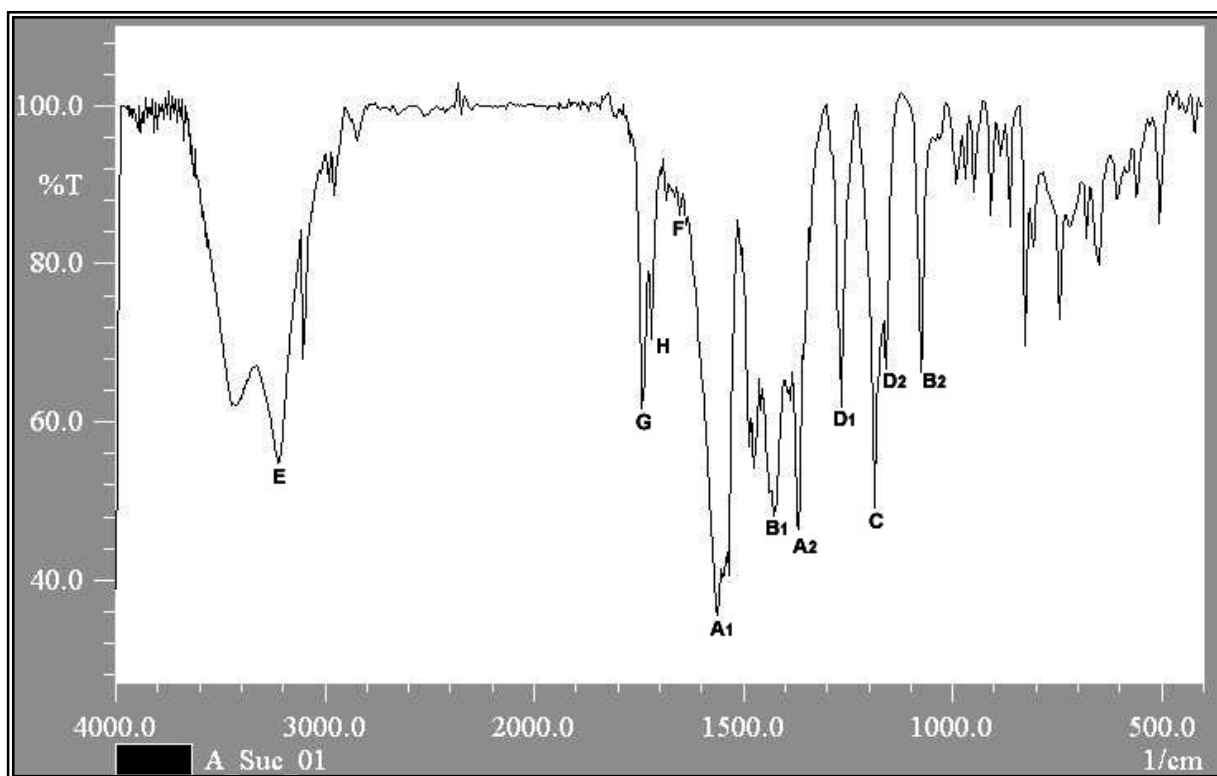
- H_6 com os carbonos C_2 e C_5 .
- H_{11} com as carbonilas C_{10} e C_{20} ;
- H_{11} com o carbono C_{13} ;
- H_{13} com as carbonilas C_{14} e C_{16} ;
- H_{13} com o carbono C_{11} ;
- H_{17} com as carbonilas C_{14} e C_{16} ;
- H_{17} com o carbono C_{13} ;
- H_{19} com as carbonilas C_{10} e C_{20} ;
- H_{19} com o carbono C_{13} .

Tais dados podem ser explicados em parte pela simetria da cadeia lateral, fazendo com que as carbonilas $\text{C}_{14}/\text{C}_{16}$ e $\text{C}_{10}/\text{C}_{20}$ surjam no mesmo ponto do espectro.

Tabela 5. Bandas de absorção do espectro no infravermelho do Composto A (KBr).

Marcador	ν (cm ⁻¹)	Grupo Funcional
A ₁ e A ₂	1535 e 1369	NO ₂
B ₁ e B ₂	1425 e 1074	C-N (alifático)
C	1188	C-O
D ₁ e D ₂	1265 e 1159	C-OH (primário)
E	3220	OH
F	1654	C=C ou C=N
G	1739	C=O (éster)
H	1718	C=O (ácido carboxílico)

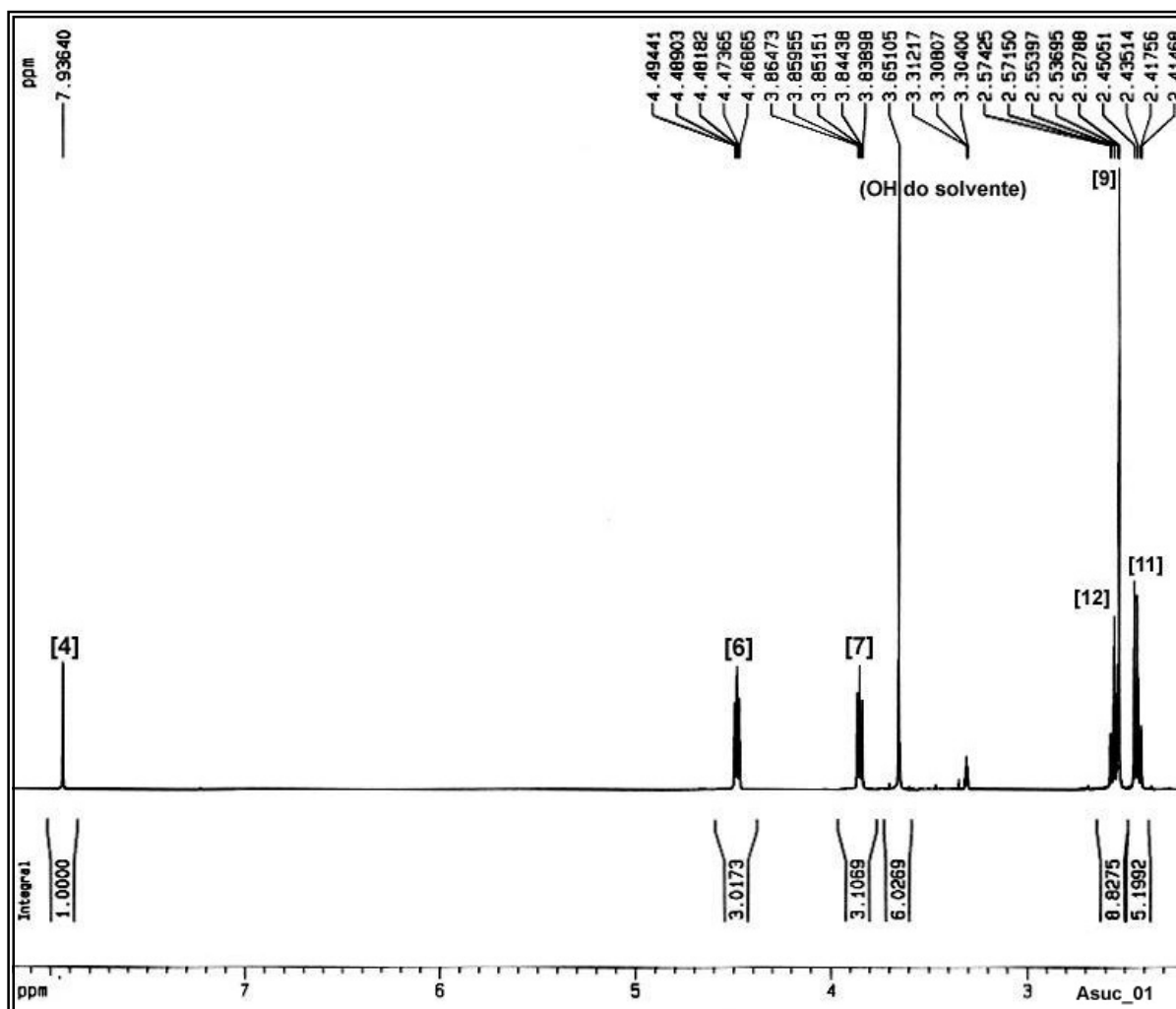




Espectro 3. Infravermelho do Composto A (KBr).

Tabela 6. Atribuições dos sinais de RMN ^1H em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$ do Composto A.

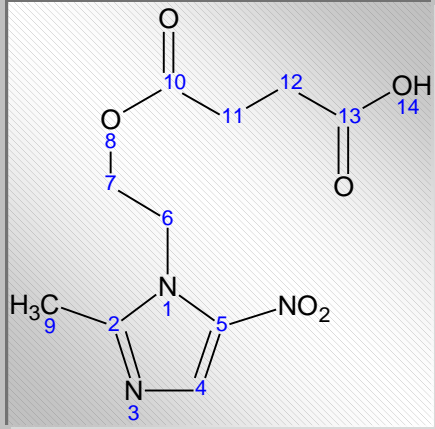
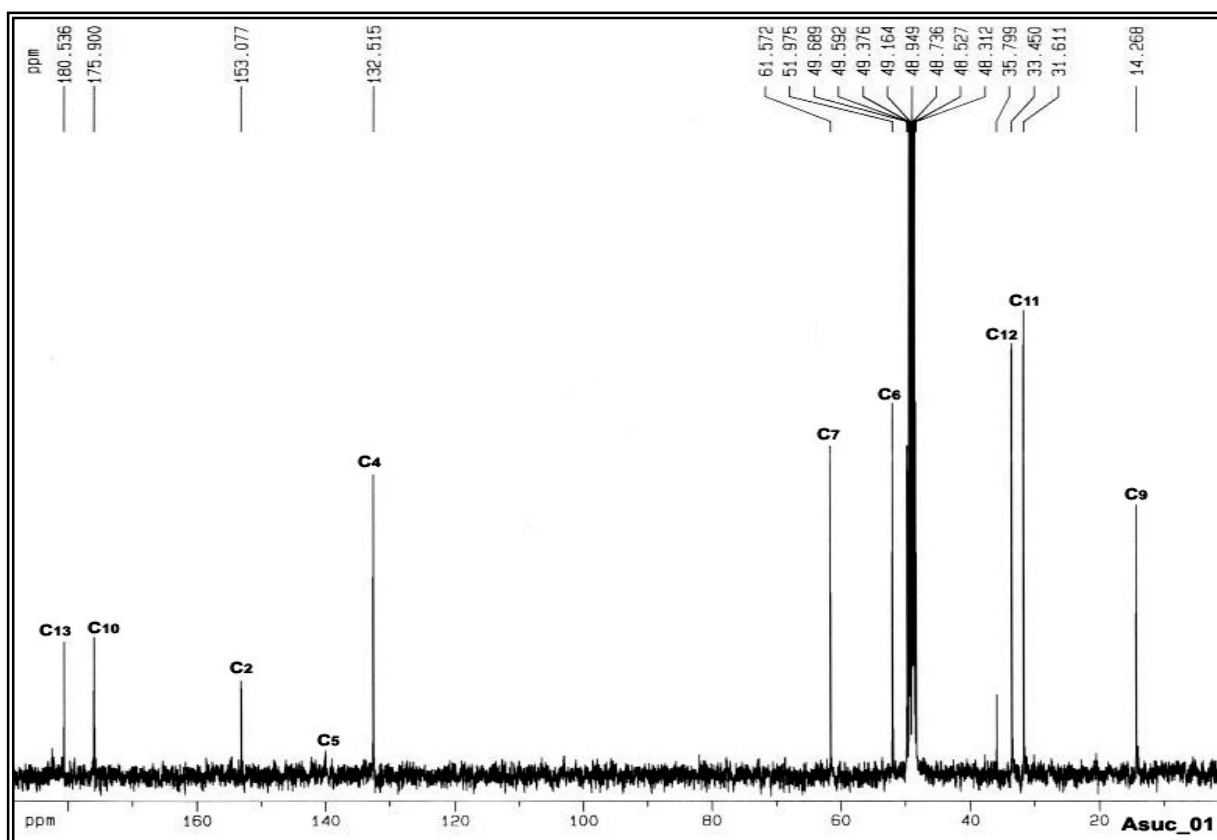
	$\delta \text{ } ^1\text{H J (Hz)}$	
H_4	7,94 s	
H_6	4,48 t (J=2,5)	
H_7	3,85 t (J=2,5)	
H_9	2,53 s	
H_{11}	2,41 t (J=7,5)	
H_{12}	2,57 t (J=7,5)	



Espectro 4. RMN de ^1H do Composto A em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.

Tabela 7. Atribuições dos sinais de RMN ^{13}C em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$ do Composto A.

