

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA

**OBTENÇÃO DO PRÓ-FÁRMACO RECÍPROCO DE
ISONIAZIDA E METRONIDAZOL POTENCIALMENTE ATIVO
CONTRA *Mycobacterium tuberculosis***

SAMANTHA AKEMI KANAI

Araraquara-SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA

**OBTENÇÃO DO PRÓ-FÁRMACO RECÍPROCO DE ISONIAZIDA E
METRONIDAZOL POTENCIALMENTE ATIVO CONTRA
*Mycobacterium tuberculosis***

SAMANTHA AKEMI KANAI

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” para
obtenção do grau de Farmacêutico-
Bioquímico.

ORIENTADORA: Chung Man Chin

Araraquara-SP

2011

Agradecimentos

À Deus por permitir que eu desenvolvesse esse trabalho com saúde.

Aos meus pais, que além de investirem nos meus estudos, sempre me deram alicerce para o desenvolvimento dos meus planos.

À Prof. Dra. Chung Man Chin que me proporcionou o conhecimento na área de síntese orgânica e se mostrou muito disponível em me ajudar nos momentos que necessitei além de me conceder conselhos pessoais aos quais levarei para a toda a minha vida.

Ao Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos que se demonstrou em todos os momentos muito disponível e extremamente preocupado com o aprendizado. Simbologia de ética e profissionalismo me sinto honrada por ter sido sua aluna.

Aos meus amigos de São Paulo e Araraquara que me acompanharam nessa trajetória me fornecendo apoio pessoal.

Ao Eduardo Pudell por estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Sabrina e Kenji por estarem no meu caminho.

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ESPECTROS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO _____ 10

2. OBJETIVO _____ 19

3. JUSTIFICATIVA _____ 19

4. MATERIAIS E MÉTODOS _____ 21

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____ 28

6. CONCLUSÃO _____ 52

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____ 53

Lista de Figuras

Figura 1: Fármacos mais utilizados no tratamento de tuberculose (retirado de SOUZA E VASCONCELLOS, 2005).	15
Figura 2: principal mecanismo de ação da isoniazida. (Retirada de ANDRADE, 2008).....	16
Figura 3: Etapas de redução do Metronidazol (LA-SCALEA <i>et al.</i> , 1999).....	18
Figura 4: Representação do conceito de pró-fármaco (retirado de CHUNG <i>et al.</i> , 1999).....	20
Figura 5: Molécula de hidroxibenzotriazol (HOBt).....	34

Lista de Esquemas

Esquema 1: Mecanismo de infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
Esquema 2: Obtenção do hemissuccinato de metronidazol. Reação do metronidazol com anidrido succínico.....	22
Esquema 3: Obtenção do pró-fármaco 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)etil 4-(isonicotinamido)-4-oxobutanoato a partir do hemissuccinato de metronidazol com isoniazida.....	22
Esquema 4: Esquema da geral do funcionamento da placa de CCD (retirado de Nobelprize.org: The Nobel Prize in Chemistry 1952).....	28
Esquema 5: Mecanismo de síntese de amida promovido por DCC (retirado de SOLOMONS, FRYHLE 2009).....	32
Esquema 6: formação de amidas com o uso de HOBt (retirado de Scheehan, Hess 1955)	35

Lista de Tabelas

Tabela1: Fases móveis testadas na síntese do hemissuccinato de metronidazol.....	29
Tabela 2: avaliação dos resultados das análises das frações coletadas na coluna de cromatografia do método 1.....	33
Tabela 3: Interpretação do espectro de IV do anidrido succínico.....	36
Tabela 4: Interpretação do espectro de IV da isoniazida.....	38
Tabela 5: Interpretação do espectro de IV da metronidazol.....	39
Tabela 6: Interpretação do espectro de IV do hemissuccinato de metronidazol.....	41
Tabela 7: Interpretação do espectro de IV do precipitado do método 2.....	42
Tabela 8: interpretação do IV do composto final do método 2.....	45
Tabela 9: interpretação dos IV das frações II, III e IV do método 1.....	48
Tabela 10: valores de absorção no infravermelho para reagentes metronidazol, isoniazida, hemissuccinato de metronidazol e composto desejado.....	50

Lista de Espectros

Espectro 1: infravermelho do anidrido succínico.....	36
Espectro 2: infravermelho da isoniazida.....	37
Espectro 3: infravermelho do metronidazol.....	39
Espectro 4: infravermelho do hemissuccinato de metronidazol.....	40
Espectro 5: infravermelho do precipitado da síntese o método 2.....	42
Espectro 6: Infravermelho do composto final do método 2.....	44
Espectro 7: infravermelho da fração II do método 1.....	46
Espectro 8: infravermelho da fração III do método 1.....	46
Espectro 9: infravermelho da fração IV do método 1.....	47

Lista de Abreviaturas

HIV- vírus da imunodeficiência humana

TNF- fator de necrose tumoral

DMAP- 4-dimetilaminopiridina

HOBt- hidroxibenzotriazol

DIC- *N, N'*-diisopropil carbodiimida

DCC- *N, N'*-diciclohexil carbodiimida

DCE- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

TEA- trietilamina

CCD - cromatografia de camada delgada

CC - coluna de cromatografia

IV- infravermelho

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

DCU - *N,N'*-diciclohexilureia

Resumo

A tuberculose é uma doença que já atingiu milhares de pessoas no mundo e ainda hoje representa uma ameaça à saúde humana, principalmente a partir da descoberta do vírus HIV. Os fármacos disponíveis no mercado não têm suprimido as necessidades, pois exigem longos períodos de tratamento.

Este trabalho teve como objetivo o planejamento e a síntese de um novo composto potencialmente ativo para *Mycobacterium tuberculosis* na forma latente. O planejamento levou em consideração o princípio da latenciação para a obtenção de um pró-fármaco recíproco derivado de isoniazida e metronidazol.

O metronidazol, devido à sua ação em bactérias anaeróbicas poderia apresentar atividade nos bacilos que possivelmente sobrevivam durante o processo de necrose caseosa.

A obtenção do pró-fármaco foi realizada através da transformação funcional do metronidazol e posterior acoplamento com isoniazida. O trabalho descreve alguns procedimentos e dificuldades encontradas para obtenção do pró-fármaco. Os resultados sugerem a formação do produto, porém, análises de identificação são necessárias para a confirmação.

1- Introdução

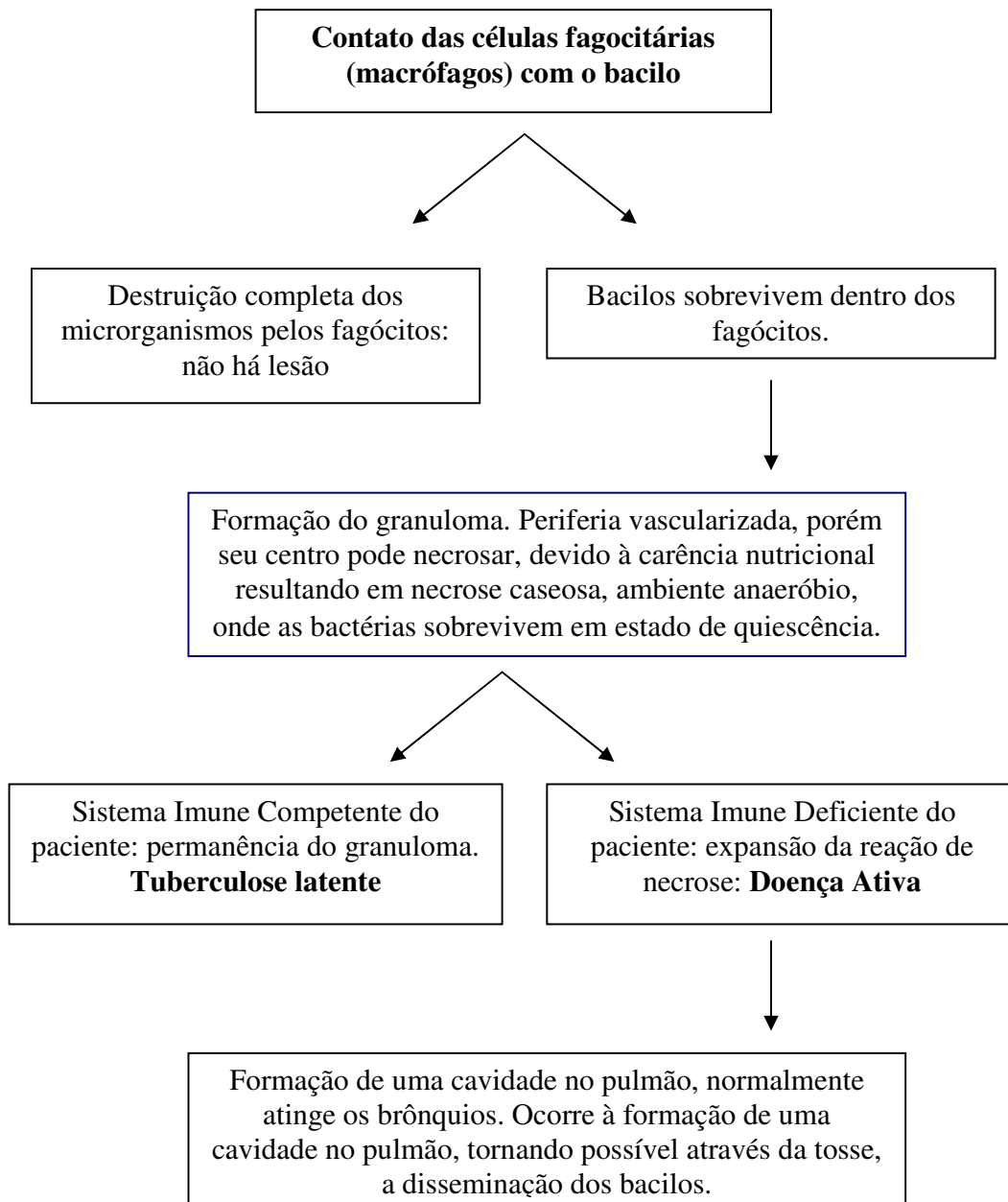
Isolada pelo cientista alemão Robert Kock, em 1882 (MUNCH 2003), a *Mycobacterium tuberculosis*, principal bactéria causadora da tuberculose, ainda hoje é considerada uma doença muito grave. Microrganismo que em sua estrutura encontra-se elevada quantidade de lipídeo (25%), aeróbio obrigatório, possui crescimento lento, bastonete fino, reto ou pode se apresentar levemente curvado, resistentes a descoloração ácido e álcool, adquirindo com a coloração Ziehl-Neelsen a cor rosa vivo.(Moutinho 2011)

Mais de dois milhões de pessoas morrem a cada ano vítima de tuberculose, 4.400 morrem por dia, e surgem aproximadamente oito milhões de novos casos por ano. As populações mais atingidas, sem dúvida, são as de países em desenvolvimento, representando 98% da mortalidade global pela doença e 95% de novos casos. A tuberculose é uma doença considerada negligenciada, isto é, que não há interesse econômico de investir no desenvolvimento de novos fármacos, seja por sua baixa prevalência ou por sua predominância ser em populações de países emergentes. (WHO, 2009)

O bacilo já infectou 1,3 bilhões de pessoas no mundo inteiro, e destes, de 16 a 20 milhões têm a doença ativa. A tuberculose é denominada latente quando doença não está ativa, caracterizada pela não manifestação dos sintomas. (WHO, 2009) Uma parcela muito grande de indivíduos encontra-se com a infecção latente, sendo que cerca de 10% desenvolverão a doença ativa ao longo da vida. (ROSEMBERG, 2001)

Em 2005 estimava-se 1,6 milhões de mortes pela doença, sendo que 195.000 eram de pessoas que viviam com HIV. (WHO, 2009). Na década de 80 houve a identificação e a disseminação do vírus da imunodeficiência adquirida, a partir de então a tuberculose aumentou sua incidência, até mesmo em países que já consideravam a doença sob controle. Em países emergentes, a tuberculose é a principal causa de morbidade e mortalidade em portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), pois estes têm maior probabilidade de desenvolver a progressão da tuberculose latente, infecção ou reinfecção precoce para a doença ativa (LANNON, 2008)

