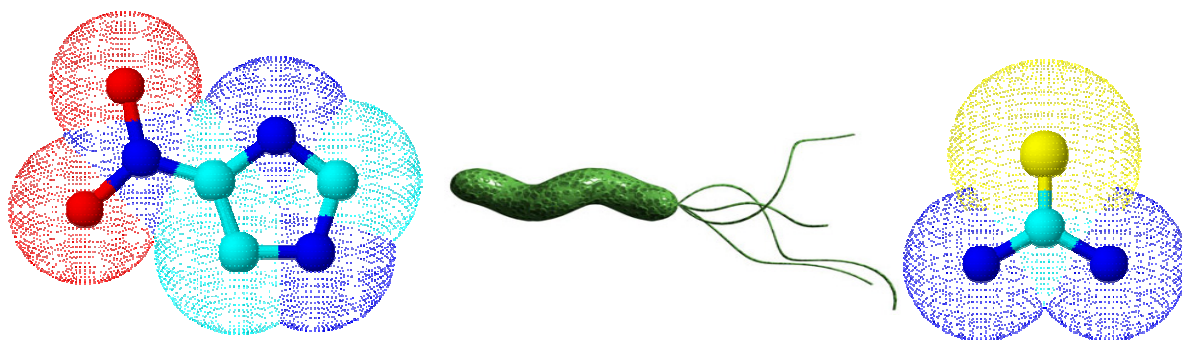


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS
POTENCIALMENTE ATIVOS CONTRA
*HELICOBACTER PYLORI***



ANTONIO TÁVORA DE ALBUQUERQUE SILVA

Orientadora
Profa. Dra. CHUNG MAN CHIN

Co-Orientadora
Profa. Dra. TAÍS MARIA BAUAB

ARARAQUARA – SP

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS
POTENCIALMENTE ATIVOS CONTRA
HELICOBACTER PYLORI

ANTONIO TÁVORA DE ALBUQUERQUE SILVA

Tese 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 Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

ARARAQUARA – SP

2008

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 Desenvolvimento de compostos potencialmente ativos contra *Helicobacter pylori*./
Antonio Távora de Albuquerque Silva. – Araraquara, 2008. 115 f.

Linha pesquisa: Desenvolvimento de fármacos.

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

Orientadora: Chung Man Chin. Co-orientadora: Taís Maria Bauab.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Pro-fármaco. 3. Latenciação.

CDD:615.19

CAPES: 4030000-5

Candidato: Antonio Távora de Albuquerque Silva.

Título da Tese: Desenvolvimento de compostos potencialmente ativos contra
Helicobacter pylori.

A Comissão Julgadora do trabalho de defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 08/08/2008, consideraram o candidato:

() REPROVADO

(X) APROVADO

1. Presidente (*Profa. Dra. Chung Man Chin*) – UNESP
2. Examinadora (*Profa. Dra. Veni Maria Andres Felli*) – USP
3. Examinadora (*Profa. Dra. Adelia Emilia de Almeida*) – UNESP
4. Examinadora (*Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite*) – UNESP
5. Examinadora (*Profa. Dra. Karina Ferrazzoli Devienne*) – UFTM

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho... porque cada pessoa é única para nós, e nenhuma substitui a outra.

Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só...

Levam um pouco de nós mesmos e nos deixam um pouco de si mesmos.

Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada.

Há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada.

Esta é a mais bela realidade da vida...a prova tremenda de que cada um é importante e que ninguém se aproxima do outro por acaso.”

Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

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

A minha Família que me deu segurança e incentivo para viajar mais de 2800Km para concluir este trabalho na FCF/Unesp/Araraquara;

As professoras Dra. Chung Man Chin e Dra. Tais Maria Bauab, pela valiosa orientação técnico-científica e profissional.