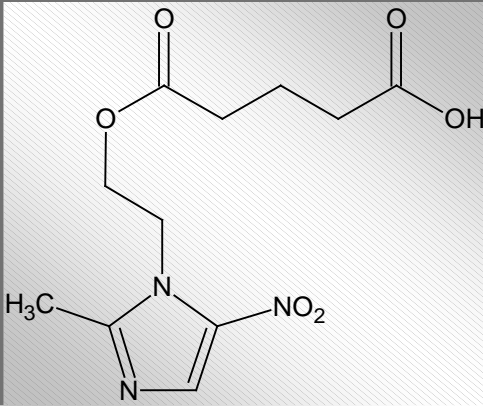
	δ (ppm)
C ₂	253,1
C ₄	132,5
C ₅	140,0
C ₆	52,0
C ₇	61,6
C ₉	14,3
C ₁₀	175,9
C ₁₁	31,6
C ₁₂	33,4
C ₁₃	180,5

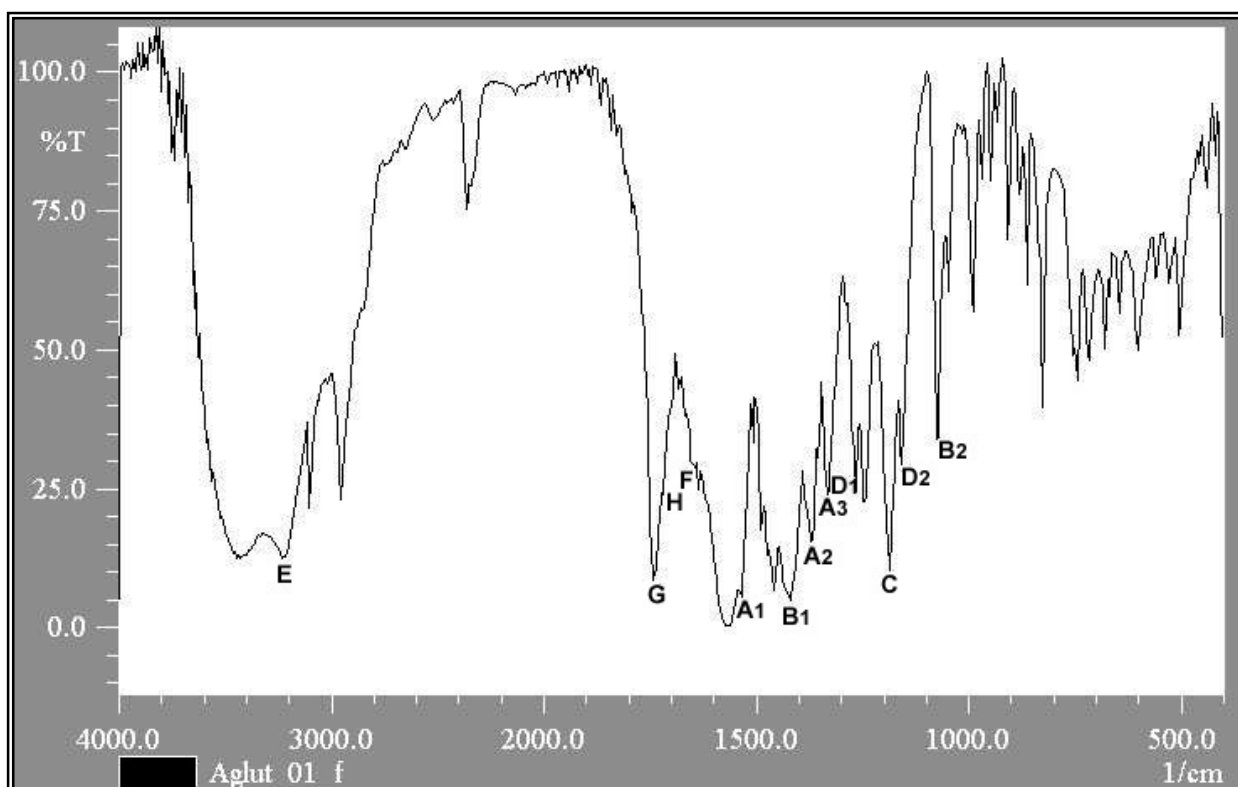



Espectro 5. RMN de ^{13}C do Composto A em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.

Tabela 8. Bandas de absorção do espectro no infravermelho do Composto B (KBr).

Marcador	ν (cm ⁻¹)	Grupo Funcional
A ₁ e A ₂	1535 e 1369	NO ₂
B ₁ e B ₂	1419 e 1074	C-N (alifático)
C	1188	C-O
D ₁ e D ₂	1265 e 1159	C-OH (primário)
E	3219	OH
F	1652	C=C ou C=N
G	1739	C=O (éster)
H	1718	C=O (ácido carboxílico)

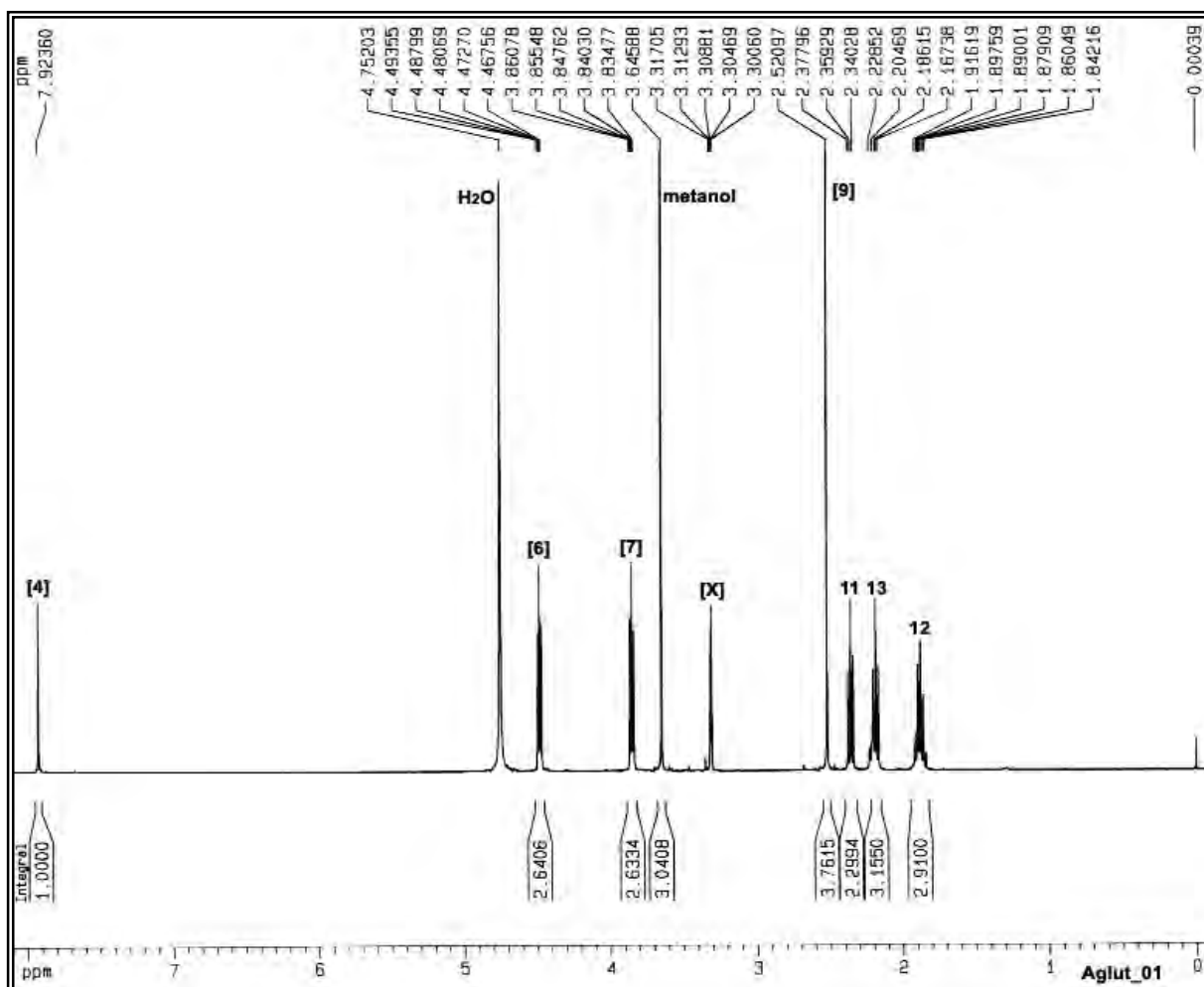




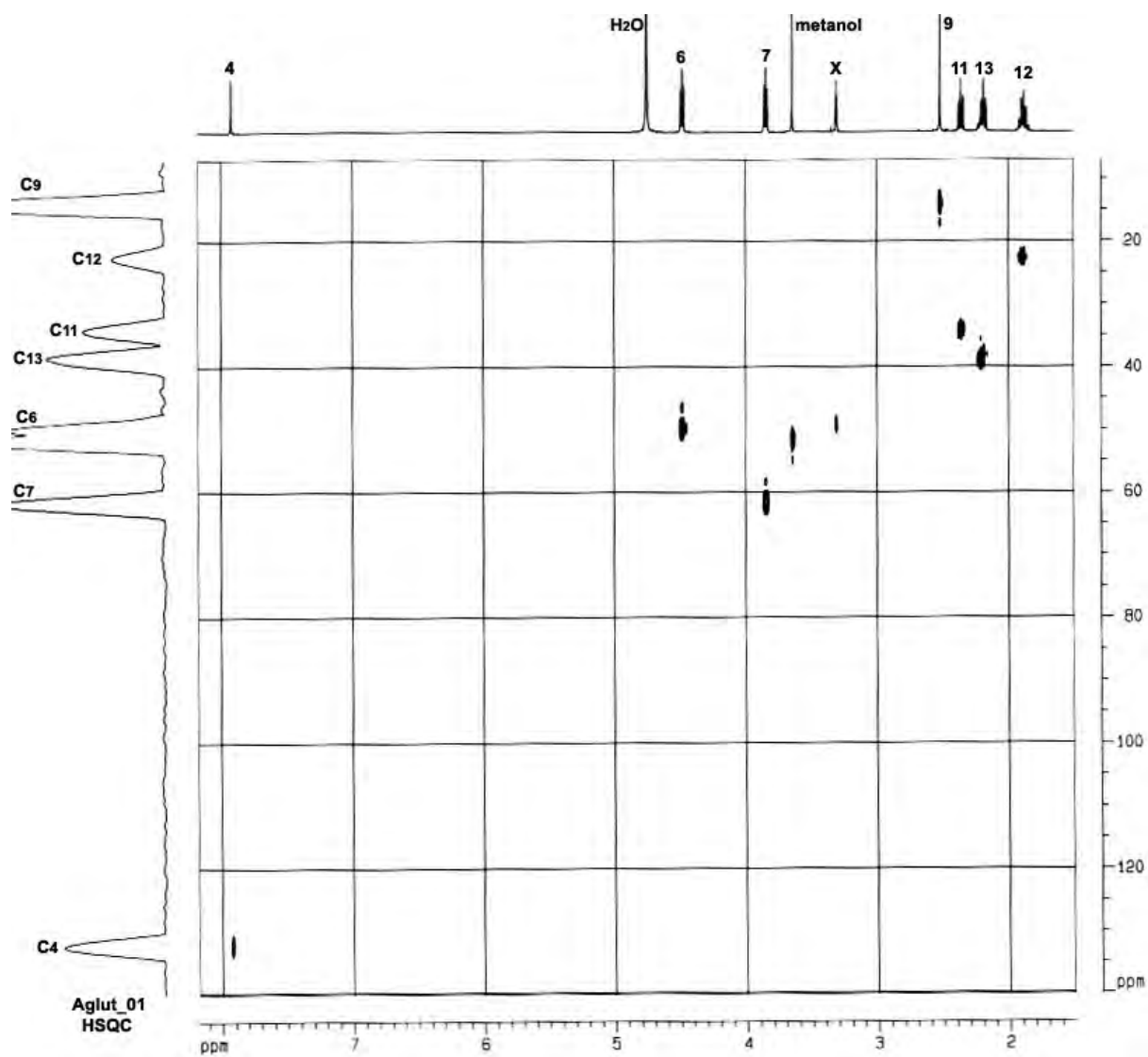
Espectro 6. Infravermelho do Composto B (KBr).

Tabela 9. Atribuições dos sinais de RMN ^1H em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$ do Composto B.

	$\delta \text{ } ^1\text{H J (Hz)}$	
H_4	7,92 s	
H_6	4,43 t (J=2,53)	
H_7	3,85 t (J=2,53)	
H_9	2,52 s	
H_{11}	2,36 t (J=7,5)	
H_{12}	1,84 t (J=7,5)	
H_{13}	2,19 t (J=7,5)	



Espectro 7. RMN de ^1H do Composto B em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.



Espectro 8. HSQC do Composto B em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.