A infecção da tuberculose se dá por via inalatória na maioria dos casos, como demonstrado no esquema 1. Ao falar ou tossir, a pessoa infectada pode expelir bacilos podendo ser inalados por outra pessoa atingindo os pulmões, infectando-a. A evolução da infecção para a doença é dependente da carga bacilar inalada e do sistema imune do infectado. (TRABULSI, *et al* 2004, CAMPOS, 2006)



Esquema 1: Mecanismo de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*

O contato do bacilo com o organismo humano pode desencadear diferentes respostas do sistema imunológico, pois, essa resposta não é direcionada diretamente e especificamente ao *Mycobacterium tuberculosis*, e trata-se sim de um processo de

grande complexidade, variando com as circunstâncias não muito bem esclarecidas e envolvendo elementos múltiplos. (ROSEMBERG, 2001)

Quanto melhor as condições do sistema imune do paciente infectado, mais rapidamente as células monocitárias irão chegar ao local de infecção, onde no primeiro contato com o organismo, alvéolos dos pulmões com os bacilos, são recrutados em primeira instância os leucócitos, que irão fagocitar os bacilos, podendo não matá-los, levando assim, para diversas partes do corpo. (ROSEMBERG, 2001)

As células monocitárias são capazes de fagocitar e deter os bacilos fagocitados ou não pelos leucócitos (ROSEMBERG, 2001). São liberadas citocinas, fator de necrose tumoral (TNF) na região, que atuam nas células epiteliais, estas por sua vez, fundem-se com as células monocitárias, formando as células de Langhans, gigantócitos multinucleados, formando, assim, o granuloma, em situações em que a imunidade do indivíduo prevalece. (SEISCENTO, *et al* 2006)

O granuloma é reflexo do mecanismo de defesa do organismo infectado, por ser uma forma de conter a proliferação, já que, o ambiente gerado é anaeróbio e inóspito nos fagolisossomos, impróprio para a proliferação das bactérias. Os bacilos liberam toxinas de natureza lipoproteíca, sendo que, as células podem estar mais ou menos sensíveis a essas toxinas, de acordo com o fator de hipersensibilidade. (ROSEMBERG, 2001)

A calcificação do granuloma depende da alta imunidade e baixa hipersensibilidade. Em situações em que essa relação se inverte, há liquefação do granuloma, com a liberação dos bacilos que estavam em seu interior. Dessa forma, a

tuberculose latente se forma a tuberculose doença, já que agora, o bacilo está na sua fase ativa. (ROSEMBERG, 2001)

Estudos demonstraram que a proteína alfa cristalina de 16 kDa forma uma camada em torno do bacilo reduzindo ao máximo o seu metabolismo, além tornando capaz de sobreviver à baixa pressão de oxigênio, o que lhe permite sobreviver na condição de latência. (ROSEMBERG, 2001)

O tratamento da tuberculose baseia-se em fármacos que podem promover a cura do paciente como a isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol (Figura 1), entretanto, a adesão ao tratamento é dificultada principalmente pelo tempo extenso, seis a nove meses, e politerapia levam os pacientes, principalmente os de países em desenvolvimento, a desistirem do tratamento. (LAMICHHANE & BISHAI, 2007).

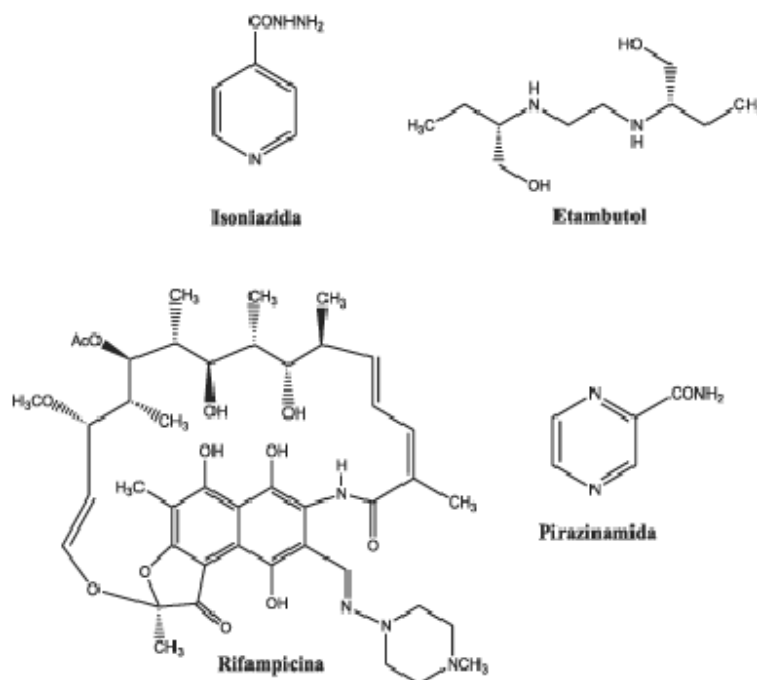


Figura 1: Fármacos mais utilizados no tratamento de tuberculose, retirado de SOUZA E VASCONCELLOS, 2005.

Dentre os fármacos demonstrados, vale destacar a isoniazida, um dos principais quimioterápicos de primeira linha utilizada para o tratamento da tuberculose. (ROSSETI *et al* 2002)

O seu mecanismo de ação ainda não está muito claro, mas acredita-se que o ácido isonicotínico atua de maneira inibitória na síntese da parede bacteriana. (ROSSETI *et al* 2002) Trata-se de um pró-fármaco, conceito que será explicado posteriormente, que *in vivo* é ativado pela enzima KatG, catalase-peroxidase micobacteriana, que por uma série de mecanismo inativa a enzima InhA. Tal inativação acarreta na inibição biossintética dos ácidos micólicos, que são os principais

constituintes da parede bacteriana, mecanismo ilustrado pela figura 2 (ANDRADE, 2008). Assim a bactéria tem sua síntese deficiente tornando-a vulnerável aos radicais de oxigênio e componentes do meio. (ROSSETI *et al* 2002).

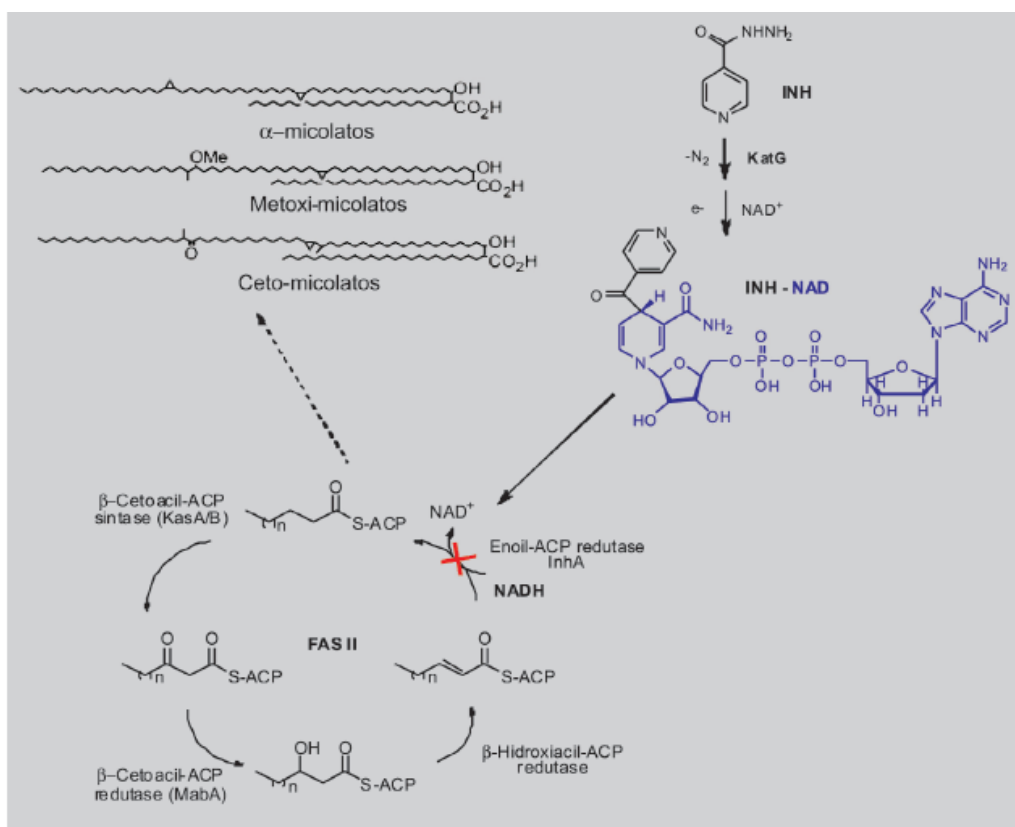


Figura 2: principal mecanismo de ação da isoniazida. (Fonte: ANDRADE, 2008)

A isoniazida é ativada pela KatG para formar o aduto INH-NAD. Logo em seguida a enzima InhA é inibida pelo aduto, como consequência a biossíntese dos ácidos micólicos (FAZ II) também é inibida. Os ácidos micólicos são os constituintes predominantes da parede da micobactéria, assim temos a morte celular. Na figura estão

representados três tipos de ácidos micólicos: α -micolados, metóxi-micolados e ceto-micolados.

A isoniazida não é utilizada apenas no tratamento da tuberculose doença ativa, também é utilizada em casos latentes. Nessas condições de dormência dos bacilos adota-se monoterapia de isoniazida num período de seis a nove meses. (GEIJOA, *et al* 2007). Entretanto, pacientes com tuberculose latente tendem a abandonar o tratamento com maior facilidade, pois, o extenso período de tratamento juntamente com as reações adversas causadas pelo fármaco leva o paciente assintomático a não seguir a terapia.

Considerando esses fatos, fica claro a necessidade de se aplicar esforços para se descobrir novos fármacos e também novos alvos terapêuticos com o intuito de diminuir o tempo de tratamento. (SOUZA, 2006; VOHRA, *et al* 2006). Dentre estas novas tendências, podemos destacar derivados de metronidazol, que tem demonstrado uma boa atividade em condições de anaerobiose, que se trata justamente do mesmo ambiente encontrado no centro do granuloma. (MELO, NETO e AFIUNE, 1999)

Sintetizado no final da década de 50, o metronidazol é o fármaco mais importante do grupo 5-nitroimidazóis. Lançado no mercado para tratamento de protozooses, também possui ação sobre populações anaeróbias. Acredita-se que o metronidazol tenha que ocorre em quatro etapas: penetração celular por difusão passiva; aumento da penetração em condições de anaerobiose; ativação por redução com liberação de radical tóxica nitro e nitroso livre e formação de derivados nitrosos e hidroxicobalamina, mas seu mecanismo não está bem elucidado. (MELO, NETO e AFIUNE, 1999) Tem sua aprovação desde a década de 60, apresenta vantagens para se utilizar no tratamento da tuberculose por ter a capacidade de atuar em populações

em condições de anaerobiose e possui seus efeitos adversos bem tolerados pela maioria dos pacientes, características físico-químicas conhecidas, além de baixo custo e fácil acesso.

A atividade do metronidazol parece restringir-se a centro de granulomas, pois o meio se encontra em anaerobiose, nesses meios há um aumento da penetração do fármaco (MELO, NETO e AFIUNE, 1999). Além do que o metronidazol apresenta fácil absorção por via oral, sendo que, seus valores apresentados são semelhantes às aplicações intravenosas, tendo boa penetrabilidade tissular e cerebral, levando a morte das populações bacterianas rapidamente (FREEMAN, KUTMAN e LAMP, 2007).