Aos professores Dr. Antonio Gilberto Ferreira (UFSCar) e Dr. Wagner Vilegas (IQ-Unesp) pela orientação na interpretação e obtenção dos espectros de RMN, sem os quais seria impossível a elucidação estrutural dos compostos aqui sintetizados;

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;

Aos membros da banca de qualificação e de defesa pela contribuição significativa para o aprimoramento deste trabalho;

A Mateus Scontri e Osmar Redondo (Depto. de Fármacos e Medicamentos /FCF/Unesp/Araraquara), assim como: Edinéia Fátima Corrêa; Marisa Fernandes; Sílvia Helena de Oliveira David; Valéria Aparecida Araújo; e Aparecida Bernadete Rocateli Jesus. (Depto. de Ciências Biológicas/FCF/Unesp/Araraquara) Luis Eduardo dos Santos (Depto. PANT/FCF/Unesp/Araraquara) por todo o apoio técnico no desenvolvimento e acompanhamento desta pesquisa;

Aos pós-graduandos Eliana Ometo Pavan Serafim, Lúcia Fioravanti de Castro, Leonardo Gorla Nogueira, Danilo Fuin Dignani, Jean Leandro dos Santos e Edinir Vizioli pelo incentivo e discussões técnicas durante o desenvolvimento deste trabalho;

A toda equipe do *Lapdesf* (Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos), pela confiança depositada.

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

A toda equipe de pós-graduação pelo excelente trabalho e valiosas orientações frente a secretaria da pós-graduação;

Aos amigos de Belém-PA, do Centro Universitário de Araraquara, do CRF-SP e em especial à Adriana Távora de Albuquerque Taveira, Andréa Távora de Albuquerque Taveira, Danyelle Cristine Marini, Eliana Ometto Pavan Serafim, Leoberto Costa Tavares, Maria Ierecê Távora de Albuquerque Taveira, Milena Takatui e Ricardo Sambiase Serafim, 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 o meu... muito obrigado.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE QUADROS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ESPECTROS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
Capítulo 1	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Compostos Nitroimidazóis	21
1.1.1 Histórico.....	21
1.1.2. Espectro de ação.....	24
1.1.3. Mecanismo de ação.	25
1.1.4 Relação Estrutura Atividade (REA).....	28
1.2 Planejamento de pró-fármacos.....	29
1.2.1 Latenciação	29
1.2.2 Derivados do metronidazol e secnidazol.....	34
1.3 <i>Helicobacter pylori</i>	37
1.4 Resistência bacteriana.....	50
1.5 Referências.....	55
Capítulo 2	65
2. OBJETIVOS	66
2.1 Objetivo Geral.....	66
2.2 Objetivos Específicos.....	66
Capítulo 3	67
3. PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE NITROIMIDAZÓIS E TIOURÉIA	68
3.1 Metodologias de síntese.....	68
3.2 Identificação dos Compostos Matrizes	73
3.3 Identificação dos compostos Monosuccinato de MDZ, S1, S2, S3 e MST....	77
3.4 Referências.....	88
Capítulo 4	89
4. ENSAIOS “IN VITRO” E “IN VIVO” PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE CONTRA <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	90
4.1 Amostra Bacteriana.	90
4.2 Método de diluição em microplacas.	90
4.2.1 Preparo da suspensão bacteriana.....	91

4.2.2 Preparo das substâncias de referência e controle negativo.	91
4.2.3 Preparo da solução de resazurina.	92
4.2.4 Método de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica.	92
4.3 Método de difusão em ágar.	94
4.4 Método de atividade “in vivo” contra <i>Helicobacter pylori</i>	95
4.4.1 Ativação das cepas de <i>Helicobacter pylori</i>	96
4.4.2 Indução da infecção.	97
4.4.3 Farmacoterapia e extração de material biológico.	97
4.4.4 Análise microbiológica.	98
4.4.5 Análise Histológica.	98
4.5 Resultados do método de diluição em microplacas.	99
4.6 Resultado do método de difusão em ágar.	102
4.7 Resultado do método “in vivo” de atividade contra <i>Helicobacter pylori</i>	102
4.7 Resultado da análise histológica.	104
4.8 Discussão do método de diluição em microplacas.	105
4.9 Discussão da metodologia de difusão em ágar.	106
4.10 Discussão da metodologia de atividade “in vivo” contra <i>Helicobacter pylori</i>	106
4.11 Referências.	107
Capítulo 5.	110
5. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS.	111
Anexos.	112
Anexo 1. Parecer comitê de ética.	113
Anexo 2. Procedimentos de síntese dos compostos propostos.	114