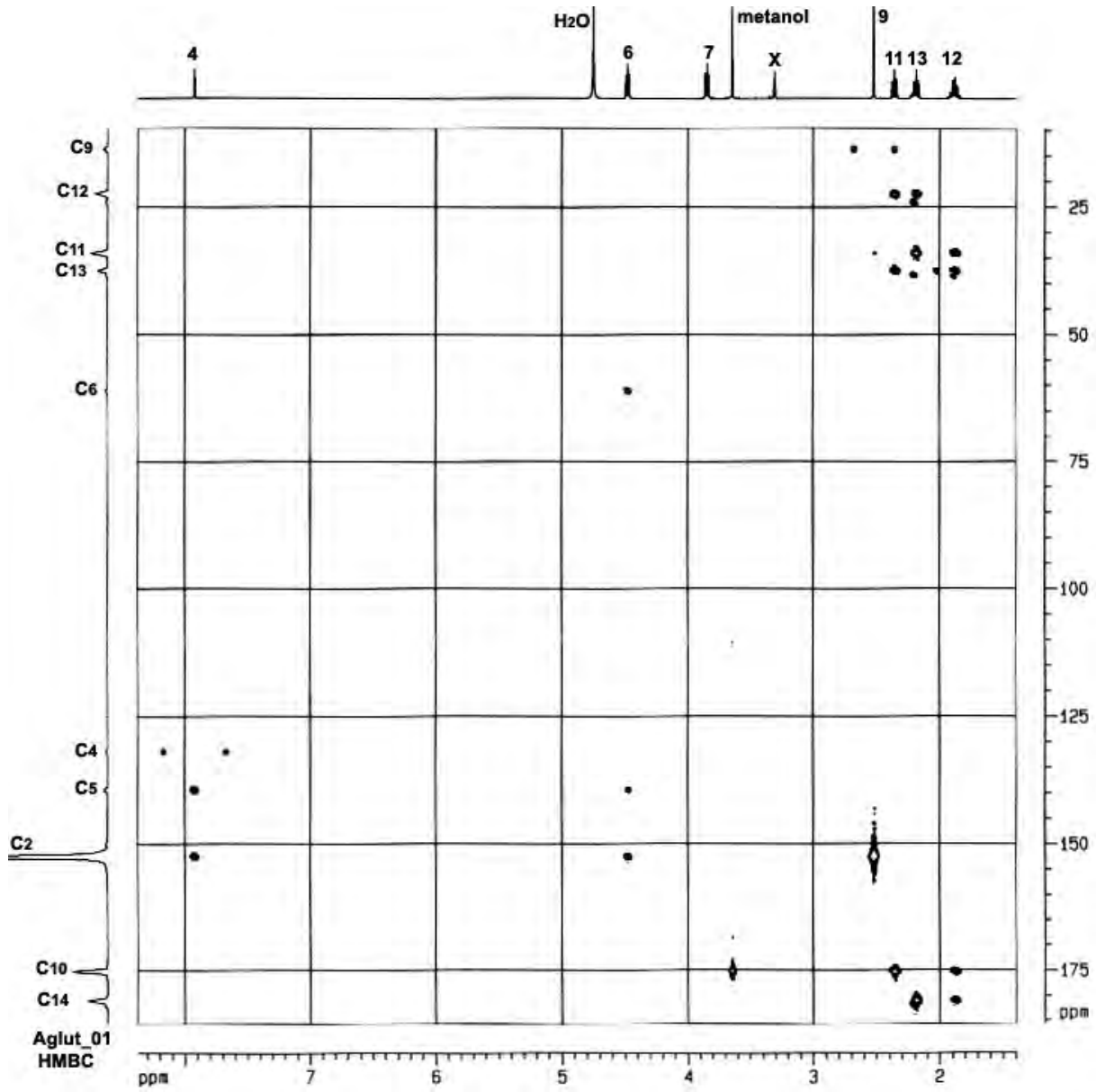
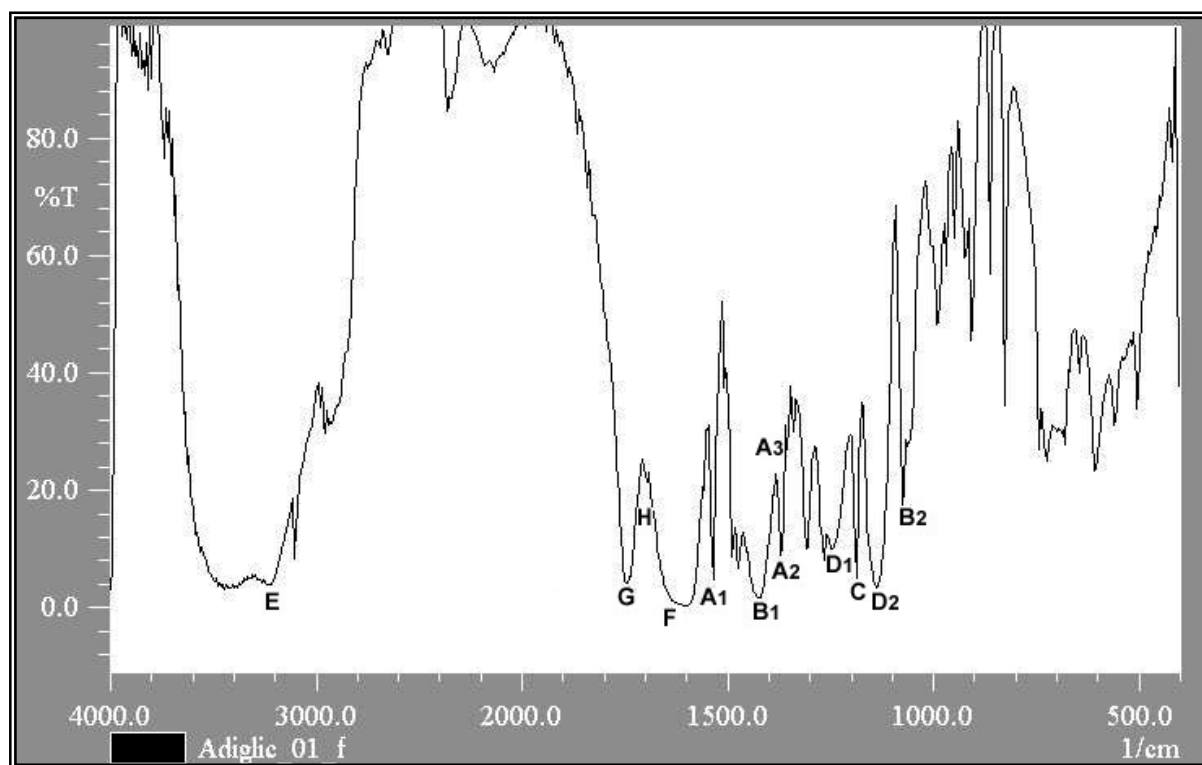
Espectro 9. HMBC do Composto B em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.

Tabela 10. Bandas de absorção do espectro no infravermelho do Composto C (KBr).

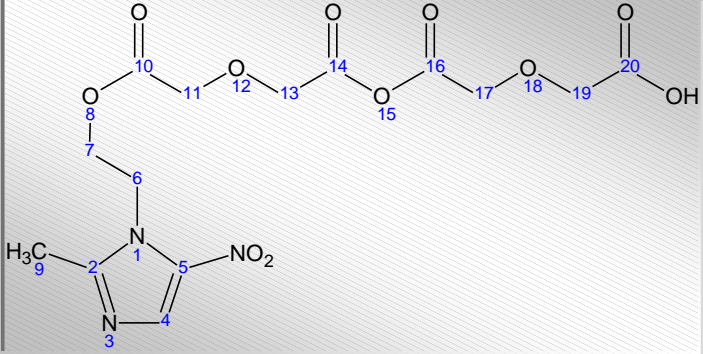
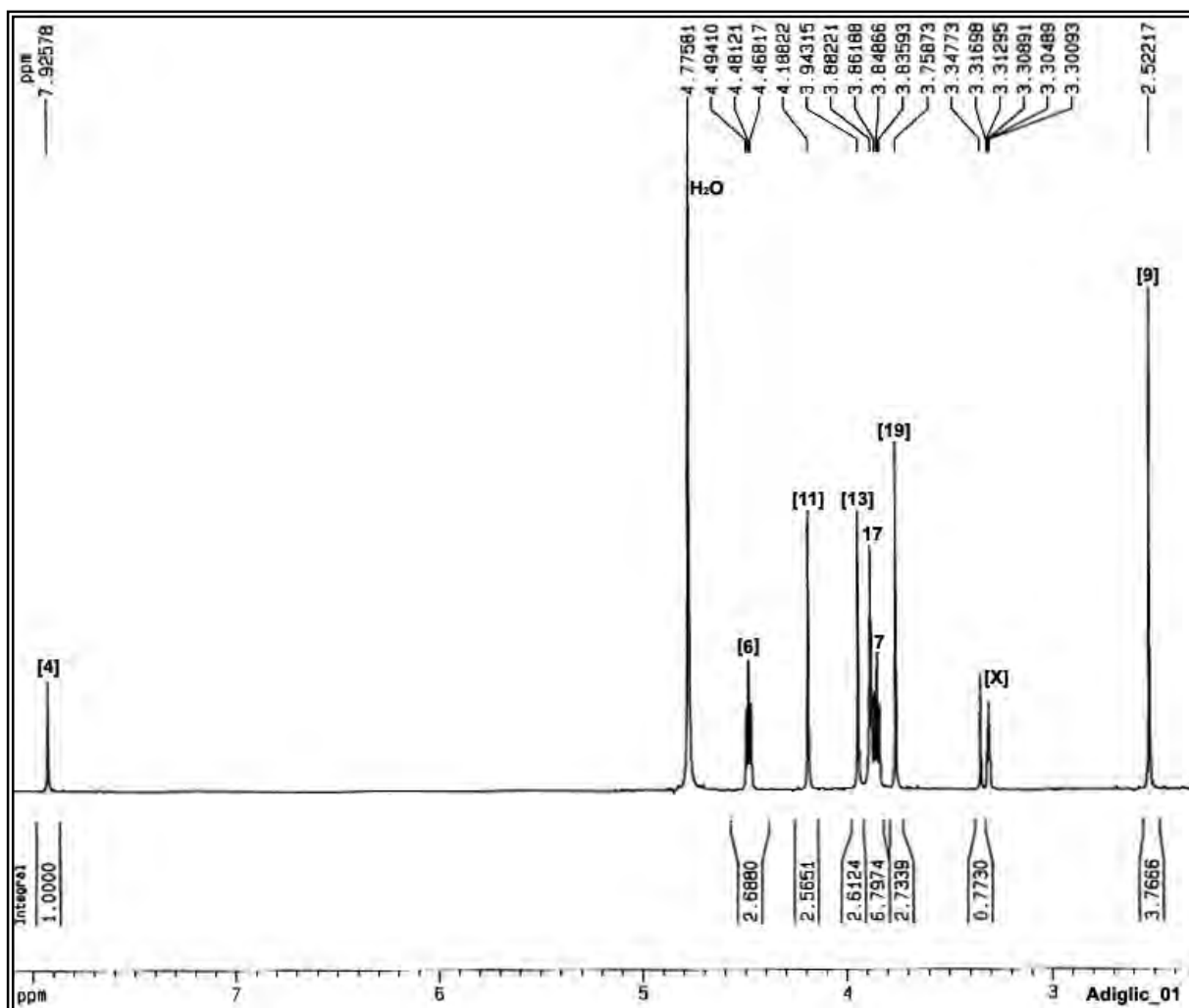
Marcador	ν (cm ⁻¹)	Grupo Funcional
A ₁ e A ₂	1535 e 1369	NO ₂
B ₁ e B ₂	1429 e 1074	C-N (alifático)
C	1188	C-O
D ₁ e D ₂	1265 e 1137	C-OH (primário)
E	3220	OH
F	1652	C=C ou C=N
G	1745	C=O (éster)
H	1718	C=O (ácido carboxílico)