A toxicidade do fármaco sobre populações deficientes em oxigênio tem como alvo de sua ação biológica a molécula de DNA. A redução do grupo nitro define o mecanismo de ação do fármaco, essa redução é dependente do pH, sendo que este necessita ser ácido. Se o meio for aprótico, a redução ocorre em maiores etapas como representado na figura abaixo. (LA SCALEA, SERRANO e GUTZ, 1999)

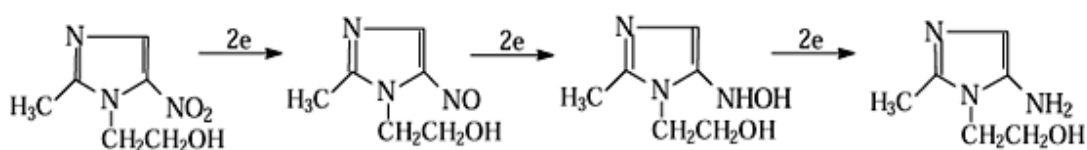


Figura 3: Etapas de redução do Metronidazol (LA-SCALEA, SERRANO E GUTZ 1999)

A formação de espécies ativas intermediárias define a atividade biológica do composto, resultando em danos ao DNA. O grupo nitro (NO₂) pode ser a espécie responsável pelo dano. (LA SCALEA, SERRANO e GUTZ, 1999)

Com intuito de termos mais alternativas para o tratamento da tuberculose latente, visando diminuir o tempo de tratamento, o planejamento e a síntese de novas moléculas se fazem necessários. (CHUNG et al 1999).

2- Objetivo

Obtenção de pró-fármaco recíproco, derivado de metronidazol e isoniazida com potencial atividade em bacilos latentes de *Mycobacterium tuberculosis*.

3- Justificativa

O planejamento estrutural proposto nesse trabalho foi baseado no princípio da latenciação, que por definição é processo em que o fármaco que não tem atividade *in vitro*, porém, após administrado sofre ação química ou enzimática tornando-se ativo *in vivo*, liberando a porção ativa no local de ação ou próximo dele. Sendo que uma das formas latentes obtidas nesse processo denomina-se pró-fármaco, como ilustrado na figura 4. (BUNDGAARD, 1991)

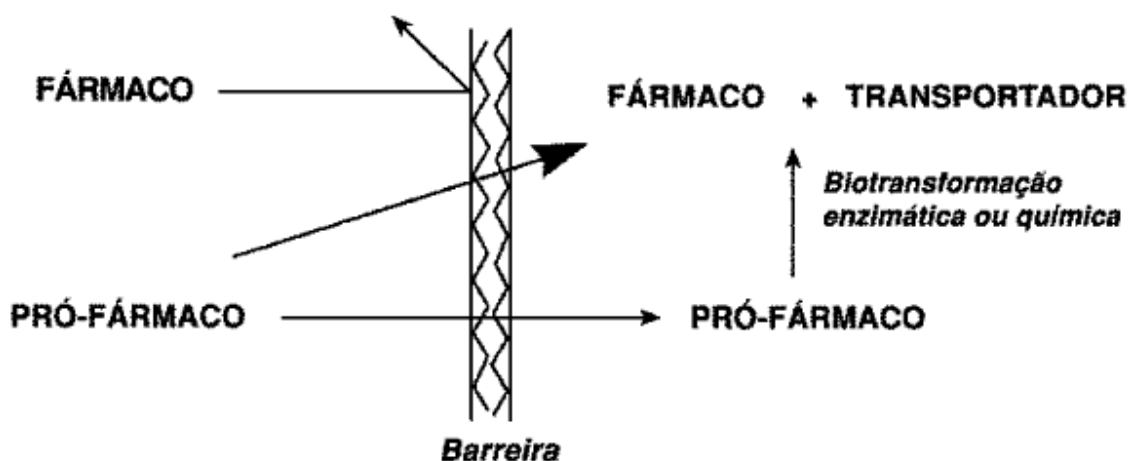


Figura 4: Representação do conceito de pró-fármaco (fonte: CHUNG et al, 1999)

O pró-fármaco é a forma inativa ou menos ativa de um fármaco *in vitro*, que quando *in vivo* passa ter atividade, pois, sofre o processo de biotransformação. (CHUNG et al 1999). Esse processo pode acarretar em um melhor efeito terapêutico do medicamento, atuação no sítio alvo específico e diminuir os efeitos tóxicos. (CHUNG et al 1999). O transportador normalmente não apresenta atividade, mas se apresentar atividade é denominado pró-fármaco recíproco. (CHUNG et al 1999).

Com o objetivo de aumentar a penetrabilidade no interior dos granulomas e diminuir o tempo de tratamento de tuberculose latente, podemos unir fármacos de classes químicas diversas que atuam em alvos distintos. Nesse sentido a isoniazida, será ligado ao metronidazol.

Desta forma esperando-se obter um pró-fármaco recíproco que será ativado no granuloma, fornecendo no local de infecção duas moléculas ativas e que atuarão de

forma sinérgica no tratamento da tuberculose latente ou mesmo no tratamento da tuberculose ativa, bloqueando a possibilidade da permanência do bacilo vivo latente.

4- Materiais e Métodos

4.1- Materiais

1. Metronidazol
2. anidrido succínico
3. acetonitrila
4. 4-Dimetilaminopiridina (DMAP)
5. sulfato de sódio
6. metanol
7. éter
8. acetato de etila
9. hidroxibenzo triazol (HOBt)
10. isoniazida
11. diclorometano
12. bicarbonato de sódio
13. ácido cítrico
14. água
15. trietilamina
16. N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC)
17. N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)

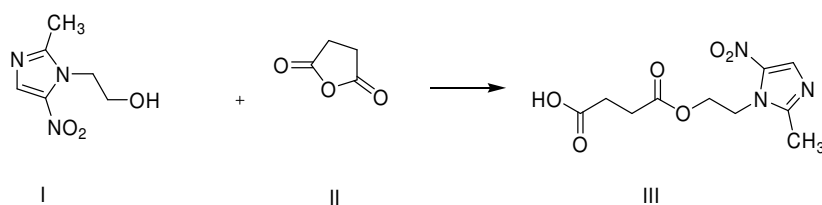
18. ácido acético

19. hexano

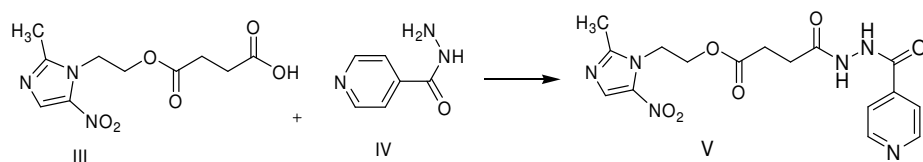
20. etanol

4.2- Métodos Sintéticos

Os métodos sintéticos se baseiam na obtenção do hemissuccinato de metronidazol com posterior acoplamento a molécula de isoniazida.

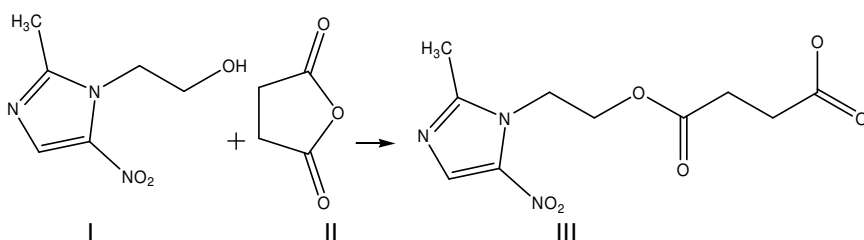


Esquema 2- Obtenção do hemissuccinato de metronidazol (III). Reação de metronidazol (I) com anidrido succínico (II)



Esquema 3: Obtenção do pró-fármaco: 2-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethyl 4-(isonicotinamido)-4-oxobutanoate (V) a partir da reação do hemissuccinato de metronidazol (III) com isoniazida (IV).

4.2.1) Obtenção de hemissuccinato de metronidazol baseado em (VERMEERSCH, et al 1985)



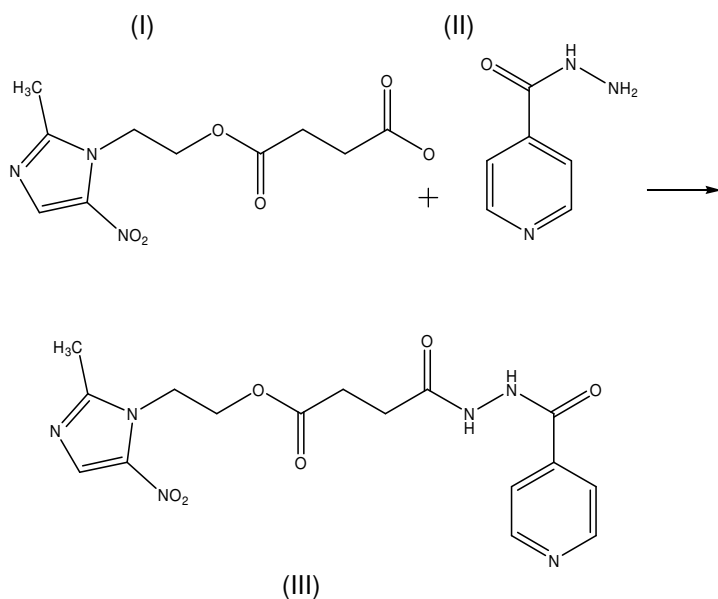
Em 90 mL de acetonitrila adicionou-se 1 grama de metronidazol (I) (5,85mmol), 585mg de anidrido succínico (II) (5,85mmol) e 35mg de 4-dimetilaminopiridina (0,3mmol), catalisador nucleofílico que tem ação em algumas reações como esterificação de anidrido, como observado nesta síntese. A síntese foi mantida sob agitação durante 48 horas. Toda a síntese e os demais procedimentos que envolveram a utilização do metronidazol foram realizados sob a proteção da luz, devido à sensibilidade do metronidazol.

Após as 48 horas, em que houve a formação de um óleo esverdeado, levou-se para o rotaevaporador com o intuito de remover o solvente, acetonitrila. Este por sua vez, foi removido lentamente devido a suas características. Após a remoção da acetonitrila, 25 mL de água quente foram adicionados para fazer a purificação. O óleo solubiliza e foi levado para a geladeira, onde repousa até a precipitação completa, normalmente levava cerca de 12 horas.

Após esse tempo, retirou-se da geladeira e já com a formação de precipitado branco, hemissuccinato de metronidazol (III), o composto foi filtrado a vácuo e o

precipitado foi deixado à temperatura ambiente até a secagem completa. O rendimento da síntese foi de 95%.

4.2.2) Obtenção do pró-fármaco



4.2.2.1) Método 1:

Adicionou-se 1,1 equivalente de N, N'-diciclohexil carbodiimida (DCC) a 300 mg de hemissuccinato de metronidazol(I) em 30 mL de diclorometano. A reação foi mantida em banho de gelo durante 30 minutos para ativar carbonila do hemissuccinato de metronidazol. Após os 30 minutos adicionou-se 1 equivalente de isoniazida(II). A reação foi acompanhada com placa de CCD, até observar as manchas formadas e reveladas na luz ultravioleta. O acerto do pH para aproximadamente 9 foi muito importante para garantir um acoplamento efetivo, então, logo após retirar o banho de gelo, algumas gotas de trietilamina foram adicionadas para aumentar o pH que era de 5,5, valor inferior ao pka da isoniazida, que é aproximadamente 8.

A síntese permaneceu no agitador magnético por 2h50 e após esse tempo com a observação da formação de compostos diferentes realizou-se uma filtração simples, com o intuito de remover o diciclohexilurea (DCU), intermediário que se forma a partir do DCC. O filtrado foi deixado na capela para evaporação do solvente (diclorometano) e para a precipitação. Após esse procedimento, foi possível observar a formação de uma pasta amarela escura. Foi feita coluna de cromatografia como método de purificação seguido de espectroscopia de infravermelho.

4.2.2.2) Método 2:

O método 2 difere-se do método 1 na utilização de uma agente acoplante, ao invés de DCC utilizou-se N, N'-diisopropil carbodiimida (DIC), além disso, nessa reação é possível observar a utilização de hydroxibenzotriazole (HOBt).