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AMH	Ágar Muller Hinton
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	Anidrido succínico
ATCC	American Type Culture Collection
BAB	Blood Agar Base
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI(NCCLS)	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMH	Caldo Mueller Hinton
DMAP	Dimetilaminopiridino
DMF	Dimetilformamida
FAINES	Fármacos antiinflamatórios não esteroidais
FTR	Fator de Transferência de Resistência
IBP	Inibidores de bomba de prótons
IR	Espectrometria de Infravermelho
MDZ	Metronidazol
MST	monosuccinato de tiouréia
N	Normal ou normalidade
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PdC	Plasma de Carneiro
RM	Razão de mutagenicidade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SdC	Sangue de Carneiro
Sdz	Secnidazol
SFB	Soro Fetal Bovino inativado estéril isento de <i>Mycoplasma</i>
Sg	Sangue
T°C	Temperatura
THF	Tetrahidrofurano
TSA	Tryptic Soy Agar
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Espectrometria de Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas do imidazol e de seus derivados: metronidazol e secnidazol.	22
Figura 2. Estrutura química dos diversos derivados imidazólicos.....	23
Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação do metronidazol.....	27
Figura 4. Exemplos de análogo, pró-fármaco e bioprecursor.....	30
Figura 5. Conceito de Pró-fármaco.	32
Figura 6. (A) Fosfato de metronidazol e (B) cloridrato de N,N-dimetilglicinato de metronidazol.	34
Figura 7. Pró-fármacos de ésteres duplos de metronidazol.....	36
Figura 8. Triéster de metronidazol.	36
Figura 9. Ésteres de metronidazol sintetizados por MAHFOUZ e HASSAN.	37
Figura 10. Prevalência de infecção por <i>H. pylori</i>	38
Figura 11. Taxa de infecção por <i>H. pylori</i> X idade.....	38
Figura 12. Correlação entre <i>Helicobacter pylori</i> e Patologias do TGI.	39
Figura 13. Fisiopatologia da gastrite crônica por <i>H. pylori</i>	41
Figura 14. Gastrite crônica por <i>H. pylori</i>	41
Figura 15. Fisiopatologia da úlcera péptica por <i>H. pylori</i>	42
Figura 16. Seleção de mutantes resistentes a um antibiótico durante a terapia antimicrobiana.	51
Figura 17. Representação esquemática da migração do gene de resistência bacteriana do Cromossomo para o Plasmídio.	51
Figura 18. Representação esquemática de um Plasmídio contendo genes de resistência bacteriana.	52
Figura 19. Representação esquemática dos mecanismos comuns de resistência bacteriana a antimicrobianos.	53
Figura 20. Configuração esquemática do teste de diluição em microplacas.	93
Figura 21. Metodologia do teste de difusão em ágar para o <i>Helicobacter pylori</i>	95