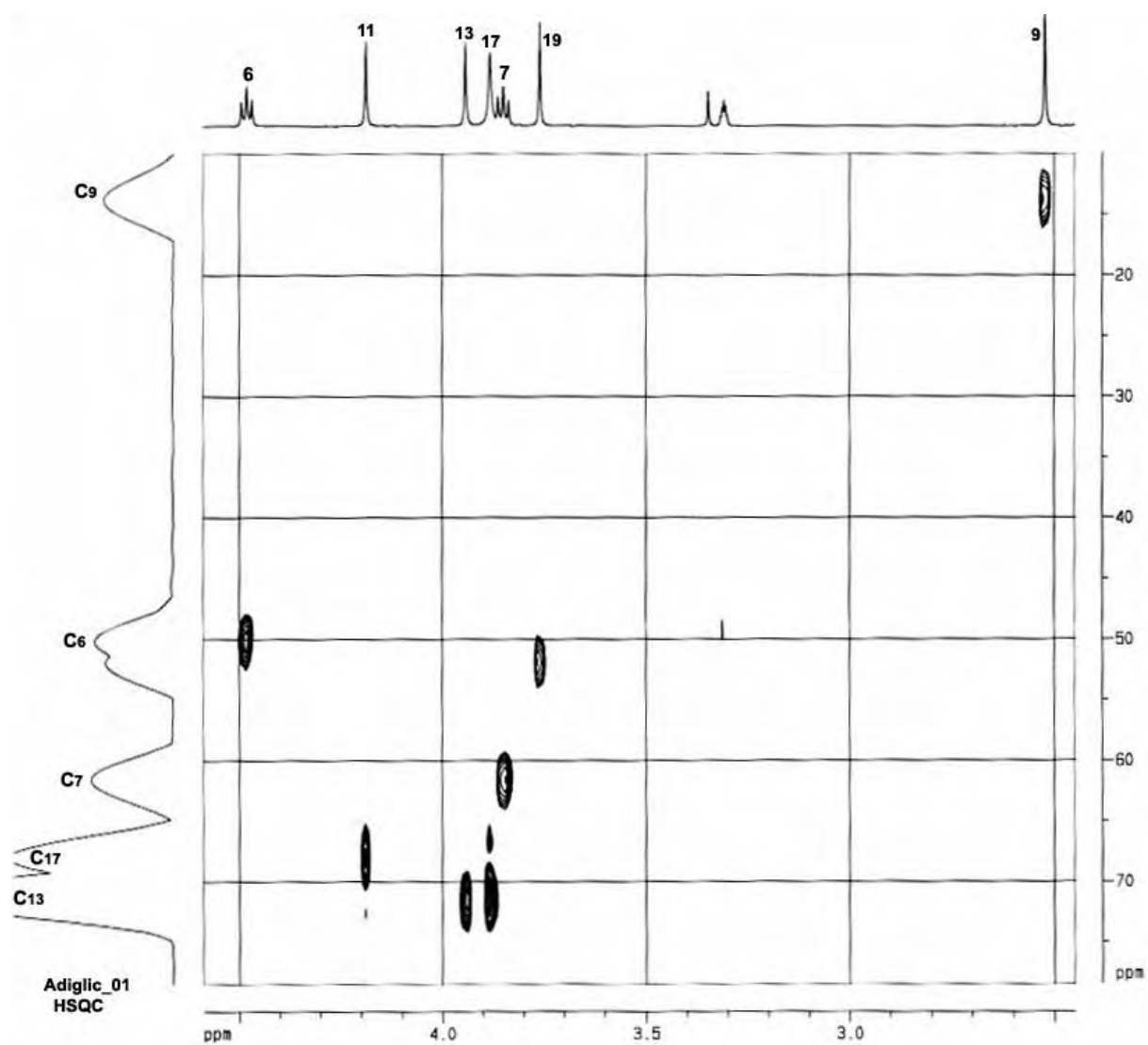
Espectro 10. Infravermelho do Composto C (KBr).

Tabela 11. Atribuições dos sinais de RMN ^1H em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$ do Composto C.

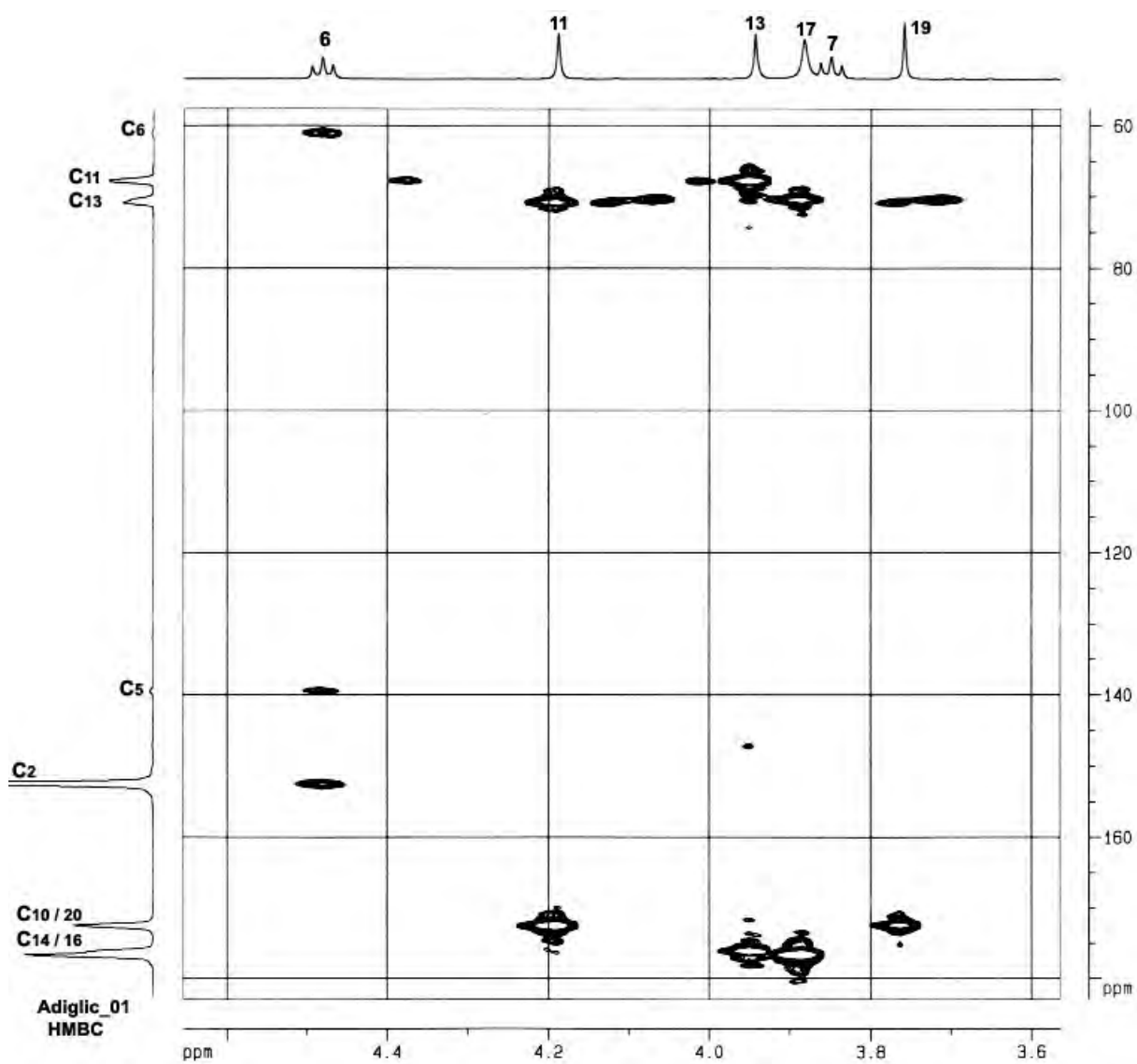
	δ ^1H J (Hz)
H_4	7,93 s
H_6	4,48 t (J=5,1)
H_7	3,85 t (J=5,1)
H_9	2,52 s
H_{11} H_{13}	4,19 s / 3,94 s
H_{17} H_{19}	3,86 s / 3,76 s

Espectro 11. RMN de ^1H do Composto C em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.



Espectro 12. HSQC do Composto C em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.



Espectro 13. HMBC do Composto C em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.

5.4. Obtenção do composto D.

O composto D foi obtido após estudo da melhor faixa de pH, temperatura e tempo de reação, obtendo-se os seguintes resultados (*tabela 12*):

Tabela 12. Rendimento obtido das sínteses do composto D.

Composto	Rota	Solvente	Faixa de pH	Temperatura (°C)	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
D	D1	• água	2,5	25	48	0
	D2	• etanol	3,2	25	48	0
	D3	• água	8,5-14	60	48	0
	D4	• metanol	10-14	60	48	0
	D5	• metanol	12-13	60	3	50

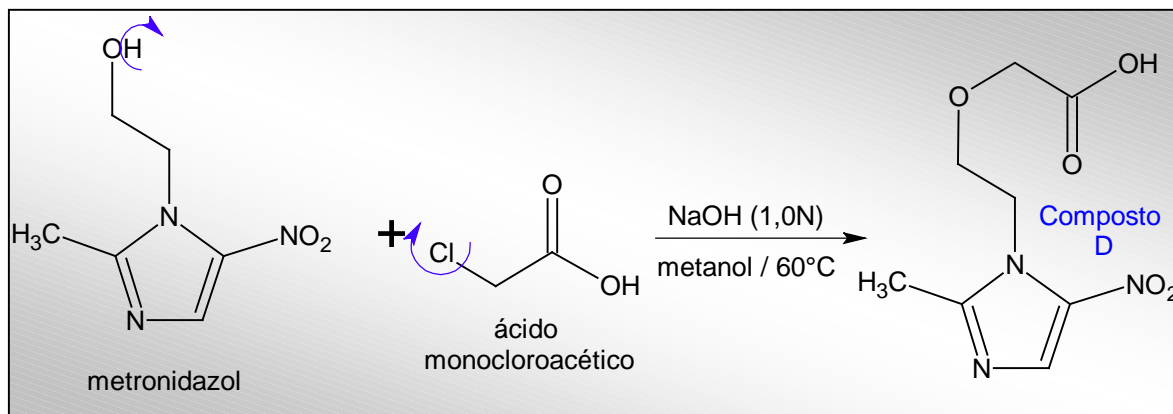
As rotas D1 e D2 seriam incapazes de formar o produto esperado, uma vez que o meio encontrava-se ácido, impedindo a formação do alcoolato, que é essencial para a formação do composto D. O meio ácido favorece a formação do éster através da porção carboxila do ácido monocloroacético e alcoólica do metronidazol, além de dificultar a reação pelos mesmos motivos já descritos na página 47.

As rotas D3 e D4 também não obtiveram sucesso, devido a não formação do alcoolato, uma vez que a base, fora adicionada após o ácido monocloroacético, reagindo com este, ao invés de atuar sobre a hidroxila do metronidazol.

A rota D5, foi realizada adicionando-se a base sobre o metronidazol gerando assim um alcoolato (como nas reações anteriores), possibilitando a reação com o

ácido o ácido monocloroacético, obtendo-se o composto **D** (*ácido [2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etóxi] acético*).

ROTA – D5



A formação do composto D foi confirmada pelo espectro de IR (14), pela presença de todas as bandas (ν) do metronidazol além das bandas (ν) em 1608 cm^{-1} (COO^-) e 1718 cm^{-1} (C=O de ácido carboxílico); no espectro de RMN de ^1H (15), pelos deslocamentos químicos δ (ppm) típicos do metronidazol e de mais um sinal em 3,96 (H_{10}) do CH_2 da cadeia lateral; e no espectro de RMN de ^{13}C (16), pelos deslocamentos químicos δ (ppm) típicos do metronidazol e de mais 2 sinais em 61,6 (C_{10}) e 170,5 (C_{11}).

Tabela 13. Bandas de absorção do espectro no infravermelho do Composto D (KBr).

Marcador	ν (cm ⁻¹)	Grupo Funcional
A ₁ e A ₂	1535 e 1369	NO ₂
A ₃	1355	N=O (R-NO ₂)
B ₁ e B ₂	1429 e 1074	C-N (alifático)
C	1188	C-O
D ₁ e D ₂	1267 e 1159	C-OH (primário)
E	3224 a 3215	O-H
G	1608	COO ⁻
H	1718	C=O (ácido carboxílico)