Em uma balão foram colocados 30 mL de diclorometano, 1 mmol de hemissuccinato de metronidazol, 1,2 mmol de DIC, 1,2 mmol de HOBt e 1,2 mmol de isoniazida. A ordem deve ser seguida para que se obtenha o produto desejado. A reação foi mantida em banho de gelo sob agitação.

Após 1 hora, retirou-se a síntese do banho de gelo e deixou-se 24 horas sob agitação, o pH foi ajustado para 9 com algumas gotas de trietilamina (TEA). Passado 24 horas de reação, observamos a formação de um precipitado branco, este foi filtrado e realizou-se um infravermelho.

O produto foi isolado por extração. Adicionou-se 30 mL de acetato de etila na reação para que houvesse a separação da fase orgânica da fase aquosa, em seguida,

adicionou-se 30 mL de ácido cítrico 0,2 molar para remover a isoniazida que não reagiu, já que em meio ácido, o grupo amino permanece na forma ionizada

Forma molecular: -NH₂

Forma ionizada: -NH₃⁺

Assim a isoniazida ionizada permaneceu na fase aquosa e foi removida, isolando-se a parte orgânica para outras lavagens. O processo de lavagem com ácido cítrico foi repetido até não aparecer vestígios da isoniazida na placa de CCD e todas as lavagens foram feitas com agitação vigorosa para otimizar o processo.

Após a verificação da ausência de isoniazida que não reagiu, o objetivo foi remover o hemissuccinato de metronidazol residual. Observou-se que em meio básico o composto apresentou-se na forma ionizada podendo ser removido dessa forma.

Forma molecular: -COOH

Forma ionizada: -COO⁻

Se o composto que não reagiu se apresenta na forma ionizada, este vai para a fase aquosa, podendo assim ser removido, processo semelhante ao da remoção da isoniazida. Para que o meio ficasse básico, utilizou-se solução de bicarbonato de sódio 0,2 molar. A lavagem foi feita até não se observar mais vestígios do hemissuccinato de metronidazol em placa de CCD e os mesmos cuidados em relação ao procedimento, também foi adotado nessa parte da extração.

Na fase orgânica estava o produto desejado, sulfato de sódio foi adicionado, um agente secante, para remover moléculas de água residual. Para retirar o agente secante realizou-se filtração simples, não se esquecendo de ao final da filtração, passar

acetato de etila para remover possíveis resíduos do pró-fármaco do filtro. A fase orgânica foi rotaevaporada e o resíduo foi analisado por infravermelho.

4. 3) Métodos Analíticos

4.3.1) Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram utilizadas placas de sílica gel G-60, com 0,25 mm de espessura, e placas Alugram Nano-Sil G/UV 254 da Merck para o acompanhamento das reações com o seguinte sistema s (v/v/v): $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (15:85).

4.3.2) Cromatografia em coluna (CC)

Foram realizados experimentos com as amostras. Para isto, foi necessária sílica gel de Coluna de Cromatografia com tenuidade de 60-200 μm .

4.3.3) Determinação da faixa de fusão

Foram efetuadas análises da faixa de fusão das matérias primas e dos compostos obtidos de reação em aparelho de ponto de fusão da marca STUART SIENTIFIC, do modelo SMP3.

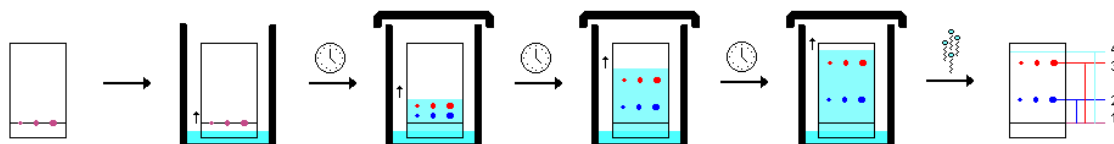
4.3.4) Espectrometria no infravermelho (IV)

Os compostos foram analisados em equipamento de espectrofotômetro de IV da marca SHIMADZU, do modelo FTIR-8300.

5) Resultados e discussão:

Tendo como objetivo acoplar a molécula de metronidazol com a de isoniazida, observou-se que a ligação direta não era favorecida devido a baixa reatividade, além do que, para alternar os grupos funcionais do pró-fármaco recíproco, é necessário ter uma agente espaçante, desta forma teríamos um pró-fármaco que *in vivo*, se quebre e não tenha sua ação prejudicada.

Na síntese do hemissuccinato de metronidazol foi importante não deixar ultrapassar o tempo de reação já que isso pode acarretar na degradação do produto, e também não retirar antes do tempo observado, pois, provavelmente não haveria a formação de todo produto. Houve acompanhamento da síntese com placa de cromatografia de camada delgada (CCD).



Esquema 4: Esquema geral do funcionamento da placa de CCD retirado de Nobelprize.org: The Nobel Prize in Chemistry 1952

Encontrar a fase móvel mais adequada se baseou no conceito da cromatografia consiste na diferença de interação com as fases existentes, fase móvel e a fase estacionária. Essas interações consistem em forças intermoleculares (iônica, polar dentre outras) e específicos efeitos de afinidade e solubilidade. Normalmente, quando não se tem maiores informações sobre a síntese, é necessário testar várias fases

móveis até encontrar a mais adequada, e para obter esse objetivo, há diversas técnicas de seletividade de solventes que auxiliam na escolha.

Uma das possibilidades é a utilização do triângulo de seletividade de Snyder, que leva em consideração um conjunto de três parâmetros chamados de solvatocrômicos foi concebido para descrever a acidez (α), basicidade (β) e dipolaridade (π^*), onde α descreve a habilidade do solvente para formar ligações de hidrogênio com o soluto; β mede a tendência do solvente em doar um par de elétrons (ou aceitar um próton) em ligações de hidrogênio com o soluto; π^* é um termo que mede a dipolaridade/polarizabilidade do solvente. (SNYDER, 1993) No presente trabalho elegeu-se o melhor solvente baseado em testes que levaram em consideração os conceitos citados, como segue na Tabela 1.

Tabela1: Fases móveis testadas na síntese do hemissuccinato de metronidazol:

Fase móvel	Eficiência do Processo
1) 85 clorofórmio:10 metanol:05 ácido acético	Há eluição, porém, não há uma distinção nítida entre o padrão (MDZ) e o produto.
2) 100% acetato de etila	Há pouca eluição e formação de manchas muito próximas.
3) 95 clorofórmio: 5 metanol: 03 ácido acético	Teste com fase mais apolar para fazer a comparação com a primeira fase. Observa-se o mesmo problema de nitidez.
4) 50 hexano:50 acetato	Os compostos ficam retidos na base da placa, não há uma boa eluição
5) 100% etanol	Houve separação nítida dos compostos
6) 50 éter: 50 acetato de etila	Houve a separação nítida dos compostos

A melhor fase móvel encontrada foi a de 100% etanol, em que houve a separação dos compostos durante a eluição, possibilitando uma visualização clara.

Nas primeiras vezes que essa síntese foi feita, não houve problemas, as sínteses prosseguiram de acordo com o protocolo. Observou-se a formação de óleo esverdeado que solubilizava em água e depois de aproximadamente 12 horas havia formação abundante de precipitado branco, comparando em placa de CCD com padrão e confirmado por HPLC.

Mas em outras sínteses não se observava a formação do produto, fato este confirmado tanto por placas de CCD, como por a não formação de um óleo esverdeado e sim uma pasta branca solúvel em água, que ao repousar, apresentava pouca formação de precipitado e sua coloração era amarela.

Primeiramente levantou-se a possibilidade de degradação do metronidazol pelo material há algum tempo no almoxarifado, e como se trata de um composto que necessita de cuidados específicos, como proteção contra a luz, foi o primeiro item a ser analisado. Foi possível verificar que sua faixa de fusão é de 160°C-162°C, sendo que o preconizado é de 159°C-163°C(Merck, 1996), logo, não há relação com a degradação do metronidazol.

Já como uma segunda hipótese analisou-se o anidrido succínico que tem sua faixa de fusão preconizado em 116°C- 119°C (Merck, 1996). O primeiro anidrido analisado foi o que estava em uso, que apresentou faixa de fusão de 96°C-120°C, o que nos levou a concluir que por não estar na faixa preconizada, poderia ser esse o motivo da não formação do produto. Já outro anidrido sublimado apresentou faixa de

fusão de 116°C- 118,7°C, logo, utilizou este para a próxima síntese, porém, continuou-se observando as mesmas características de não formação do produto.

Em uma terceira hipótese, acompanhou-se a temperatura do rotaevaporador, já que este estava apresentando problemas de aquecimento excessivo, então, media-se a temperatura com termômetro e quando se alcançava a temperatura de 50°C, desligava-se. Vale ressaltar que a temperatura para o rotaevaporador deve ser inferior já que estamos trabalhando com o processo a vácuo. Este procedimento não evitou a formação da pasta branca.

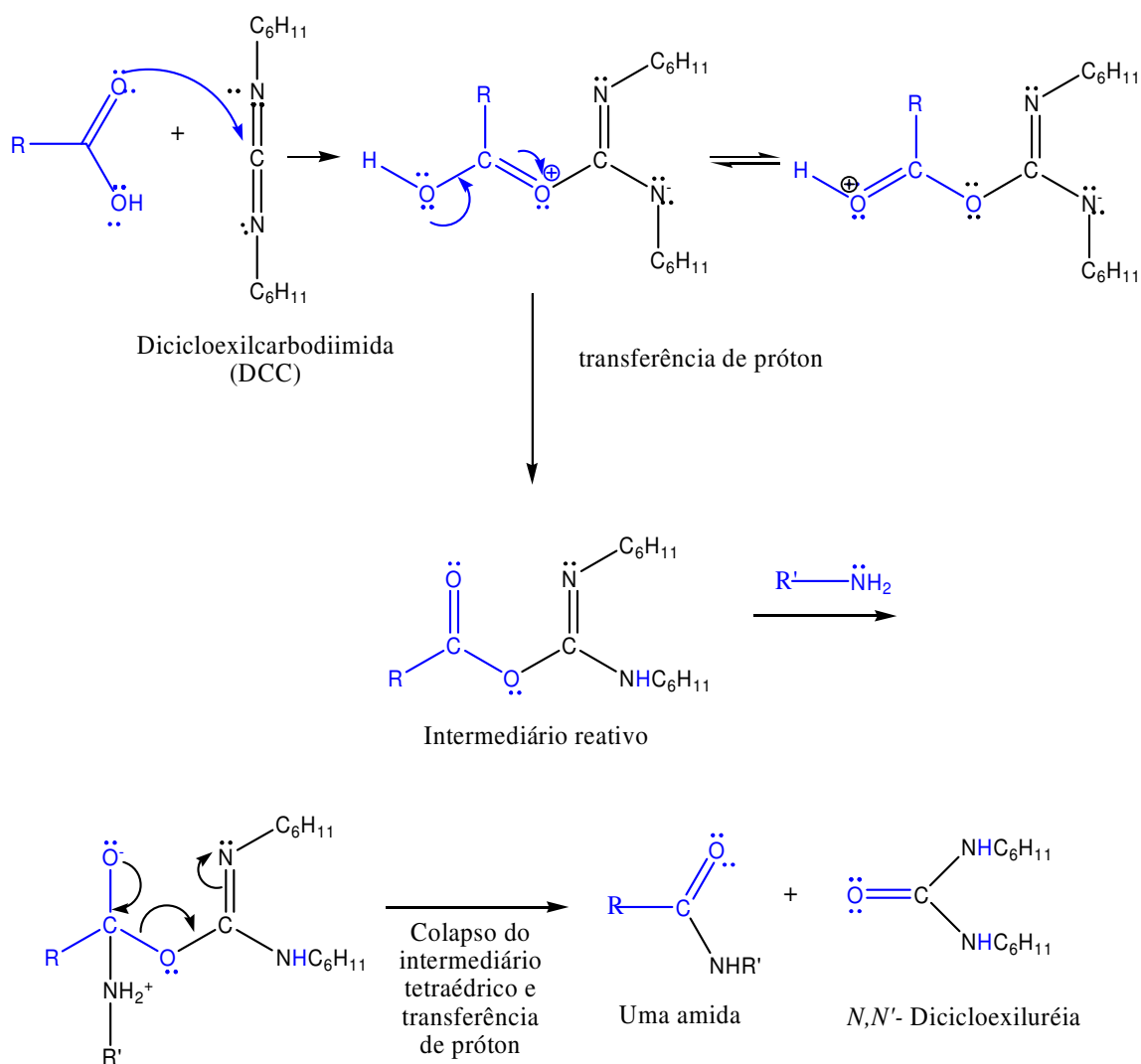
Como último recurso, analisou-se a umidade da acetonitrila, logo, foi feita uma destilação simples e seguiu-se com uma nova síntese. Nesta, houve a formação de óleo esverdeado, precipitação depois do acréscimo de água e repouso na geladeira. A placa de CCD apresentou características semelhantes ao padrão. Assim, obteve-se um o produto.