Figura 23. Representação esquemática do ensaio microbiológico.....	98
Figura 24. Representação esquemática do ensaio histológico.....	99
Figura 25. Revelação das microplacas com resazurina, onde:.....	100
Figura 26. Resultado do teste de difusão em ágar para o <i>Helicobacter pylori</i>	102
Figura 27. UFC/placa de <i>Helicobacter pylori</i> isolado de estômago de ratos após tratamento.	103
Figura 28. Resultado da análise de variância, usando os testes de TUKEY e DUNCAN a 0,05 da atividade antibacteriana contra <i>Helicobacter pylori</i> “in vivo”..	103
Figura 29. Número de UFC/placa de <i>Helicobacter pylori</i> isolado de estômago de ratos após tratamento por 7 dias (500mg/70Kg; 2x/dia).....	104
Figura 30. Percentual de eficácia na inibição do número de UFC/placa, no tratamento de ratos com <i>Helicobacter pylori</i> , após tratamento de 7 dias (500mg/70Kg; 2x/dia).....	104
Figura 31. Revelação das microplacas com suspensão de bactérias de 10 ³ UFC/mL com resazurina.....	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Espectro de ação do metronidazol.....	25
Quadro 2. Efeitos do grupo nitro na estrutura do anel imidazólico.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados gerais das sínteses do monosuccinato de metronidazol.	70
Tabela 2. Resultados gerais da síntese do composto S1.....	71
Tabela 3. Resultados gerais da síntese do composto S2.....	72
Tabela 4. Resultados gerais da síntese do composto S3.....	72
Tabela 5. Resultados gerais da síntese do composto MST.	72
Tabela 6. Bandas de absorção no espectro de infravermelho do metronidazol e do secnidazol (KBr).....	73
Tabela 7. Atribuições dos sinais de RMN ¹ H em CH ₃ OH-d ₄ do metronidazol e do secnidazol.	74
Tabela 8. Bandas de absorção no espectro de infravermelho do monosuccinato de metronidazol, composto S1, S2 e S3 (KBr).	78
Tabela 9. Atribuições dos sinais de RMN ¹ H e ¹³ C em CH ₃ OH-d ₄ do monosuccinato de metronidazol, composto S1, S2 e S3.	79
Tabela 10. Bandas de absorção no espectro de infravermelho (KBr) e Atribuições dos sinais de RMN ¹ H em CH ₃ OH-d ₄ do MST.	
Tabela 11. Condições experimentais para crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> em meio líquido.	101
Tabela 12. Condições experimentais para crescimento de <i>H. pylori</i> em meio sólido.	
Tabela 13. Número de UFC/placa de <i>Helicobacter pylori</i> isolados de estômago de ratos após tratamento.	103

LISTA DE ESPECTROS

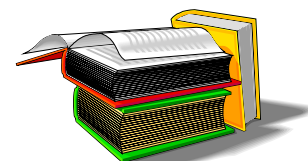
Espectro 1. Infravermelho do metronidazol (KBr).....	75
Espectro 2. Infravermelho do secnidazol (KBr).....	75
Espectro 3. RMN ¹ H do metronidazol em CH ₃ OH-d ₄	76
Espectro 4. RMN ¹ H do secnidazol em em CH ₃ OH-d ₄	76
Espectro 5. Infravermelho do Monosuccinato de Metronidazol (KBr).....	80
Espectro 6. Infravermelho do Composto S1 (KBr).....	80
Espectro 7. Infravermelho do Composto S2 (KBr).....	81
Espectro 8. Infravermelho do Composto S3 (KBr).....	81
Espectro 9. RMN de ¹ H do Monosuccinato de MDZ em CH ₃ OH-d ₄	82
Espectro 10. RMN de ¹³ C do Monosuccinato de MDZ em CH ₃ OH-d ₄	82
Espectro 11. RMN de ¹ H do Composto S1 em CH ₃ OH-d ₄	83
Espectro 12. RMN de ¹³ C do Composto S1 em DMSO-d ₆	83
Espectro 13. RMN de ¹ H do Composto S2 em CH ₃ OH-d ₄	84
Espectro 14. RMN de ¹³ C do Composto S2 em DMSO-d ₆	84
Espectro 15. RMN de ¹ H do Composto S3 em CH ₃ OH-d ₄	85
Espectro 16. RMN de ¹³ C do Composto S3 em DMSO-d ₆	85
Espectro 17. Infravermelho do MST' (KBr).	86
Espectro 18. RMN de ¹ H do MST' em DMSO-d ₆	87