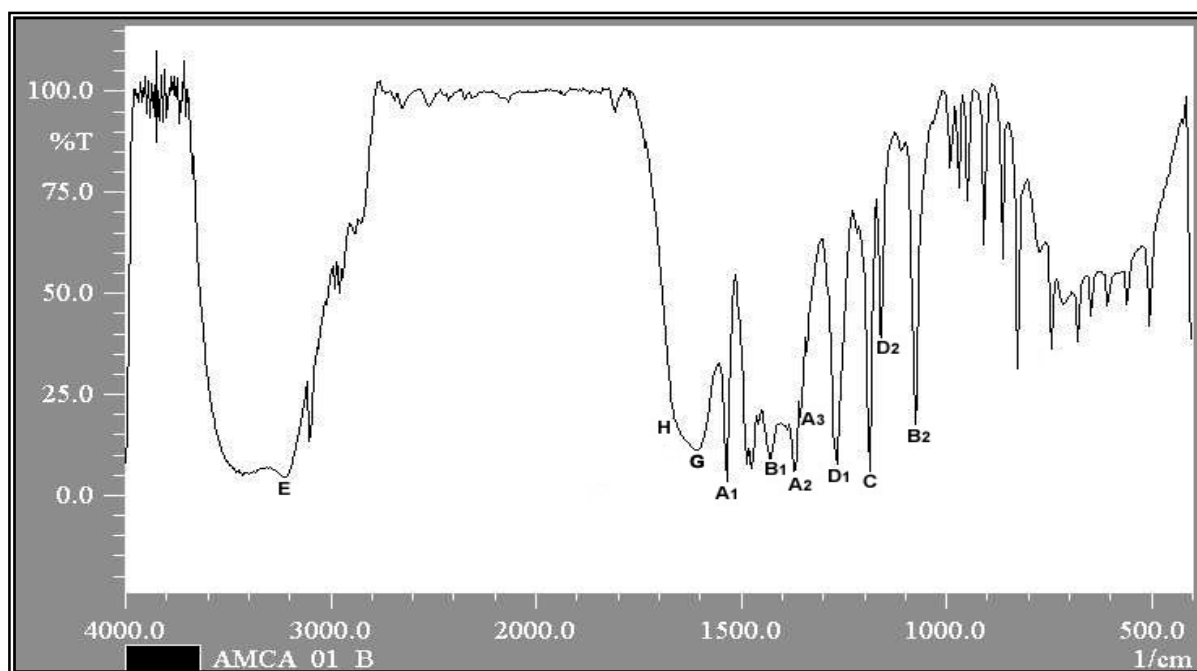
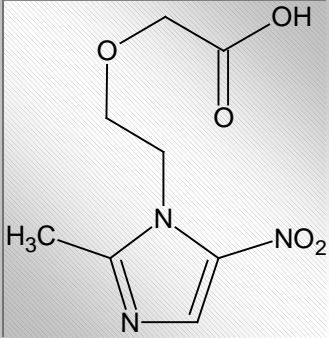
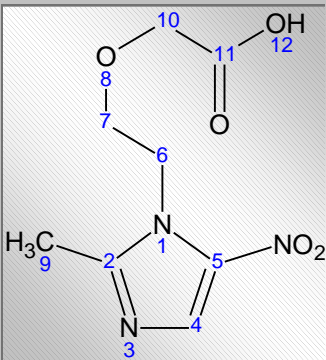
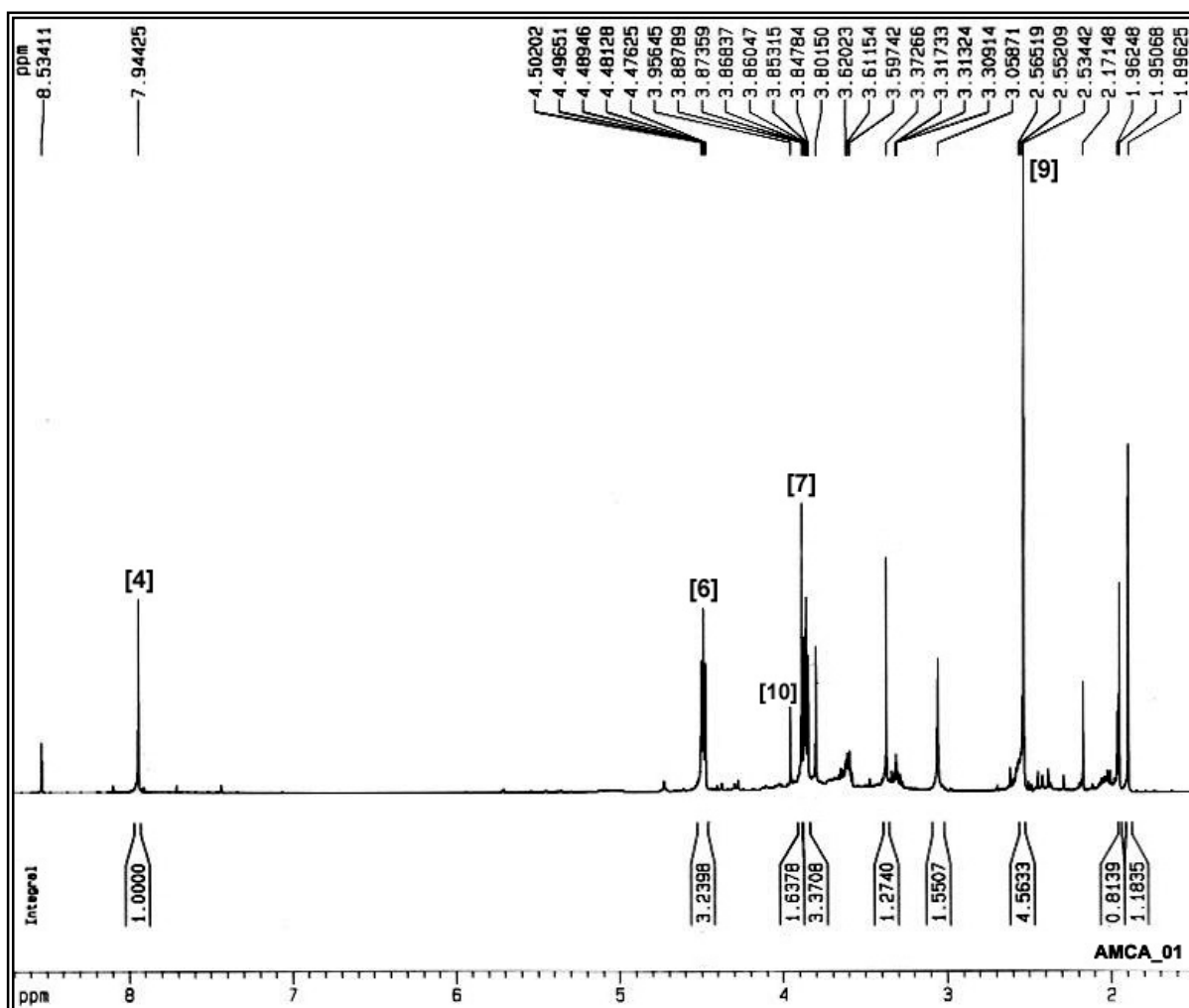
**Espectro 14.** Infravermelho do Composto D (KBr).

Tabela 14. Atribuições dos sinais de RMN ^1H em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$ do Composto D.

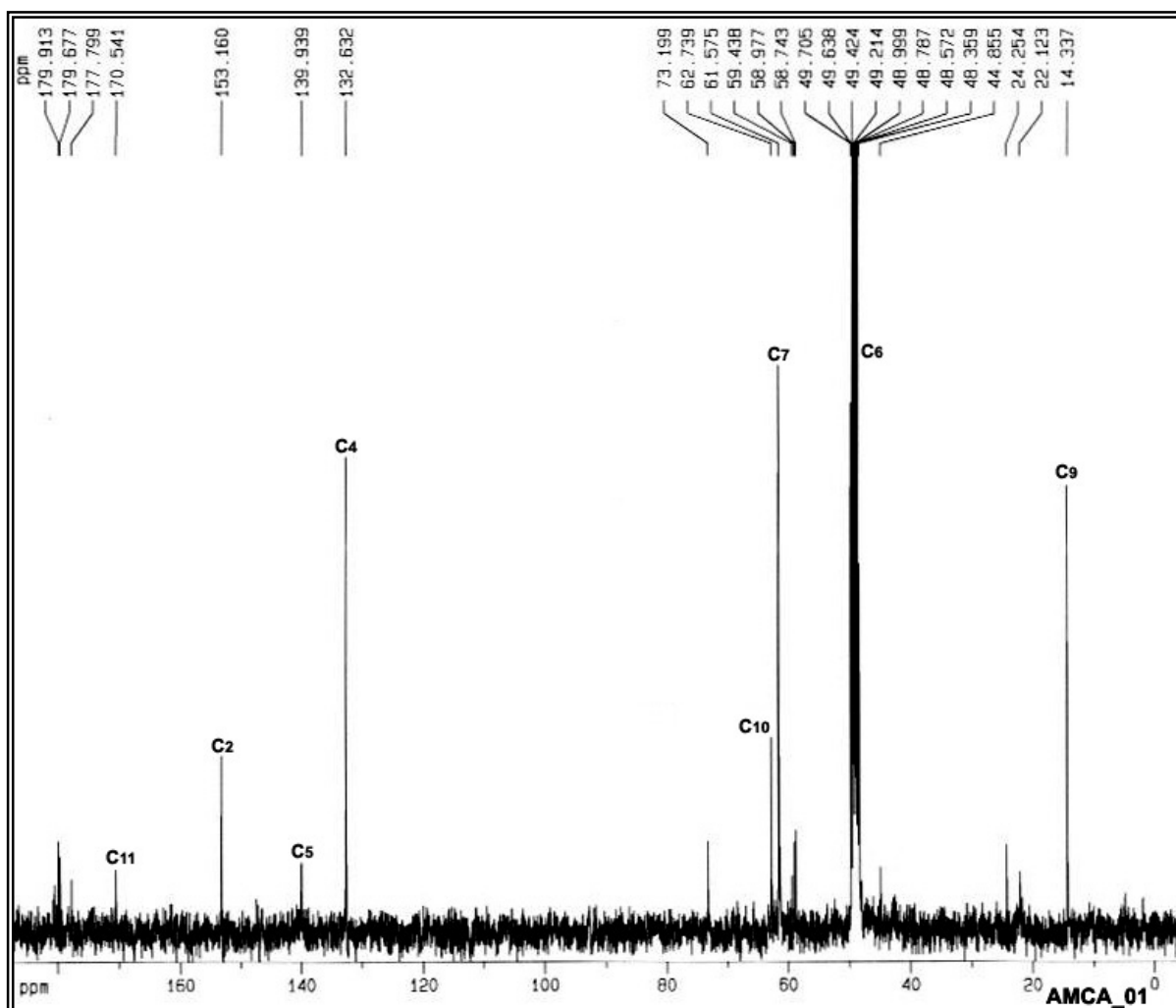
	$\delta \text{ } ^1\text{H J (Hz)}$	
H_4	7,94 s	
H_6	4,49 t (J=2,5)	
H_7	3,89 t (J=2,5)	
H_9	2,53 s	
H_{10}	3,96 s	



Espectro 15. RMN de ^1H do Composto D em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.

Tabela 15. Atribuições dos sinais de RMN ^{13}C em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$ do Composto D.

	δ (ppm)
C ₂	153,2
C ₄	132,6
C ₅	140,0
C ₆	449,42
C ₇	61,6
C ₉	14,3
C ₁₀	62,7
C ₁₁	170,5



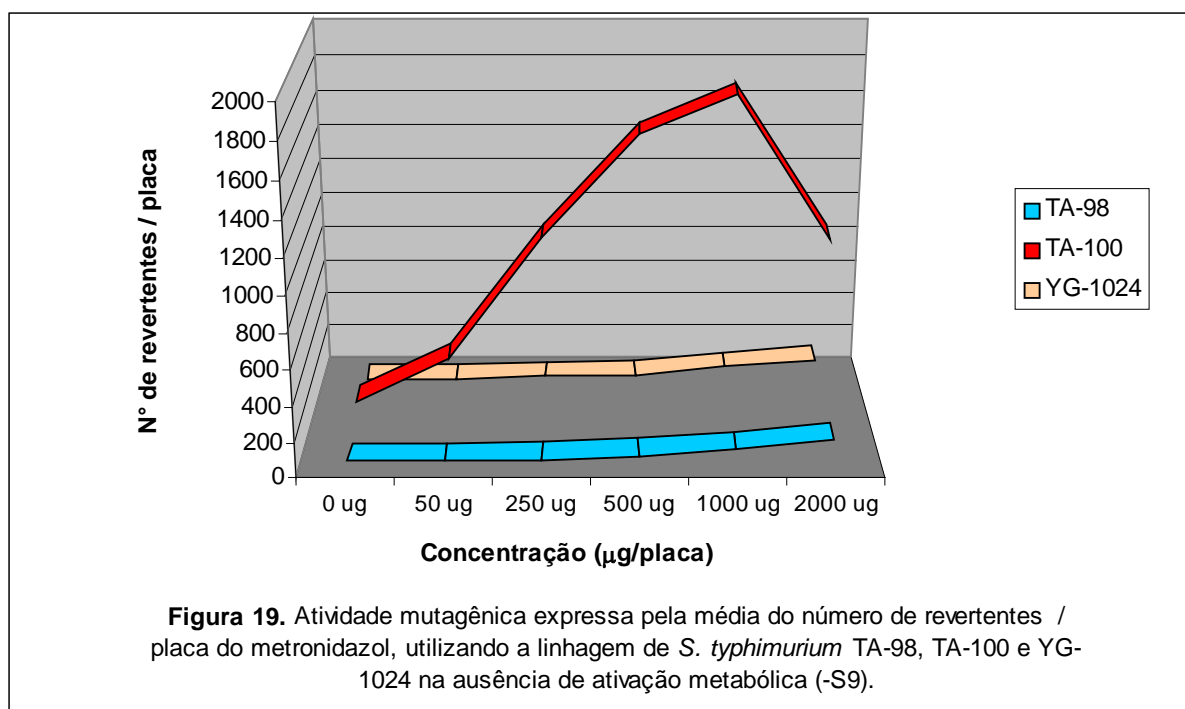
Espectro 16. RMN de ^{13}C do Composto D em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.

5.5. Atividade mutagênica.

Tendo-se como base o trabalho de Rosenkranz e colaboradores (1976), o qual utiliza 25 e 250µg/placa de metronidazol em cepas de *S. typhimurium* TA-100, em concordância com Voogd e colaboradores (1979) que utiliza a mesma linhagem e a dose diária de 750mg de metronidazol, relacionada ao protocolo de tratamento de infecções causadas por *H. pylori*, testou-se as concentrações de 50, 250, 500, 1000 e 2000µg/placa, em diferentes tipos de linhagens de *S. typhimurium*, afim de se encontrar a melhor linhagem e a dose exata para comparação com os demais derivados metronidazol, obtidos neste trabalho (tabela 16 e figura 19).

Tabela 16. Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão ($M \pm SD$) do número de revertentes / placa e razão de mutagenicidade (RM) do metronidazol utilizando as linhagens de *S. typhimurium* TA-98, TA-100 e YG¹⁰²⁴ na ausência de ativação metabólica (-S9).