Como a molécula de hemissuccinato de metronidazol possui grupamento de ácido carboxílico, teve-se a possibilidade da escolha de um dos mecanismos para a síntese de amidas, que consistem em:

1. Amidas a partir de cloretos de acila.
2. Amidas a partir de anidridos carboxílicos.
3. Amidas a partir de ésteres.
4. Amidas a partir de ácidos carboxílicos.

Para obtenção de amidas a partir de ácido carboxílico é necessária a utilização de carbodiimidas, pois, o íon carboxilato possui baixa reatividade frente adição nucleofílica-eliminação. As carbodiimidas, que são capazes de ativar o carbono do

ácido carboxílico como demonstrado com o mecanismo da síntese de amida promovida por DCC (esquema 5):



Esquema 5: Mecanismo de síntese de amida promovido por DCC. Retirado de SOLOMONS,. FRYHLE, 2009.

Dentre as carbodiimidas que podem ser utilizadas DCC, DCI e DCE. O DCC (diciclohexilcarbodiimida) é uma das carbodiimidas mais utilizadas, pois, trata-se da primeira carbodiimida a ser descoberta, que tem como característica ser um sólido

ceroso que possui alto rendimento em síntese de amidas e ésteres, além de apresentar baixo custo. Logo, está foi a carbodiimida escolhida para realizar a síntese do método

Observavam-se diversas manchas na placa de CCD, o que nos levava a concluir que havia uma mistura de componentes além de haver impurezas. Com intuito de purificar, foi feita uma coluna de cromatografia. Uma dificuldade foi encontrar a fase móvel, já que utilizar uma fase móvel com 100% de etanol não é algo interessante. Foram feitos diversos testes e a fase móvel que apresentou o melhor desempenho foi de: 50% éter/50% acetato de etila.

Foram coletados 107 tubos na coluna de cromatografia. A tabela 2 apresenta os resultados:

Tabela 2: avaliação dos resultados das análises das frações coletadas na coluna de cromatografia do método 1

Tubo 1 ao 16- fração I	Volume morto da coluna
Tubo 17 a 33- fração II	mancha na porção superior, na mesma região que a isoniazida apresenta uma mancha.
Tubo 35 ao 56- fração III	mancha na porção mais inferior, entre a mancha de MDZ e H.
Tubo 66 ao 107- fração IV	mancha próxima a base da placa de CCD,

Com os componentes separados, foram realizada espectroscopia de infravermelho para se ter indicativos da formação do produto.

No método 2, após 1 hora quando retirou-se a síntese do banho de gelo o pH foi ajustado para 9 com trietilamina pois, o pka da isoniazida é 8, e a síntese inicialmente

apresentou pH 5,5. Se a isoniazida está em um pH abaixo do seu ideal, esta se apresentará na forma protonada, e desta forma, não há elétrons disponíveis para ocorrer o ataque da amina na carbonila, inviabilizando o acoplamento.

Observou-se que alguns inconvenientes na utilização do DCC, como a formação do intermediário, como por exemplo N,N'-diciclohexilureia (DCU), que é removido por filtração, porém, traços dos intermediários permanece e são de difícil remoção. (TANG, *et al.* 1994)

Com propriedades muito semelhantes ao DCC, o DIC (diisopropilcarbodiimida) apresenta menos inconvenientes, pois, o DIC é líquido facilitando o manuseio, forma intermediários solúveis em fase orgânica, o que facilita sua remoção. Por isso, na síntese do método 2 utilizamos o DCI. (ANGELL, 1994)

A fim de facilitar o processo de formação de amida, fez-se o uso de hidroxibenzotriazol (HOBt), que tem a capacidade de diminuir o processo de racemização e aumenta o rendimento na síntese de peptídeos.

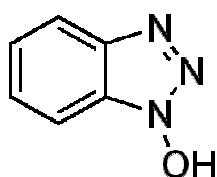
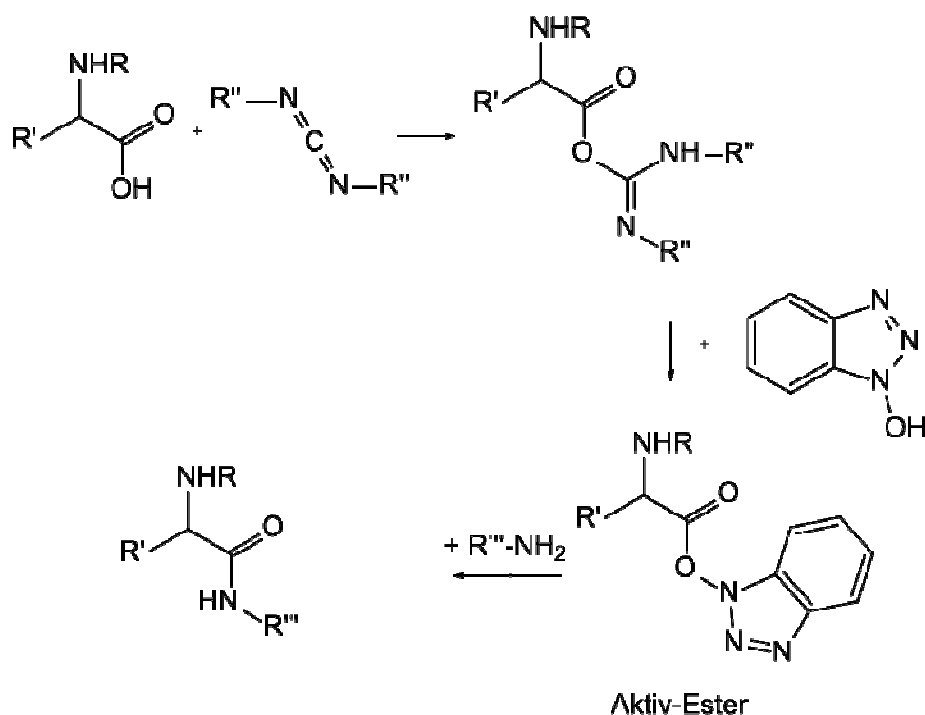


Figura 5: Molécula de HOBt

HOBt ativado tem a capacidade de reagir com grupo acila, como na síntese proposta o ácido carboxílico do hemissuccinato de metronidazol e DIC formam um grupo acila, o HOBt é capaz de ativá-lo, formando ésteres ativados, favorecendo a formação da amida, desejável para concluir o acoplamento. Desse modo fica claro o motivo de se seguir a ordem dos componentes adicionados durante a síntese.

Mecanismo HOBt:

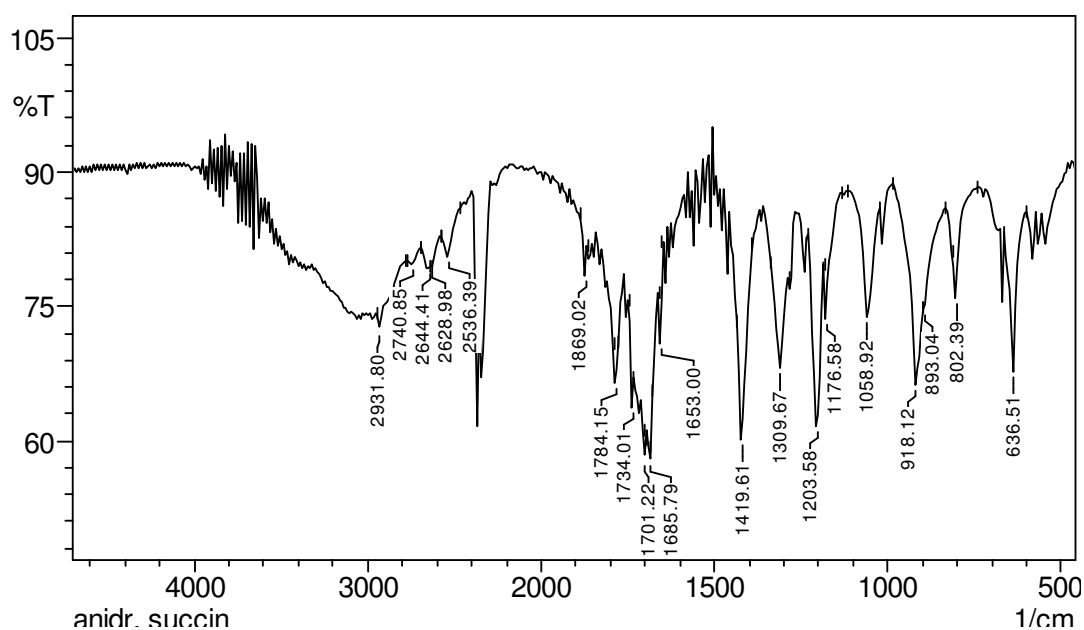
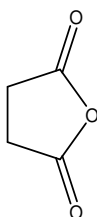
Esquema 6: formação de amidas com o uso de HOBt retirado de Scheehan, Hess 1955 .

Desta forma a junção da utilização do DIC e do HOBt constituíram os elementos que possibilitam o acoplamento de hemissuccinato de metronidazol com a isoniazida.

Na purificação alguns cuidados foram tomados, como deixar a mistura repousar um tempo antes de fazer a separação, e quando o funil de separação foi aberto, tinha-se cuidado, pois, o solvente expande e pode causar acidentes. Uma dificuldade dessa fase é que para fazer placa de CCD com a fase aquosa, que não é de rápida evaporação.