RESUMO

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria de distribuição mundial e estima-se que 50% ou mais da população mundial já está infectada por este microrganismo, sendo uma das infecções mais comuns do mundo. A infecção pelo *H. pylori* está associada a maioria dos casos de gastrite crônica, úlceras (gástrica e duodenal) e câncer gástrico, sendo crescente o número de novas cepas resistentes. 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 indesejáveis é a mutagenicidade, a qual está relacionada com a gênese de metaplasias, carcinomas e na promoção do surgimento de cepas bacterianas resistentes incluindo de *H. pylori*. Dentre tais compostos encontram-se os derivados nitroimidazólicos (metronidazol e secnidazol), antimicrobianos de amplo espectro, muito utilizados no mercado brasileiro inclusive para o tratamento dessas infecções. Sendo assim, o desenvolvimento de novos fármacos por meio de síntese orgânica, modificando a estrutura molecular dos mesmos com base em alvos celulares específicos, pode resultar na: melhora das propriedades farmacológicas e redução da toxicidade dos novos compostos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi obter derivados de metronidazol, secnidazol e tiouréia, com atividade contra o *Helicobacter pylori*. Para tanto foram sintetizados os compostos: monosuccinato de metronidazol, **(S1)** ácido 4-[1-metil-2-(2-metil-5-nitro-imidazoil)etóxi]-4-oxobutanóico; **(S2)** ácido {2-[1-metil-2-(2-metil-5-nitro-imidazoil)etóxi]-2-oxoetóxi} acético; **(S3)** ácido 5-[1-metil-2-(2-metil-5-nitro-imidazoil)etóxi]-5-oxopentanóico; e **(MST)** ácido 4-[(aminocarbonotioil)amino]-4-oxobutanóico. Os resultados dos ensaios “in vivo” para determinação da atividade antimicrobiana contra o *Helicobacter pylori*, mostraram que todos os compostos obtidos possuem atividade antimicrobiana contra este agente, mas que somente o composto S3 (ácido 5-[1-metil-2-(2-metil-5-nitro-imidazoil)etóxi]-5-oxopentanóico) demonstra atividade superior a seu fármaco matriz.

ABSTRACT

The *Helicobacter pylori* is a bacteria of world distribution and it is considered that 50% or more of the world population it is already infected by this microorganism, being one of the infections more common of the world. The *H. pylori* infection is associated with most of the cases of chronic gastritis, gastric ulcers, duodenal ulcers and gastric cancer, being growing the number of new resistant strain. In therapeutics, each drug produces a series of effects, being usually, just an associate to the primary objective of the phamacotherapy and all the secondary effects referred as undesirable. To nitrogroups compounds, one of these effects is the mutagenicity, which is related with genesis of the metaplasias, carcinomas and in the promotion of the appearance of resistant bacterial strain including *H. pylori*. Between such compounds are the nitroimidazoles (metronidazole and secnidazole), antimicrobial of wide spectrum, broadly used in the Brazilian market for the treatment of those infections. Being like this, the development of new antimicrobial agents by means of organic synthesis, modifying the molecular structure of the same ones with base in specific cellular target, can result in the: improvement of the pharmacology properties and toxicity reduction of the new compounds. In that sense, the objective of this study went obtain compounds starting from metronidazole, secnidazole and thiouréia, with activity against the *Helicobacter pylori*. For so much the compositions were synthesized: metronidazole monossuccinate, (S1) 4-[1-methyl-2-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethoxy]-4-oxobutanoic acid; (S2) {2-[1-methyl-2-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethoxy]-2-oxoethoxy}acetic acid; (S3) 5-[1-methyl-2-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethoxy]-5-oxopentanoic acid; and (MST) acid 4-[(aminocarbonotioil)amino]-4-oxobutanóico. The results of the "in vivo" assay for determination of the antimicrobial activity against the *Helicobacter pylori*, showed that all the obtained compounds possess antimicrobial activity against this agent, but that only the compound (S3) 5-[1-methyl-2-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethoxy]-5-oxopentanoic acid, demonstrates superior activity its main drug.