Tratamento (µg/placa)	Média de revertentes / placa (RM)		
	TA-98	TA-100	YG ¹⁰²⁴
0	19,0 ± 4	123 ± 13	21 ± 5
50	19,0 ± 9 (1,0)	376 ± 38 (3,1)	23 ± 3 (1,1)
250	28,0 ± 7 (1,5)	1059 ± 103 (8,6)	40 ± 11 (1,9)
500	49,0 ± 2 (2,6)	1626 ± 77 (13,2)	49 ± 5 (2,3)
1000	83,0 ± 4 (4,4)	1832 ± 36 (14,9)	97 ± 5 (4,6)
2000	146,0 ± 15 (7,7)	1053 ± 227 (8,6)	142 ± 32 (6,7)

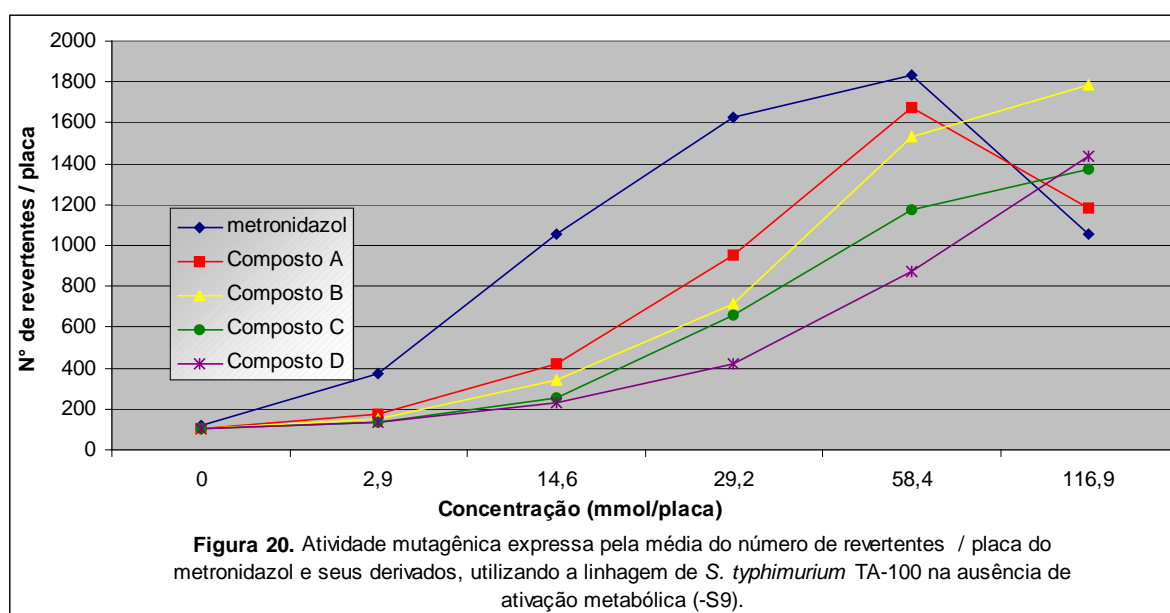


Pelo observado na tabela 16 e figura 19, confirma-se que a linhagem de *S. typhimurium* TA-100 foi a mais adequada para se estudar a atividade mutagênica do metronidazol e seus derivados, devido ao número de revertentes observados. Além de confirmar que o metronidazol apresenta atividade mutagênica pelo mecanismo de substituição de pares de base de DNA inerente a esta linhagem, diferentemente do mecanismo observado nas linhagens YG¹⁰²⁴ e TA-98 as quais sofrem efeito mutagênico pelo deslocamento do quadro de leitura do DNA.

Após execução do teste de Ames, sem ativação metabólica (-S9), com a linhagem de *S. typhimurium* TA-100 para os derivados do metronidazol sintetizados, constatou-se que todos apresentam atividade mutagênica a partir da concentração de 14,6 mmol/placa ($RM \geq 2$), com exceção do metronidazol que apresenta tal atividade a partir da dose de 2,9 mmol/placa ($RM \geq 2$) (tabela 17 e figura 20). Também pode-se observar a citotoxicidade do metronidazol e do composto A, a partir da dose de 116,9 mmol/placa.

Tabela 17. Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão ($M \pm SD$) do número de revertentes / placa e razão de mutagenicidade (RM) do metronidazol e seus derivados utilizando a linhagem de *S. typhimurium* TA-100 na ausência de ativação metabólica (-S9).

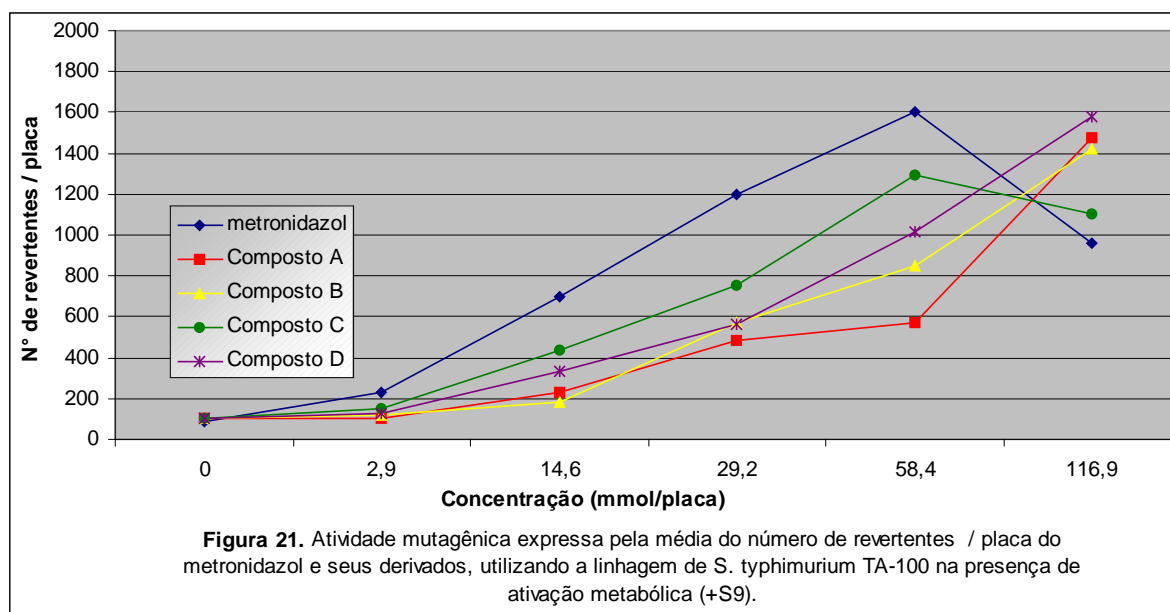
Tratamento (mM)/placa	Compostos				
	Metronidazol	A	B	C	D
0	123 \pm 13	106 \pm 8	106 \pm 8	106 \pm 8	106 \pm 8
2,9	376 \pm 38 (3,1)	175 \pm 37 (1,6)	151 \pm 21 (1,4)	137 \pm 4 (1,3)	135 \pm 15 (1,3)
14,6	1059 \pm 103 (8,6)	420 \pm 90 (4,0)	340 \pm 73 (3,2)	252 \pm 45 (2,4)	234 \pm 10 (2,2)
29,2	1626 \pm 77 (13,2)	954 \pm 101 (9,0)	712 \pm 131 (6,7)	662 \pm 70 (6,2)	423 \pm 61 (4,0)
58,4	1832 \pm 36 (14,9)	1674 \pm 233 (15,8)	1532 \pm 179 (14,4)	1172 \pm 18 (11,1)	871 \pm 87 (8,2)
116,9	1053 \pm 227 (8,6)	1181 \pm 224 (11,1)	1786 \pm 81 (16,8)	1373 \pm 14 (13,0)	1433 \pm 9 (13,5)



Após execução do teste de Ames, com ativação metabólica (+S9), com a linhagem de *S. typhimurium* TA-100 para os derivados do metronidazol sintetizados, constatou-se que todos apresentam atividade mutagênica a partir da concentração de 14,6 nmol/placa ($RM \geq 2$), com exceção do composto B que apresenta tal atividade a partir da dose 29,2 nmol/placa e do metronidazol que apresenta tal atividade a partir da dose de 2,9 nmol/placa ($RM \geq 2$) (tabela 18 e figura 21). Também pode-se observar a citotoxicidade do metronidazol e do composto A, a partir da dose de 116,9 nmol/placa.

Tabela 18. Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão ($M \pm SD$) do número de revertentes / placa e razão de mutagenicidade (RM) do metronidazol e seus derivados utilizando a linhagem de *S. typhimurium* TA-100 na presença de ativação metabólica (+S9).

Tratamento (mM)/placa	Compostos				
	Metronidazol	A	B	C	D
0	91 ± 6	105 ± 15	105 ± 15	105 ± 15	105 ± 15
2,9	231 ± 25 (2,5)	106 ± 10 (1,0)	116 ± 13 (1,1)	148 ± 5 (1,4)	126 ± 12 (1,2)
14,6	697 ± 56 (7,7)	229 ± 26 (2,2)	186 ± 67 (1,8)	433 ± 9 (4,1)	332 ± 30 (3,2)
29,2	1202 ± 35 (13,2)	484 ± 27 (4,6)	572 ± 42 (5,4)	751 ± 199 (7,2)	561 ± 60 (5,3)
58,4	1600 ± 62 (17,6)	574 ± 64 (5,5)	847 ± 147 (8,1)	1296 ± 98 (12,3)	1018 ± 68 (9,7)
116,9	961 ± 156 (10,6)	1478 ± 11 (14,1)	1423 ± 156 (13,6)	1100 ± 72 (10,5)	1576 ± 95 (15,0)



Devido a presença de vários átomos de oxigênio na cadeia lateral dos pró-fármacos A – C relacionado ao grande efeito de atração de elétrons do anel imidazólico do metronidazol e por consequência de seu grupo nitro, era de se esperar um aumento da atividade mutagênica do pró-fármaco. Porém, não foi isso que fora observado e sim a redução da atividade mutagênica, provavelmente devido a alteração da planaridade molecular.

De acordo com os resultados obtidos e após a análise estatística dos mesmos pelo modelo de Bernstein (0,01 e 0,05), observou-se que a latenciação do metronidazol, é capaz de diminuir significativamente o efeito mutagênico do mesmo, com ou sem ativação metabólica, como observado na *tabela 19*, confirmando os dados de Guido e colaboradores (2001), sugerindo que o processo de modificação molecular por latenciação, pode diminuir o efeito mutagênico de fármacos com grupo nitro.

Tabela 19. Porcentagem (%) de redução da atividade mutagênica utilizando a linhagem de *S. typhimurium* TA-100 na ausência (-S9) e na presença de ativação metabólica (+S9) dos derivados de metronidazol.

Composto	- S9	+ S9
A	53 %	78 %
B	62 %	86 %
C	82 %	46 %
D	82 %	60 %

Tais dados demonstram que este trabalho merece atenção e continuidade na realização de ensaios de atividade antimicrobiana e toxicidade em animais, para confirmar a diminuição da toxicidade sem que tenha ocorrido perda da atividade biológica. Sendo que, caso estes dados se confirmem, tais compostos tornar-se-ão potenciais substâncias a serem submetidos a ensaios clínicos.

VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foram obtidos os compostos:

- (A) *ácido 4-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etóxi]-4-oxobutanóico*, a partir da reação do metronidazol com o anidrido succínico;
- (B) *ácido 5-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etóxi]-5-oxopentanóico*, a partir da reação do metronidazol com o anidrido glutárico;
- (C) *ácido {2-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etóxi]-2-oxoetóxi} acético*, a partir da reação do metronidazol com o anidrido diglicólico;
- (D) *ácido [2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etóxi] acético*, a partir da reação do metronidazol com o ácido monocloroacético.

As rotas sintéticas para obtenção dos compostos A – C são simples, mostrando, desta forma, que o processo de latenciação é viável para a busca de novos pró-fármacos.

Os compostos A – D apresentam atividade mutagênica de 53-82% menor do que àquela apresentada pelo fármaco matriz em ensaio sem ativação metabólica (-S9) e de 46-86% menor do que àquela apresentada pelo fármaco matriz em ensaio com ativação metabólica (+S9), sugerindo que a latenciação seja um processo eficaz na redução do efeito mutagênico e citotóxico do metronidazol.

Como perspectivas tem-se a realização de:

- testes de atividade antimicrobiana, para a confirmação da manutenção da atividade antimicrobiana;
- testes de toxicidade (DL₅₀) em animais.

VII. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

7.1. Síntese do composto A.

- Adicionar 10mL de metanol no balão de 3 bocas (100mL);
- Esperar a temperatura estabilizar 60°C;
- Adicionar 0,315g metronidazol;
- Esperar dissolver o metronidazol;
- Adicionar 2 mL de NaOH 1N;
- Esperar a mistura reacional ficar rosa;
- Adicionar 0,2g de anidrido succínico;
- Esperar a mistura reacional ficar amarelo alaranjado (1-5 minutos);
- Deixar em refluxo com agitação a 60°C por 2 horas;
- Verificar o pH e o aspecto;
 - ✓ 5 minutos pH \Rightarrow 7 (Amarelo tangerina claro).
 - ✓ 1ª hora pH \Rightarrow 7 (Amarelo tangerina + claro).
 - ✓ 2ª hora pH \Rightarrow 7 (Amarelo tangerina + claro para esverdeado).
- Transferir para frascos com tampa e esperar atingir 25°C;
- Deixa-se na geladeira a 8°C overnight para forçar a cristalização;
- Filtra-se todos por pressão reduzida;
- O solvente filtrado é levado para uma placa aquecida a 60°C;
- Esperar pela evaporação de todo o solvente;
- Guardar o frasco e o papel de filtro (com produto) no dessecador;
- Verificar o rendimento, a faixa de fusão e o infravermelho IR dos produtos dos frascos (f) e do papel de filtro (p);
- Observar que o composto A está solúvel no metanol e que os cristais que ficaram retidos no filtro (placa) gerados por cristalização a frio são o metronidazol.
- O rendimento do composto A é de 0,47 g (94%);
- O produto não funde e o mesmo só carboniza na faixa de 201°C;
- Verificar os espectros de IR e RMN, os quais já foram discutidos.