Os resultados das análises das matérias-primas utilizadas e dos compostos sintetizados seguem listados abaixo:

Espectro 1: infravermelho do anidrido succínico

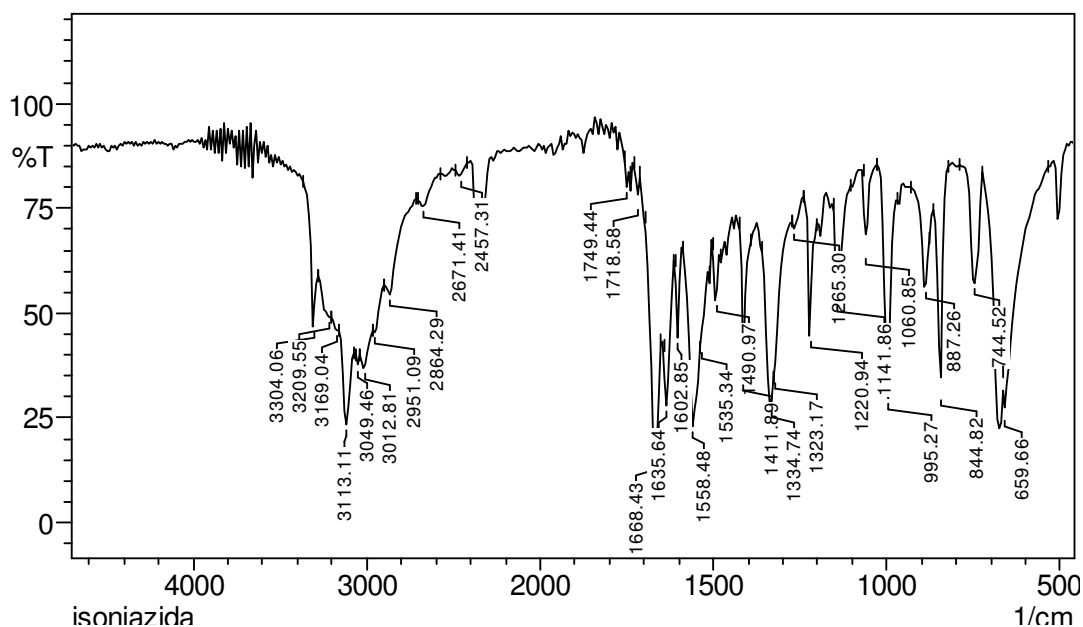
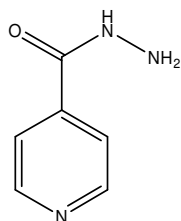


Grupamentos Funcionais	Banda (cm-1) teórica	Banda (cm-1) observada
	1790-1700/1230-1180	1701/1203

Tabela 3: Interpretação do espectro de IV do anidrido succínico

Com o estudo do infravermelho do anidrido succínico foi possível observar que o composto trabalhado como reagente da síntese provavelmente possui os grupamentos desejáveis. Esta é uma análise de grande utilidade, já que, por ser um anidrido, há a possibilidade de degradação deste, além disso, saber o perfil da espectroscopia de infravermelho dos reagentes nos ajuda a concluir sobre o produto que desejamos obter.

Espectro 2: infravermelho da isoniazida



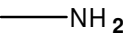
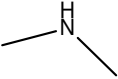
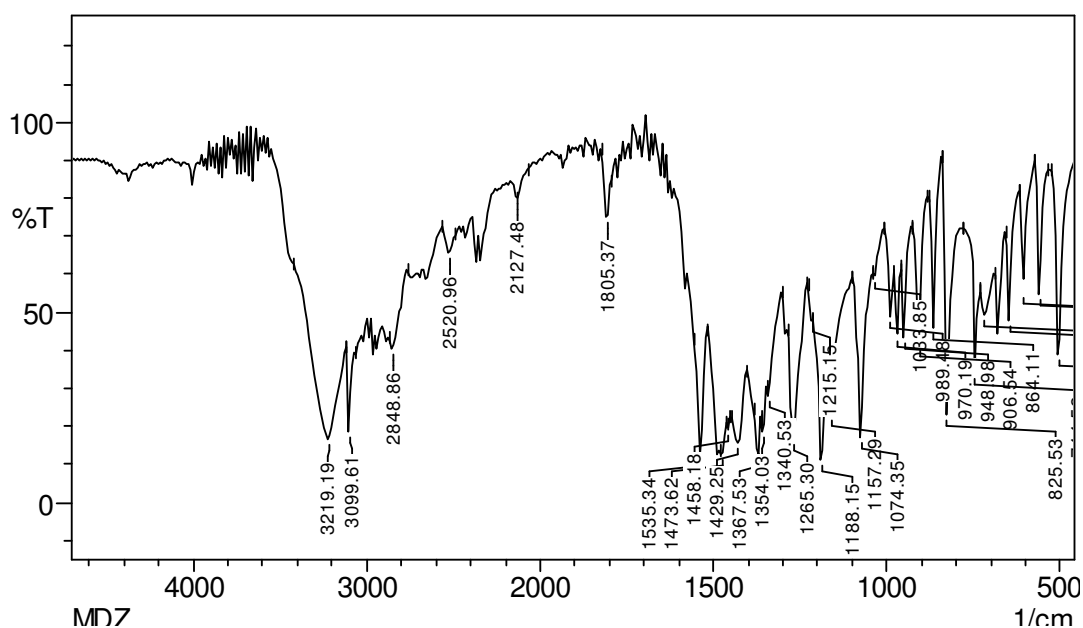
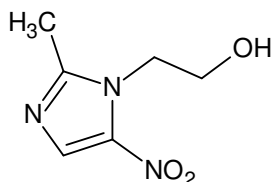
Grupamentos Funcionais	Banda (cm-1) teórica	Banda (cm-1) observada
	3500-3400 (mf)/1610-1590/1210-1100/820-780	3304,08/1668,43/1141,85/744,52
	3500-3300/ 1700-1655	3304/1668
	1600-1450	1558

Tabela 4: Interpretação do espectro de IV da isoniazida

Para identificação das aminas primárias é necessária a observação de vários picos. (SILVERSTEIN, 2005) É possível observar a formação de um forte pico na região da amida secundária, o que nos leva a crer, que provavelmente se tem esse grupamento na molécula, e por fim a amina aromática que se apresenta dentro do esperado.

O intuito de fazer o infravermelho da isoniazida é semelhante ao do anidrido succínico, isto é, observar a degradação do produto e a possibilidade de traçar um comparativo com o produto final.

Espectro 3: infravermelho do metronidazol



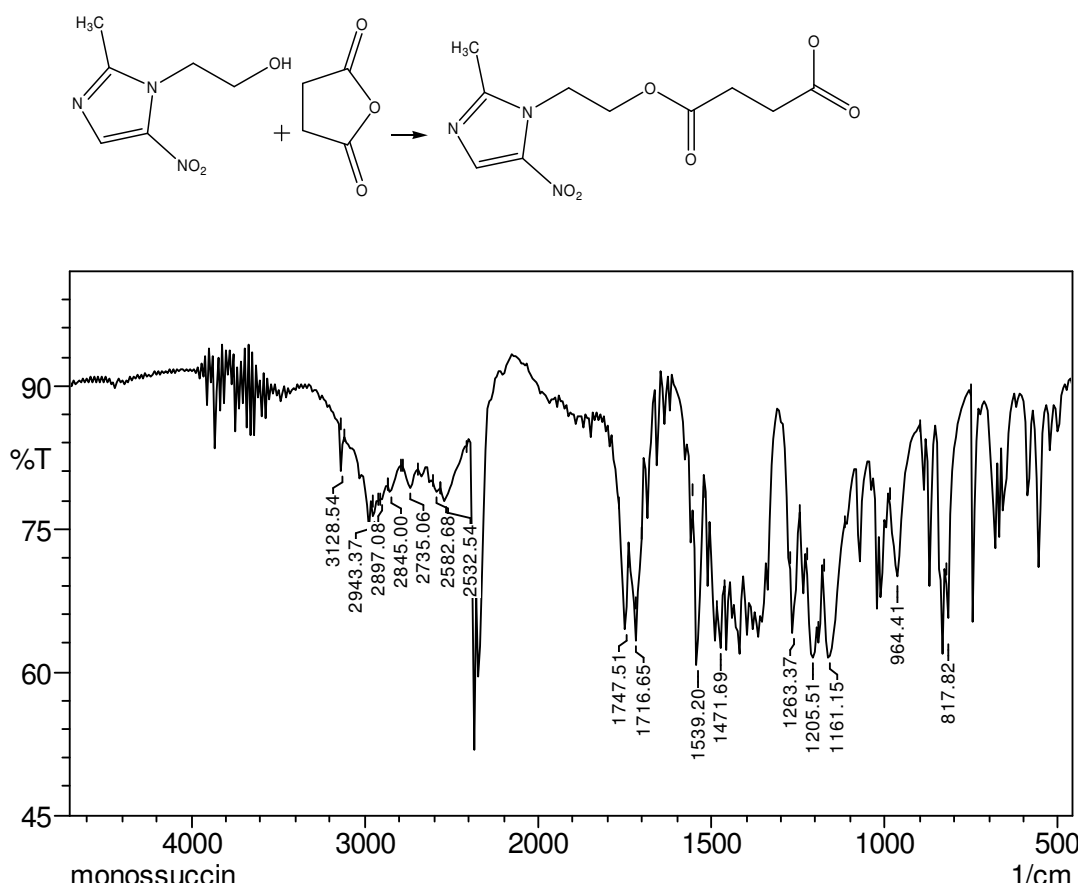
Grupamentos Funcionais	Banda (cm-1) teórica	Banda (cm-1) observada
NO ₂	1400-1300/1600-1500	1367/1535
	1250-1180	1265
—OH	3700-3450	3219

Tabela 5: Interpretação do espectro de IV do metronidazol

Com a espectroscopia de infravermelho do metronidazol é possível observar que os grupamentos mais significantes da molécula estão presentes. Como um teste adicional, foi feito a faixa de fusão do metronidazol, como já citado, o que indicou que

mesmo o composto sendo sensível a luz, este estava em perfeito estado para utilização.

Espectro 4: infravermelho do hemissuccinato de metronidazol



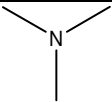
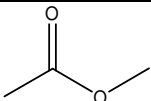
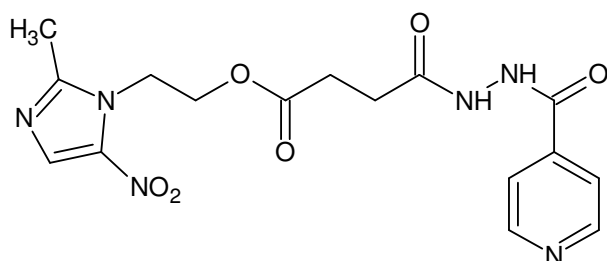
Grupamentos Funcionais	Banda (cm-1) teórica	Banda (cm-1) observada
NO ₂	1400-1300/1600-1500	1539
	1250-1180	1263
	1190- 1210/1700-1750	1205/1747
Ácido carboxílico	Banda larga em 3200	2582-3128

Tabela 6: Interpretação do espectro de IV do hemissuccinato de metronidazol

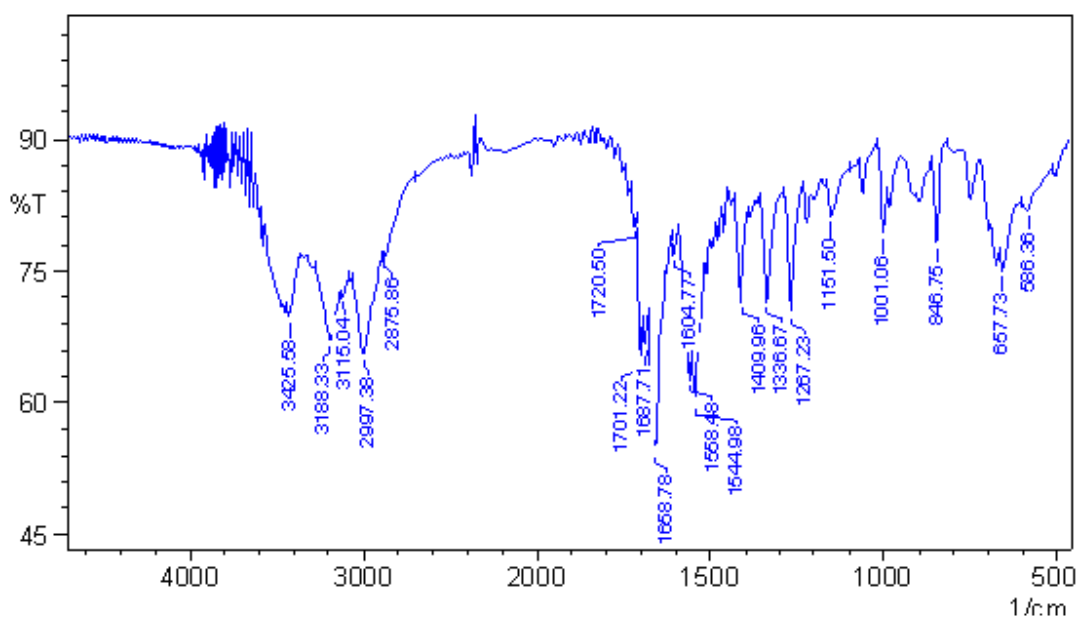
A espectroscopia no infravermelho do hemissuccinato de metronidazol, sugere que houve a formação do composto, já que observamos os grupamentos mais significantes encontrados na molécula de metronidazol, como o grupo nitro e a amina terciária, assim como é possível observar o grupo mais significativo presente na molécula de anidrido succínico, que seria o éster e o ácido carboxílico, todos estes grupamentos numa mesma molécula. Fato este que foi comprovado por HPLC.