Capítulo 1

Introdução

Neste capítulo é realizada uma descrição da Química Farmacêutica e do seu papel por meio do processo de latenciação, no desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos derivados de compostos nitroimidazóis. Assim como uma revisão da literatura sobre tais compostos e sobre o *Helicobacter pylori*.

1. INTRODUÇÃO

É crescente e alarmante o número de cepas bacterianas que têm desenvolvido resistência a diversos agentes antimicrobianos, originando assim, altas taxas de morbidade e mortalidade na saúde pública, em especial no setor hospitalar. Dentre os principais agentes de infecções nosocomiais estão: enterobactérias produtoras de β -lactamases, *Enterococcus* spp, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* metilina resistente e *Pseudomonas aeruginosa* produtora de metallo β -lactamases (FANG et al, 2002; SANCHEZ, 2006).

Pesquisadores da área demonstram 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 mais vulneráveis. As patologias como pneumonia bacteriana, tuberculose, faringite, laringite e gonorréia, que seriam de fácil controle com doses simples de antimicrobianos, atualmente, são de difícil tratamento (ALCAMO, 2001).

O *Helicobacter pylori*, não é considerado um agente causador de infecções nosocomiais, mas está relacionado a doenças gástricas como: gastrite crônica, úlcera péptica, carcinoma e linfoma gástricos e a existência de cepas multiresistentes desta bactéria não pode ser ignorada (COTRAN et al, 2000; SANCHEZ, 2006; SIQUEIRA et al, 2007).

Devido a alta taxa de multiplicação da maioria dos microrganismos, a probabilidade de uma população microbiana tornar-se resistente a um agente antimicrobiano é muito alta. Nessas condições, bactérias resistentes multiplicam-se na presença do agente antimicrobiano, substituindo a população sensível. Como exemplo, quando a penicilina G foi introduzida como agente antimicrobiano, cerca de 3% das cepas de *S. aureus* eram resistentes a ela. Com o elevado uso deste antimicrobiano, mensurado em centenas de toneladas por ano, estima-se que

atualmente 90% ou mais das cepas de *S. aureus* já são resistentes a penicilina G (JENSEN et al, 1997; 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 terapêuticas após a administração do mesmo” (ROITT et al, 1999; MIMS et al, 2005).

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. 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; MIMS et al, 2005).

São diversos os fatores que levam à resistência aos antimicrobianos, como por exemplo: o uso dos mesmos de forma incorreta e extensiva pelos prescritores; em resfriados e gripes; na profilaxia cirúrgica e em pacientes imunodeprimidos; na

ração animal; em tratamentos prolongados contra acne; por pacientes com dificuldade de seguir o tratamento prescrito; na automedicação; e na disseminação de bactérias resistentes através de regiões geográficas distintas (ALCAMO, 2001; TORTORA et al, 2002).

Normalmente, linhagens de bactérias resistentes são frequentes em indivíduos que trabalham em ambientes hospitalares. Nestes locais, a utilização de antimicrobianos é, muitas vezes, indiscriminada. 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 amplo consumo sem prescrição médica e onde as condições sanitárias não são adequadas (ALCAMO, 2001; NESTER et al, 2001; TORTORA et al, 2002).

Alguns países como México, Guatemala e Brasil, permitem a venda de antimicrobianos potentes no balcão, facilitando o uso incorreto e indiscriminado, que é um fator intrínseco à ocorrência de resistência bacteriana. Entre 1968 e 1971, cerca de 12.000 pessoas morreram na Guatemala de infecção por *Shigella dysenteriae* resistente a antimicrobianos (ALCAMO, 2001).

Adicionalmente, ocorre a transferência de genes associados à resistência bacteriana 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 (ALCAMO, 2001; NESTER et al, 2001).

Os antimicrobianos já foram considerados fármacos “milagrosos”, mas a resistência bacteriana leva ao pensamento de que tais fármacos devam ter seu controle de forma restrita, semelhante ao que ocorre com os narcóticos (ALCAMO, 2001).