7.2. Síntese do composto B.

- Adicionar 10mL de metanol no balão de 3 bocas (100mL);
- Esperar a temperatura estabilizar 60°C;
- Adicionar 0,300g metronidazol;
- Esperar dissolver o metronidazol;
- Adicionar 2 mL de NaOH 1N;
- Esperar a mistura reacional ficar rosa (em 30 min);
- Adicionar 0,250g de anidrido glutárico;
- A mistura reacional fica Amarelo esverdeado (pH6);
- Adicionar 1 mL de NaOH 1N;
- A mistura reacional fica rosa (pH12);
- Deixar em agitação a 25°C por 5 horas;
- Verificar o pH e o aspecto;
 - ✓ 05 minutos pH \Rightarrow 12 (Vermelho alaranjado claro).
 - ✓ 1ª hora pH \Rightarrow 11 (Vermelho alaranjado claro).
 - ✓ 2ª hora pH \Rightarrow 11 (Vermelho alaranjado + claro).
 - ✓ 3ª hora pH \Rightarrow 09 (Rosa alaranjado claro).
 - ✓ 4ª hora pH \Rightarrow 08 (Rosa alaranjado + claro transparente).
 - ✓ 5ª hora pH \Rightarrow 08 (Rosa alaranjado + claro transparente).
- Transferir para frasco com tampa e esperar atingir 25°C;
- Deixar na geladeira a 8°C overnight para forçar a cristalização;
- Há formação de poucos cristais;
- Filtrar por pressão reduzida;
- O solvente filtrado é levado para uma placa aquecida a 60°C;
- Esperar pela evaporação de todo o solvente;
- Guardar todos os frascos e os papéis de filtro (com produto) no dessecador;
- Verificar o rendimento, a faixa de fusão e o infravermelho IR dos produtos dos frascos (f) e do papel de filtro (p);

Composto (f)	Rendimento (g)	Faixa de carbonização
Composto B	\Rightarrow 0,30 (60%)	\Rightarrow 203 – 205°C

- O IR revela que os cristais que ficaram retidos no filtro (placa) gerados por cristalização a frio são o metronidazol. E que o produto estava solubilizado no metanol;
- Verificar os espectros de RMN, os quais já foram discutidos.

7.3. Síntese do composto C.

- Adicionar 10mL de metanol no balão de 3 bocas (100mL);
- Esperar a temperatura estabilizar 60°C;
- Adicionar 0,298g metronidazol;
- Esperar dissolver o metronidazol;
- Adicionar 3 mL de NaOH 1N;
- Esperar a mistura reacional ficar rosa;
- Adicionar 0,252g de anidrido diglicólico;
- Esperar a mistura reacional ficar Amarelo alaranjado;
- Deixar em refluxo com agitação a 60°C por 5 horas e até 24h em 25°C;
- Verificar o pH e o aspecto;
 - ✓ 05 minutos pH \Rightarrow 7 (Amarelo tangerina claro).
 - ✓ 1^a hora pH \Rightarrow 7 (Amarelo claro).
 - ✓ 2^a hora pH \Rightarrow 7 (Amarelo esverdeado).
 - ✓ 3^a hora pH \Rightarrow 7 (Amarelo esverdeado).
 - ✓ 4^a hora pH \Rightarrow 6,5 (Amarelo esverdeado).
 - ✓ 5^a hora pH \Rightarrow 6,0 (Amarelo esverdeado).
- Transferir para frasco com tampa e esperar atingir 25°C;
- Deixar na geladeira a 8°C overnight para forçar a cristalização;
- Há formação de poucos cristais;
- Filtrar por pressão reduzida;
- O solvente filtrado é levado para uma placa aquecida a 60°C;
- Esperar pela evaporação de todo o solvente;
- Guardar todos os frascos e os papéis de filtro (com produto) no dessecador;
- Verificar o rendimento, a faixa de fusão e o infravermelho IR dos produtos dos frascos (f) e do papel de filtro (p);

Composto (f)	Rendimento (g)	Faixa de fusão (°C)
composto C	\Rightarrow 0,20 (40%)	\Rightarrow 139 - 145

- O IR revela que os cristais que ficaram retidos no filtro (placa) gerados por cristalização a frio são o metronidazol. E que o produto estava solubilizado no metanol;
- Verificar os espectros de RMN, os quais já foram discutidos.

7.4. Síntese do composto D.

- Pesar 0,373g metronidazol e colocar em um balão de fundo redondo de 3 bocas;
- Adicionar 10mL de metanol e esperar dissolver o metronidazol;
- Esperar até a temperatura estabilizar 60°C;
- Adicionar 5,0mL de NaOH 1N;
- Adicionar 0,206g de ácido monocloroacético;
- Deixar em refluxo com agitação a 60°C por 3 horas;
- Verificar sempre o pH e o aspecto.
 - ✓ 0 hora pH \Rightarrow 13 (cereja).
 - ✓ 10 minutos pH \Rightarrow 13 (vinho tinto).
 - ✓ 1ª hora pH \Rightarrow 13 (amarelo avermelhado límpido).
 - ✓ 2ª hora pH \Rightarrow 12 (amarelo avermelhado límpido).
 - ✓ 3ª hora pH \Rightarrow 12 (amarelo avermelhado diluído).
- Retirar uma alíquota no T_{10'}, T_{1h}, T_{2h} e T_{3h} em placa de CCD, junto com o padrão de metronidazol dissolvido em metanol, revelando no UV;
- Deixar o produto no balão na geladeira overnight;
- Observar a formação de cristais muito finos;
- Proceder com centrifugação de 10 mL de amostra a 2.500 rpm / 5 minutos;
- Separar o sobrenadante e evaporar o mesmo a 40°C por 30 minutos;
- Em seguida, deixar o mesmo na capela com o exaustor ligado overnight para retirada do resíduo de solvente que possa ter permanecido;
- O precipitado permanece no tubo em que foi centrifugado e fica na capela com o exaustor ligado overnight para retirada do resíduo de solvente que possa ter permanecido;
- O rendimento é de 0,250g (50%);
- A faixa de fusão do produto é de 146°C;
- Verificar os espectros de IR e RMN, os quais já foram discutidos.

7.5. Teste de Ames para atividade mutagênica.

O procedimento abaixo foi primeiramente desenvolvido por Maron & Ames em 1983 como já comentado.

⊗ Linhagens utilizadas no ensaio.

Utilizou-se para este ensaio cepas de *S. typhimurium* TA98, TA100 e YG1024 do laboratório de mutagenicidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp / Araraquara / SP / Brasil.

A linhagem TA98, detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA. Já a TA100, detecta compostos mutagênicos que causam substituição de pares de bases no DNA.

A linhagem YG1024, é derivada da TA98, produz exageradamente O-acetiltransferases, sendo mais sensível á compostos hidroxilaminos, nitro aromáticos e aminas aromáticas (Watanabe *et al*, 1990).

Tais linhagens, possuem as seguintes características:

- São auxotróficas em relação à histidina;
- Possuem diversas mutações operon de histidina, as quais são alvos para mutação reversa;
- Detectam diversos agentes mutagênicos que causam deslocamento no quadro de leitura do DNA, os quais restauram o quadro de leitura correto para a síntese de histidina;
- **Mutação no gene *hisD3052***, constituído de 8 resíduos repetidos de –GC–, próximo ao local da mutação de deslocamento no quadro de leitura do **gene *hisD***; o qual codifica a enzima histidinol desidrogenase, específica da TA98;
- **Mutação no gene *hisG46***, está no quadro de leitura do **gene *hisG***; o qual codifica a primeira enzima para síntese de histidina, específica da TA100;
- **Mutação (*rfa*)**, que gera perda parcial da barreira lipopolissacarídica, aumentando a permeabilidade da parede celular bacteriana, facilitando a difusão de grandes moléculas para o interior da célula;
- **Mutação (*urvB*)**, que provoca dano no sistema de reparo por exsissão, resultando no aumento da sensibilidade na detecção de

diversos agentes mutagênicos. Fazendo também, com que a bactéria torne-se dependente de biotina para crescer;

- **Plasmídio pKM101**, o qual favorece a resistência a ampicilina, assim como, aumenta a mutagênese espontânea e química, por estímulo no sistema de reparo de DNA *error-prone* (Maron & Ames, 1983).
- **Plasmídio pBR322**, o qual aumenta a mutagênese espontânea e química para nitro compostos e aminas, devido codificar a síntese de O-acetiltransferases, específica da YG1024 (Marvin *et al*, 1994).

☒ **Manutenção e estoque das linhagens.**

As cepas de *S. typhimurium* estão armazenadas em freezer a -80°C , em frascos para congelamento com 0,9mL de cultura e 0,1mL de DMSO como agente crioprotetor, para que se mantenham inalteradas todas suas características genéticas.

Antes do congelamento todas as linhagens tem seus genótipos confirmados (auxotrofia para histidina, mutação *rfa*, plasmídeo pKM101, deleção *uvrB* e taxa de reversão espontânea (25–75 para a TA98).

☒ **Preparo dos Meios de cultura e Soluções.**

☞ **Meio Vogel Bonner E (VB).**

Dissolveu-se 0,25g de sulfato de magnésio, 2,5g de ácido cítrico, 12,5g de fosfato de potássio dibásico e 4,375g de fosfato de sódio e amônio em 16,75mL de água destilada a 45°C (quantidades suficientes para 25mL de solução VB). A solução foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C .

☞ **Glicose 40%.**

Preparou-se 50mL de uma solução de glicose 40%, que foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos a 121°C .

↪ Ágar Mínimo Glicosado (AMG).

Dissolveu-se 7,5g de ágar em 465mL de água destilada, em seguida esterilizou-se a solução em autoclave durante 15 minutos á 121°C.

Posteriormente adiciona-se 10mL de VB e 25mL de glicose 40%.

↪ Top ágar ou ágar de superfície.

Dissolveu-se 0,5g de cloreto de sódio e 0,6g de ágar em 100mL água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos á 121°C.

↪ Solução biotina/histidina 0,05mM (10mL/100mL de top ágar).

Dissolveu-se 0,00123g de biotina e 0,00096g de histidina em 10mL de água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos á 121°C.

↪ Caldo Nutriente Oxoid n.2.

Dissolveu-se 0,75g de meio Oxoid em 30mL de água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos á 121°C.

⊗ Controles positivos e negativos.

O controle negativo, é o solvente utilizado para dissolver a amostra, utilizando-se como volume padrão, o maior volume da amostra testada 100 µL, que também é a quantidade necessária para dissolver a concentração máxima utilizada do fármaco.

Os controles positivos são compostos mutagênicos específicos para cada cepa e condição do ensaio, sendo o 4-nitro-fenilenediamina (NPD) (20µg/placa) para as linhagens TA98 e YG1024 e a azida sódica (50µL/placa) para a linhagem TA100 em ensaios sem ativação metabólica. E para ensaios com ativação

metabólica utilizando a linhagem TA100, o controle positivo é o antramine (100µL/placa).

⊗ **Procedimento do ensaio sem o sistema de ativação metabólica (-S₉).**

Utilizou-se o método de incubação direta em placa.

↪ **1º dia.**

Prepara-se todas as soluções e os meios de cultura anteriormente descritos.

Em fluxo laminar, foi adicionado ao meio estéril (AMG) 10,0mL de solução VB e 25,0mL de solução de glicose 40% (previamente preparadas), homogeneizou-se, e distribuiu-se cerca de 25mL de AMG em cada placa.

O AMG distribuído nas placas foi deixado em repouso por 48 horas em estufa a 37°C para posterior utilização.

↪ **2º dia.**

Em fluxo laminar, as cepas de *S. typhimurium* (TA98, TA100 e YG1024) foram inoculadas separadamente com alça de platina, no caldo nutriente (um para cada linhagem) e mantidas a 37°C, sob agitação constante (160rpm) durante 14 horas, de modo a se obter uma densidade de 1 a 2x10⁹ bactérias/mL.

↪ **3º dia.**

Em fluxo laminar, a solução de biotina/histidina foi adicionada ao top ágar e homogeneizada, sendo distribuída em tubos de ensaios em alíquotas de 2,0mL.

A cada tubo assim composto foi adicionado 100µL (0,1mL) da cultura de bactérias e os volumes de 100 µL de água *mili-Q* (estéril) ou metanol (PA-estéril) como controles negativo, 100 µL de NPD ou 50 µL de azida sódica como controles positivos; doses fixas de solução de metronidazol dissolvido em água *mili-Q* (estéril) e dos derivados do metronidazol dissolvidos em metanol (PA). Em

seguida os tubos foram homogeneizados e vertidos em placas de Petri com o AMG.