Pró-fármaco desejado



Durante a síntese, como já citado anteriormente, observou-se a formação de um precipitado branco, que poderia ser o pró-fármaco que se precipitou. Segue abaixo o seu infravermelho.

Espectro 5: infravermelho do precipitado da síntese o método 2



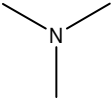
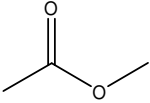
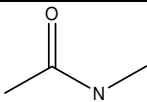
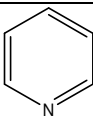
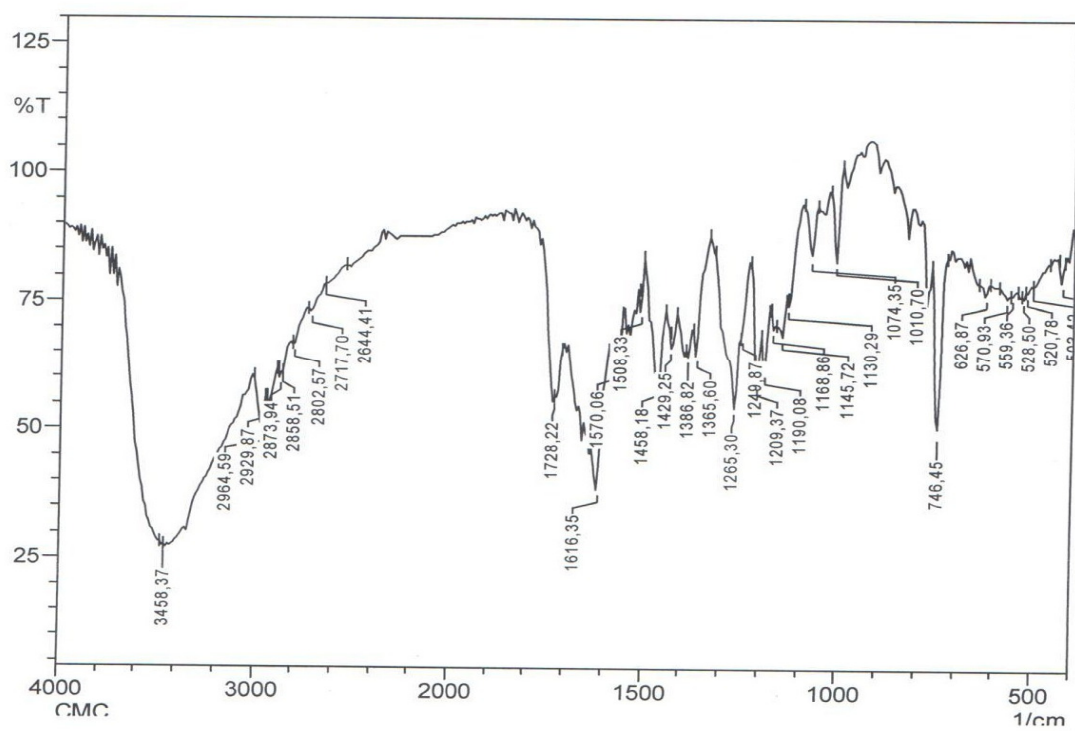
Grupamentos Funcionais	Banda (cm-1) teórica	Banda (cm-1) observada
NO ₂	1400-1300/1600-1500	1336/1558
	1250-1180	1267
	1700-1750	2875-3425
	1700-1655/ 3300-3500	1687/3425
	1600-1450	1558
Ácido carboxílico	Banda larga em 3200	2875-3425

Tabela 7: Interpretação do espectro de IV do precipitado do método 2

Apesar dos os picos de vários grupamentos terem valores muito próximos, este infravermelho indica que provavelmente esse composto não é o pró-fármaco procurado, já que apresenta banda larga na região de 3200 cm⁻¹, o que pode significar que nesse precipitado, há as duas moléculas, de hemissuccinato de metronidazol e isoniazida, mas que não estão acoplados.

Após a rotaevaporação e purificação do composto final, obtivemos um pó amarelo, seu infravermelho segue abaixo:

Espectro 6: Infravermelho do composto final do método 2



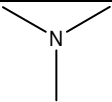
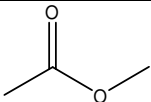
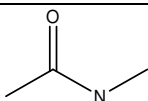
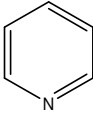
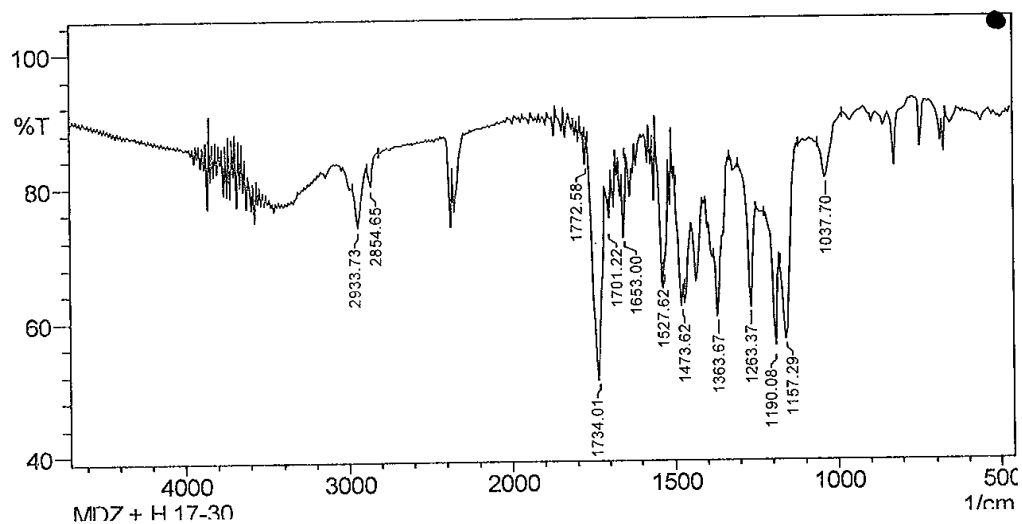
Grupamentos Funcionais	Banda (cm-1) teórica	Banda (cm-1) observada
NO ₂	1400-1300/1600-1500	1386/1570
	1250-1180	1265
	1190- 1210/1700-1750	1209/1728
	1700-1655/ 3300-3500	1616/3458
	1600-1450	1616
Ácido carboxílico	Banda larga em 3200	-----

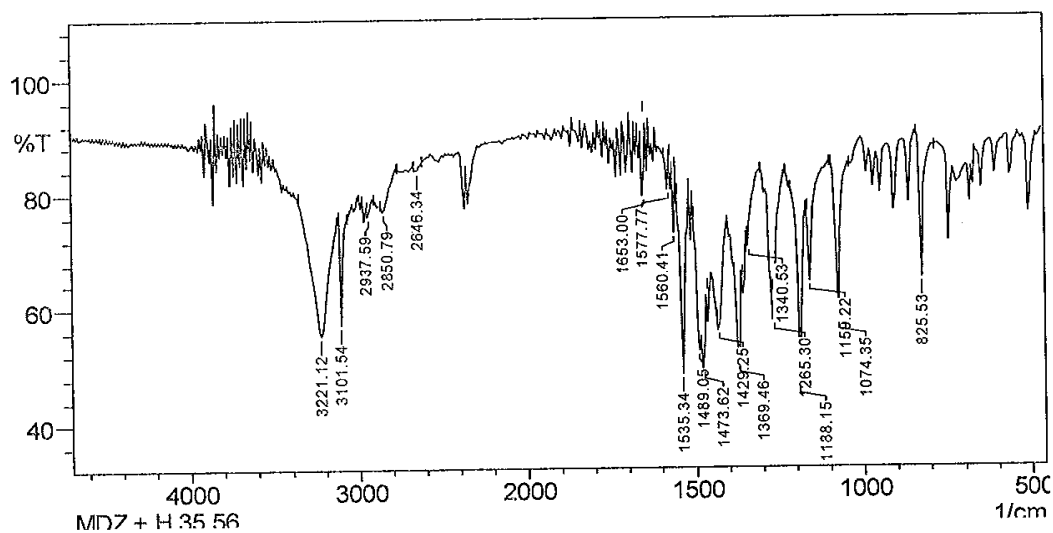
Tabela 8: interpretação do IV do composto final do método 2.

Já nesse infravermelho é possível observar os picos de todos os grupamentos de maior relevância na molécula do pró-fármaco. O que pode nos indicar que talvez a síntese tenha dado um resultado efetivo.

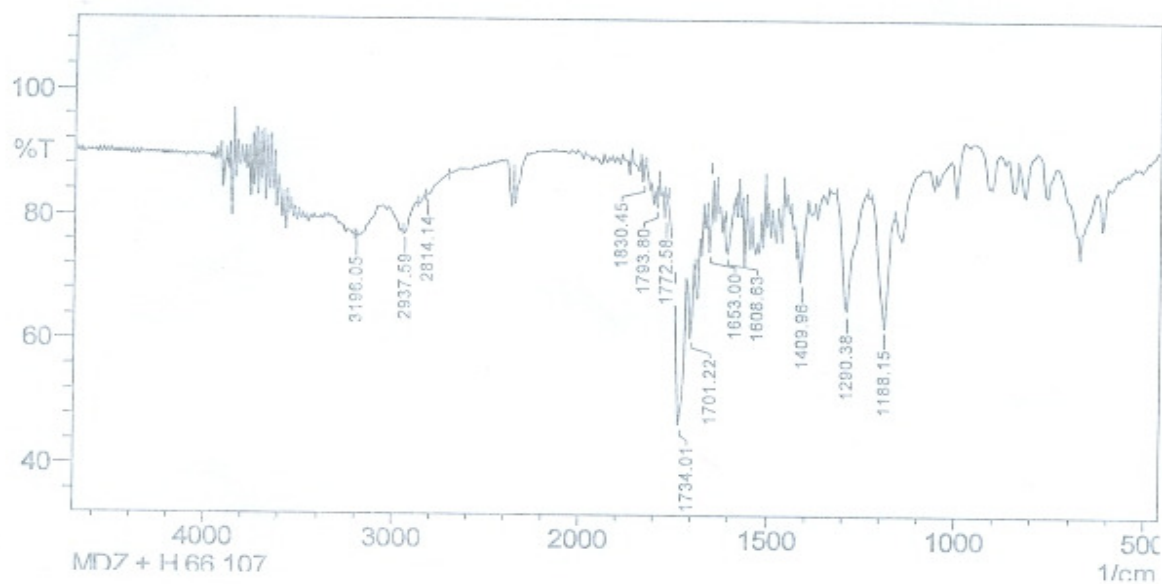
Espectro 7: infravermelho da fração II (tubo 17 ao 33) do método 1



Espectro 8: infravermelho da fração III (tubo 35 ao 66) do método 1



Espectro 9: infravermelho da fração IV (tubo 66 ao 107) do método 1



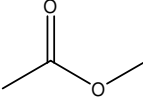
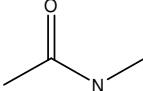
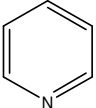
Grupamentos Funcionais	Banda (cm-1) teórica	Bandas observadas(cm-1)		
		Fração II Tubo 17-30	Fração III Tubo 35-66	Fração IV Tubo 66-107
NO ₂	1400-1300/1600-1500	1363/1527	1429/1535	1290/1608
	1250-1180	1263	1265	1188
	1190- 1210/1700-1750	1190/1734	1188	1734
	1700-1655/ 3300-3500	1701	1653/3221	1701
	1600-1450	-----	1489	-----
Ácido carboxílico	Banda larga em 3200	-----	-----	-----

Tabela 9: interpretação dos IV das frações II, III e IV do método 1.