Tais placas foram incubadas por 48 horas a 37°C.

Todas as concentrações testadas, controles positivos e negativos foram realizadas em triplicatas.

↪ 5º dia.

Após 48 horas, foi realizada a contagem das colônias revertentes utilizando-se o Sistema ProtoCOL Colony Counter Version 3.15.630 (1998-2001) SYNBIOSIS – LTD (*figura 22*).

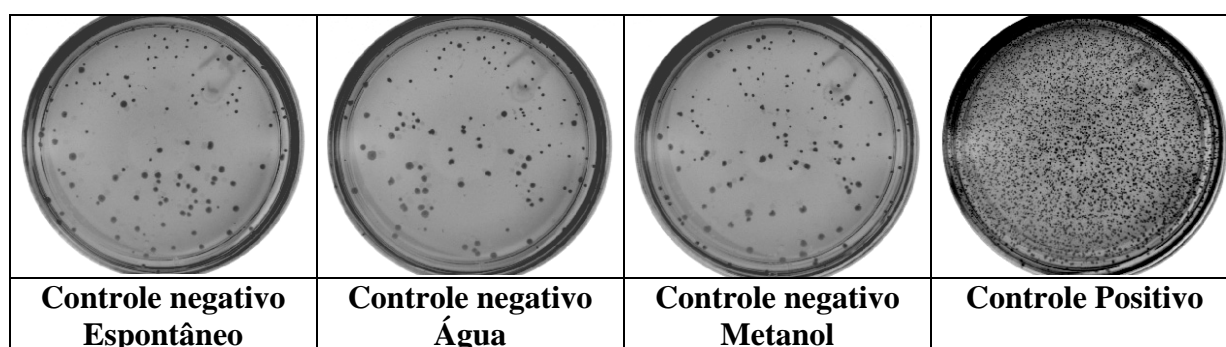


Figura 22. Imagem obtida do sistema ProtoCOL Colony Counter dos controles negativos, positivo e espontâneo.

⊗ **Avaliação e interpretação dos resultados.**

A partir dos resultados obtidos, foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose analisada, de cada composto.

A RM é dada pela seguinte equação:

$$RM = \frac{\text{média do nº de revertentes por placas teste (espontâneos + induzidos)}}{\text{média do nº de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos)}}$$

O crescimento espontâneo significa o número de revertentes que desenvolveram na placa, independente de serem ou não induzidos, onde considera-se como resposta positiva valores ≥ 2 .

⊗ **Procedimento do ensaio com o sistema de ativação metabólica (+S₉).**

O teste de mutagenicidade com sistema de ativação metabólica é realizado com fração microssomal S₉ (S₉ mix) preparada a partir do homogeneizado de fígado de ratos Sprague Dawley, previamente tratados com Arocloror 1254, adquiridos sob a forma liofilizada.

São preparados 50mL de S₉ mix utilizando-se as seguintes soluções:

Substância	Quant.	OBS.
Água Mili-Q estéril	19,75 mL	Viabilidade de $\pm 3,5h$ a partir do preparo (desde que mantida em gelo).
Tampão Fosfato	25 mL	
MgCl	500 μ L	
KCl	500 μ L	
G6P	250 μ L	
NADP	2 mL	
Fração S ₉	Dissolva em 2 mL de água Mili-Q estéril	

O procedimento para este ensaio é o mesmo do anterior, (sem ativação metabólica) diferindo-se apenas pela adição de 0,5mL (500 μ L) de solução S₉ mix em cada tubo de ensaio.

As placas foram então incubadas por 48 horas a 37°C. Transcorrido o tempo necessário foi efetuada a contagem das colônias revertentes. Todas as concentrações testadas, controles positivos e negativos foram realizadas em triplicatas.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACD/ChemSketch (v 4.04) – Advanced Chemistry Development inc. 1999.

ALBERT, A. **Selective toxicology. The phisico-chemical basis of therapy.** 7th ed. London: Chapman and Hall, 1981. p. 750.

ALCAMO, I. E. **Fundamentals of Microbiology.** 6th ed. Boston: Jones and Bartlett, 2001. p. 104, 165, 166, 744 – 748.

BARON, S. **Medical Microbiology.** 3rd ed. New York:: Churchill Livingstone, 1991. p. 176, 177, 179, 187, 188, 192 – 199, 301, 314, 991, 1000, 1001 e 1196.

BARRY, C. E; SLAYDEN R. A; SAMPSON, A E; LEE R. E. Use of Genomics and Combinatorial Chemistry in the Development of New Antimycobacterial Drugs. **Bioch. Pharmacol.** v. 59. p. 224 e 228, 2000.

BENDESKY, A; MENÉNDEZ, D; OSTROSKY-WEGMAN P. Is metronidazole carcinogenic ?. **Mutation Research.** 511. p. 133–144, 2002.

BERNSTEIN, L; KALDOR, J; McCANN, J; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis dad form *Salmonella* test. **Mutat. Res.** v. 97. p. 267 – 281, 1982.

BOWDEN, K; IZADI, J. Multifunctional derivates of metronidazole. **Il Farmaco.** 53. p. 58-61, 1998.

BUNDGAARD, H; LARSEN, C; ARNOLD, E. Prodrugs as drug delivery system XXVII. Chemical stability and bioavailability of a water-soluble prodrug of metronidazole for parenteral administration. **International Journal of Pharmaceutics.** 18. p. 79-87, 1984.

CHO, M.J; KURTZ, R.R; LEWIS, C; MACHKOVECH, HOUSER, D.J. Metronidazole Phosphate: A water soluble prodrug for parenteral solutions of metronidazole. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.71. n°4. p. 410 – 414, 1982.

CHO, M. J; HAYNES, L. C. Serum-catalyzed hydrolysis of metronidazole amino acid esters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 74. n°8. p. 883-885, 1985.

CHUNG, M.C; FERREIRA, E. I. O processo de Latenciação no Planejamento de Fármacos. **Química Nova**. v. 22. n°1. p.75-84, 1999.

Drug Information: Micromedex. Versão Eletrônica. Vol. 111.

DYER, J.R. **Applications of Absorption Spectroscopy of Organic Compounds**. New Jersen: Prentice Hall, 1965. p. 33 – 38.

GÜIDO, R. V. C; FERREIRA, E. I; NASSUTE, J. C; VARANDA, E. A; CHUNG, M.C. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofurural (nitrofurazona). **Rev. Ciência Farmacêutica**. v. 22. n°2. p. 319-333, 2001.

HARDMAN, J. G; LIMBIRD, L. E; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p.1018, 1053 e 1105-1107.

JENKS, P. J; EDWARDS, D. I. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **International Journal of antimicrobial Agents**. 19. p. 1-7, 2002.

JENSEN, M. M; WRIGHT, D. N; ROBINSON, R. A. **Microbiology for the Health Sciences**. 4th ed. New Jersen: Prentice Hall, 1997. p.135 e 136.

KOROLKOVAS, A. **Essentials of Medicinal Chemistry**. 2nd ed. New York: Wiley, 1988. 1204 p.

LAND, K. M; JOHNSON, P.J. Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacteria and protozoa. **Drug Resistance Updates**. n^o2. p. 289–294, 1999.

MAHFOUZ, N. M; FADL, T. A; DIAB; A K. Metronidazole twin ester prodrugs: synthesis, physicochemical properties, hydrolysis kinetics and anti-giardial activity. **Euro Journal of Medical Chemistry**. 33. p. 675 – 683, 1998.

MAHFOUZ, N. M; HASSAN, M. A. Synthesis, chemical and bioavailability in rabbits of metronidazole amino acid ester prodrugs with enhanced water solubility. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 53. p. 841-848, 2001.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry**. 3rd ed. New York: Wiley-Interscience, 1985. p. 486.

MARON, D. M; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**.v. 113. n^o 3-4. p. 173-215, 1983.

MARVIN, C. H; BRIAN, E. M; BRYANT, D. W. Determination and Genotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Isolated from *Dreissina polymorpha* (Zebra Mussels) Sampled from Hamilton Harbour. **J. Great Lakes Res.** v.20v n^o3. p. 523-530, 1994.

MENÉNDEZA, D; ROJAS, E; HERRERA, L. A; LÓPEZ, M.C. DNA breakage due to metronidazole treatment. **Mutation Research**. 478. p. 153–158, 2001.

MILLS, T; ROBERSON, C. **Instrumental Data for Drug Analysis**. 2nd ed. v. 2. New York: Elsevier, 1987. p. 1522 e 1523.

MURRAY, P. R; BARON, E.J; PFALLER, M.A; TENOVER, F.C; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington: ASM Press, 1999. p.1492 e 1656.

NESTER, E. W; ANDERSON, D.G; ROBERTS, C.E; PEARSALL, N.N; NESTER, M.T. **Microbiology: A Human Perspective**. 3rd ed. Boston: Mc Graw Hill, 2001. p. 70, 191, 208, 211 – 216, 498, 499 e 509 – 511.

PARFITT, K. **Martindale: The Complete Drug Reference**. 32nd ed. Massachusetts: Pharmaceutical Press, 1999. p. 586 e 587.

PAVIA, D. L; LAMPMAN, G. M; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry**. 2nd ed. Fort Worth: Saunders Golden Sunburst, 1996. 511 p.

PERMENTIER, D; VANSTEENKISTE, S; SCHACHT, E; VERMEERSCH; REMON, J. P. Syntesys of dipeptide ester of metronidazole and evaluation of their hidrolytic stability. **Bull. Soc. Chim. Belg.** v. 101. n°8. p. 701 – 707, 1992.

RANG, H. P; DALE, M. M; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 310, 576, 577, 589, 618 e 663.

ROITT, I; MIMS, C; PLAYFAIR, J; WAKELIN, D; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 413, 414 e 429.

ROSENKRANZ, H. S; SPECK, W. T; STAMBAUGH, J. E. Mutagenicity of metronidazole: Stucture-activity relationships. **Mutat. Res.** 38. p. 203-206, 1976.

SALLES, J. M. C; SALLES, M. J. C. **Antimicrobianos: Quando indicar, como Usar**. Belém: Editora da UFPA, 2000. P.

SILVA, P. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 871, 944, 946 e 947.

SILVERSTAIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC, 1994. 387 p.

SOLOMONS, T.W.G. **Química Orgânica**. 6 ed. n°2. Rio de Janeiro: LTC, 1996. p. 110 – 113 e 184 – 185.

SOLOMONS, T.W.G. **Fundamentals of Organic Chemistry**. 2nd ed. New York: Wiley, 1986. p. 677 – 681.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 199, 586-588.

The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th ed. MERCK & CO., INC. 2001. p. 364, 1097 e 1580.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: ARTMED, 2002. p. 235, 236, 548, 550, 551, 678 e 679.

TRABULSI, L. R; ALTHERTUM, F; GOMPertz, O. F; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 92, 97, 103 – 109, 266 e 291.

USP DI: Drug Information for the Health Care Professional. 19th ed. v.1. Massachusetts: Micromedex, 1999. p. 1996, 1997 e 2002.

VALENT, G.V, SATO, M.I. COELHO, M.C., COIMBRÃO, C.A., SANCHES, P.S., Monitoring São Paulo state river in Brasil for mutagenic activity using the Ame test. **Environmental Toxicology Water Quality**. 8. p. 371 – 381, 1993.

VAN DER WOUDE, E.J; THIJS, J.C; KUSTERS, J. G; VAN ZWET, A A; KLEIBEUKER, J.H; Mechanism and clinical significance of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **Scand J. Gastroenterol Suppl.** (234). p. 10-4, 2001.

VERMEERSCH, J; VANDOORNE, F; PERMENTIER, D; SCHACHT, E. Macromolecular Prodrugs of metronidazole. **Bulletin Soc. Chim. Belg.** v.94. n°8. p. 591 – 596, 1985.

VOGEL Arthur I. **Química Orgânica: Análise orgânica qualitativa.** 3 ed. v3. Rio de Janeiro: Editora da USP, sd. p. 957 e 958.

VOOGD, C. E; VAN DER STEL, J. J; JACOBS, JJJAA. The mutagenic action of nitroimidazoles: I. Metronidazole, nimorazole, dimetridazole & ronidazole. **Mutat. Res.** 26. p. 483-490, 1974.

VOOGD, C. E; VAN DER STEL, J. J; JACOBS, JJJAA. The mutagenic action of nitroimidazoles. IV. A comparison of the mutagenic action of several nitroimidazoles an some imidazoles. **Mutat. Res.** 66. p. 207-221, 1979.

VOOGD, C. E. On the mutagenicity of nitroimidazoles. **Mutat Res.** v.86. n°3. p. 243-77, 1981.

WATANABE, M; ISHIDATE, M. J; NOHEMI, T. Sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivates of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetil-transferase levels. **Mutat. Res.** v.234. p. 337-348, 1990.

ZHANG, G; WANG, Z. Mechanism Study of The Coagulant Impact on Mutagenic Activity in Water. **Wat. Res.** v.34. n°6. p. 1783, 2000.