Na observação dos infravermelhos das frações coletadas na coluna de cromatografia alguns pontos são importantes de observar. Para haver a formação do pró-fármaco, na análise do infravermelho devem aparecer os picos referentes à formação da amida secundária que se forma entre o hemissuccinato de metronidazol e isoniazida, assim como deve desaparecer os picos referentes ao ácido carboxílico da extremidade da molécula de hemissuccinato de metronidazol e da amina primária da isoniazida que se liga ao hemissuccinato de metronidazol. Além disso, todos os

grupamentos funcionais mais relevantes da molécula de hemissuccinato de metronidazol e isoniazida devem aparecer, como por exemplo: grupo nitro, éster, amina aromática, dentre outros listados na tabela.

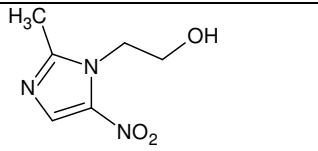
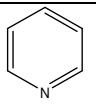
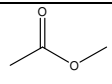
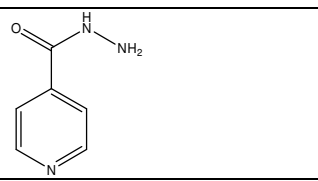
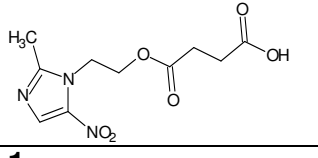
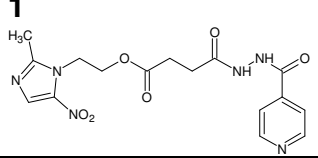
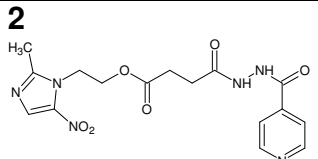
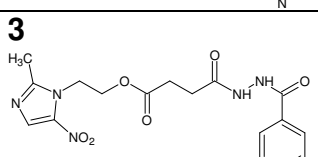
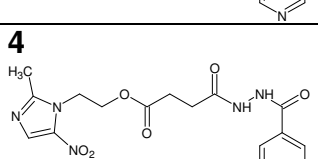
A fim de termos uma análise comparativa de todos os compostos obtidos e dos reagentes, montamos a seguinte tabela:

Tabela 10: valores de absorção no infravermelho para reagentes metronidazol, isoniazida, hemissuccinato de metronidazol e composto desejado. Na tabela, os compostos representados são:

1. composto da fração 2 da coluna de CCD do método 1
2. composto da fração 3 da coluna de CCD do método 1
3. composto da fração 4 da coluna de CCD do método 1
4. composto do método 2

Compostos

Grupamentos funcionais (cm-1)

	Ácido carboxílico	NO ₂	—NH ₂				—OH	
	-----	1367 1535	-----	1265	-----	-----	3219	-----
	-----	-----	3304 1668 1141 744	-----	1558	-----	-----	1668 3304
	2582- 3128	1539	-----	1263	-----	1205 1747	-----	-----
1 	-----	1363/15 27	-----	1263	-----	1190/17 34	-----	1701
2 	-----	1429/15 35	-----	1265	1489	1188	-----	1653/32 21
3 	-----	1409/16 08	-----	1188	-----	1734	-----	1701
4 	-----	1386 1570	-----	1265	1616	1209 1728	-----	1616 3458

A tabela comparativa (tabela 10) nos fornece informações sobre a síntese. Pode-se observar que o metronidazol possui grupamentos como grupo nitro, amina terciária e álcool primário. O composto derivado de metronidazol (hemissuccinato de metronidazol) mantém o grupamento nitro e amina terciária, mas não apresenta o álcool primário e sim um éster, exatamente como o esperado, indicando que houve a formação do produto.

É possível observar que na fração II (tubo 17-30) e fração IV (tubo 66-117) do método 1 não se observa o sinal da amina aromática que seria da isoniazida, assim como, observa-se a formação de apenas um pico relativo ao grupamento da amida secundária ao invés dos dois picos que se deveria observar.

Já a fração III, além de apresentar todos os grupos funcionais relevantes, possui dois picos relativos à formação da amida secundária sendo que seu espectro está com os picos bem definidos na região desse mesmo grupamento, que também nos fornece grandes informações sobre o acoplamento.

É possível observar também que no composto final do método 2 há os grupos desejáveis como o grupo nitro, amina terciária e éster que demonstram que pode haver hemissuccinato de metronidazol. A amina aromática nos dá indício que provavelmente tem-se isoniazida, adicionalmente observar-se que houve formação de amida secundária e não há sinais de amina primária, o que nos levou a crer que provavelmente houve a ligação entre o hemissuccinato de metronidazol e a isoniazida.

6) Conclusão

Foram realizadas duas sínteses com intuito de obtenção do pró-fármaco recíproco de metronidazol e isoniazida, sendo que, o que diferencia uma síntese da outra é o agente acoplante, em um método utilizamos DCC e no outro utilizamos DIC, além de HOBt. Há de se observar que a o segundo método teve um melhor rendimento que o primeiro.

Foi observado na primeira síntese, de acordo com os infravermelhos analisados, que uma das frações recolhidas (fração III) apresentou os grupamentos desejados, porém, este infravermelho não possui os grupamentos nítidos, necessitando de outras análises para se concluir sobre este composto. Nas demais frações coletadas não se podem observar os grupamentos de interesse.

Já no método 2, analisando o infravermelho é possível ver os grupamentos desejados, presentes de maneira bem nítida, podendo ser o pró-fármaco desejado.

Porém, tanto no método 1 como no método 2, são necessárias maiores análises, já que, para identificação de um produto de uma síntese orgânica, são necessárias várias análises para se obter uma conclusão. Logo, acredita-se que as metodologias 1 e 2 podem ter sido efetivas, sendo que, devido a nitidez dos picos observados no infravermelho, provavelmente, o método 2 seria mais efetivo que o método 1.

7) Referências Bibliográficas:

ANGELLI, Y Os estudos comparativos do acoplamento de N-metilado, aminoácidos estericamente impedidos durante a fase sólida da síntese de peptídeos, 1994. Tetrahedron Lett. 35:5981

ANDRADE C.H.; PASQUALOTO K.F.M.; FERREIRA E.I.; Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: inibidores da InhA, enoil-ACP redutase do M. tuberculosis. Rev. Bras. Cienc. Farm., São Paulo, 2008, v. 44, n. 2.

BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design. *Drugs Fut.*, 1991, v.16: 443-458.

CAMPOS, H.S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. RJ, Pulmão, 2006 v.15. n.1:29-35

CHAPMAN AND HILL; THE MERCK index, Londres, 1996, 12th ed.

CHUNG, M. C; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no desenvolvimento de fármacos. *Química Nova*, 1999, v.22, n.1: 75-84

CHUNG, M.C; SILVA A.T.A; CASTRO L.F; GÜIDO V.C; NASSUTE J.C; FERREIRA I.F.
Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2005, v. 41, n.2: 155-179.

SOUZA, M. V. N. Promising Drugs Against Tuberculosis. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 2006, v.1: 33-44.

FREEMAN, C.D; Klutman, N.E; Lamp, K.C, Metronidazole: a therapeutic review and update. *Drugs*, 2007, v.54: 679–708.

GEIJOA, M. P; HERRANZA, C. R; VAÑO A D; GARCÍA B Á. J; GARCÍA A M.; DIMASC J. F. Pauta corta de isoniazida y rifampicina comparada con isoniazida para la infección latente de tuberculosis. *Ensayo clínico aleatorizado Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007, v.25, n.5:300-4

KOROLKOVAS, A. *Essentials of medical chemistry*, Wiley-Interscience, New York, 1988 v.2: 1204.

LA-SCALEA, M. A; SERRANO, S.H.P; GUTZ, I.G.R. Comportamento voltamétrico de Metronidazole at Mercury Electrodes, *J. Braz. Chem. Soc.*, 1999, v.10, n.2: 127-135

LAMICHHANE, G; BISHAI, W. Defining the ‘survivasome’ of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.*, 2007, v13, n.3: 280-282

LANNOY, L. H.; CORTEZ-ESCALANTE, J.J. EVANGELISTA, M.S.N.; ROMERO, G.A.S. Tuberculosis incidence and risk factors among patients living with HIV/AIDS in public health service institutions in Brasilia, Federal District. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, 2008, v. 41, n. 6.

<http://www.fiocruz.br/ccs/glossario/tuberculose.htm>, acessada em Junho 2010; Munch, R.; *Microb. Infect.* 2003, 69, 74; Kaufmann, S. H. E.; *Tuberculosis* 2003, 83, 86.

MELO, F. A. F; NETO, J. I; AFIUNE, J. B, Metronidazol no tratamento e profilaxia da tuberculose: possibilidades de uso. *Bol. Pneumol. Sanit.*, 1999, v.7, n .2: 38-40.

MOUTINHO, Ivana Lúcia Damásio- Tuberculose: Aspectos imunológicos na infecção e na doença. *Rev. Med. Minas Gerais –Artigo de Revisão*, 2011.

MOREIRA, C. G.; PALMER, K. ; WHITELEY, M. ; SIRCILLI, M. P. ; TRABULSI, L. R. ; CASTRO, A. F. P, DE CASTRO, A. F. P, deCASTRO, A. F. P. ; SPERÂNDIO, V.. Bundle forming pili (BFP) and espa are involved in biofilm formation by enteropathogenic escherichia coli (EPEC). *Journal of Bacteriology*, Washington, USA, v. 188, 2006.

Nobelprize.org: The Nobel Prize in Chemistry 1952

ROSEMBERG, J. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. *Bol. Pneumol. Sanit.*, 2001, v.9, n.1.:35-59.

ROSSETTI, M. L. R; VALIM, A. R. M.; SILVA, M. S. N; RODRIGUES, V. S. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Rev. Saúde Pública*, 2002, v.36, n.4

SEISCENTO, M; CONDE, M. B; DALCOLMO, M. M. P. Tuberculose pleural. *J. bras. pneumol.*, 2006, v.32, s..4, pp. S174-S181.

SHEEHAN JC; HESS CP, "Novo Método A Formação de ligações peptídicas. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 1955, 1067-1068

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. *Spectrometric identification of organic compounds*. 7th ed. New York : John Wiley and Sons, 2005.

SNYDER, L.R.; CARR, P.W.; RUTAN, S.C. *J. Chromatogr. A*, 1993, 656, 537.

SOLOMONS, T.W.G., FRUHLE, C.B., Química Orgânica, 9^a Ed., LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., RJ, 2009 p. 114

SOUZA, M. V. N; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. *Quím. Nova*, São Paulo, 2006, v. 28, n. 4.

STELLA, V. J; CHARMAN, W. N. A; NARINGREKAR, V. H. Prodrugs. Do they have advantages in clinical practice? *Drugs*, 1985, v.29, n.5: 455-473.

TANG Jiansheng, MOHAN Thyagarajan, JOHN Verkade G. (1994). "Seletiva e eficiente Síntese dos Perhydro-1 ,3,5-triazina-2 ,4,6 trioneasn-d Carbodiimidas de isocianatos Usando (MeNCH₂CH₂) SN Catalisadores ZP". *J. Org. Chem*: 59. 4.931-4.938. doi : 10.1021/jo00096a041 .

VERMEERSCH, J.; VANDOORNE, F.; PERMENTIER D.; SCHACHT E. Macromolecular prodrugs of metronidazole 1. Esterification of hudroxyl containing polymers with metronidazole monossuccinate. 1985, Bull. Soc. Chim. Belg. V.94 nº8.

Vohra, Reena; Gupta, Meetu; Chaturvedi, Rekha; Singh, Yogendra Attack on the Scourge of Tuberculosis: Patented Drug Targets Vol. 1, n. 1, Jan. 2006, p. 95-106 (12)

WHO, Global tuberculosis epidemic levelling off: New report <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr08/en/index.html> acessado em 18/12/2009