A crescente resistência bacteriana é um desafio aos pesquisadores atuais, que propõem como possibilidades para enfrentá-la: melhorar o sistema imune do

hospedeiro; o uso de bacteriófagos para inibir o crescimento de determinadas bactérias; e a busca de novos fármacos capazes de vencer a resistência bacteriana (ALCAMO, 2001).

Derivados de nitroimidazóis como o metronidazol e o secnidazol, antimicrobianos de amplo espectro, são também potentes agentes mutagênicos para bactérias e sistemas eucariontes primitivos (SISSON et al, 2000; ZHANG & WANG et al, 2000; MENÉNDEZA et al, 2001; TORTORA et al, 2002).

O grande responsável pela atividade antiparasitária, antimicrobiana e mutagênica do metronidazol e do secnidazol é seu grupo nitro (NO_2) que também causa dano no DNA de linfócitos circulantes. Contudo, estes se recuperam, reparando seu DNA, em até 15 dias após o fim do tratamento, permanecendo ainda discutível seu efeito carcinogênico (SISSON et al, 2000; MENÉNDEZA et al, 2001).

Considerando o potente efeito mutagênico dos compostos nitroimidazóis para bactérias, 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 que, estudos de GUIDO e colaboradores (2001), demonstraram que a utilização desta metodologia pode diminuir o efeito mutagênico do nitrocomposto nitrofural em 300 a 400%.

1.1 Compostos Nitroimidazóis

1.1.1 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 (KOROLKOVAS, 1988; SILVA, 2006).

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* (KOROLKOVAS, 1988; SILVA, 2006).

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, Cuzco indicou o mercúrio para o alívio dos sintomas da sífilis (KOROLKOVAS, 1988).

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. De Paracelso em diante, a quimioterapia

européia fez poucos avanços. E o grande novo impulso fora dado por Paul Ehrlich no período de 1854 a 1915 (**pai da quimioterapia moderna**) (SILVA, 2006).

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; BRUNTON et al, 2006).

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 -hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol (figura 1) (BRUNTON et al, 2006).

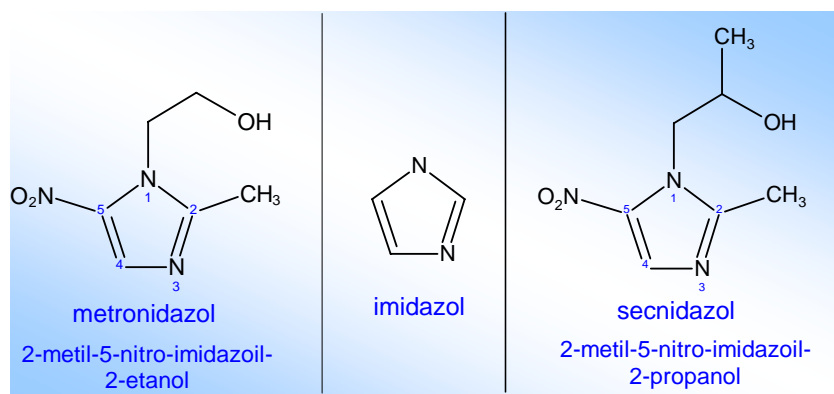


Figura 1. Estruturas químicas do imidazol e de seus derivados: metronidazol e secnidazol.

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 negativas e positivas além de atividade contra *Giardia lamblia* (BRUNTON et al, 2006).

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. O metronidazol foi o primeiro derivado 5-nitroimidazol introduzido na terapêutica humana e continua até hoje como o principal representante do grupo (TAVARES, 1999; BRUNTON et al, 2006).

Devido ao sucesso do metronidazol, outros derivados 5-nitroimidazóis com estrutura química e atividade biológica semelhante ao metronidazol foram desenvolvidos, sendo estes: secnidazol, tinidazol e ornidazol (figura 2) (MURRAY et al, 1999; SALLES & SALLES, 2000; BRUNTON et al, 2006).

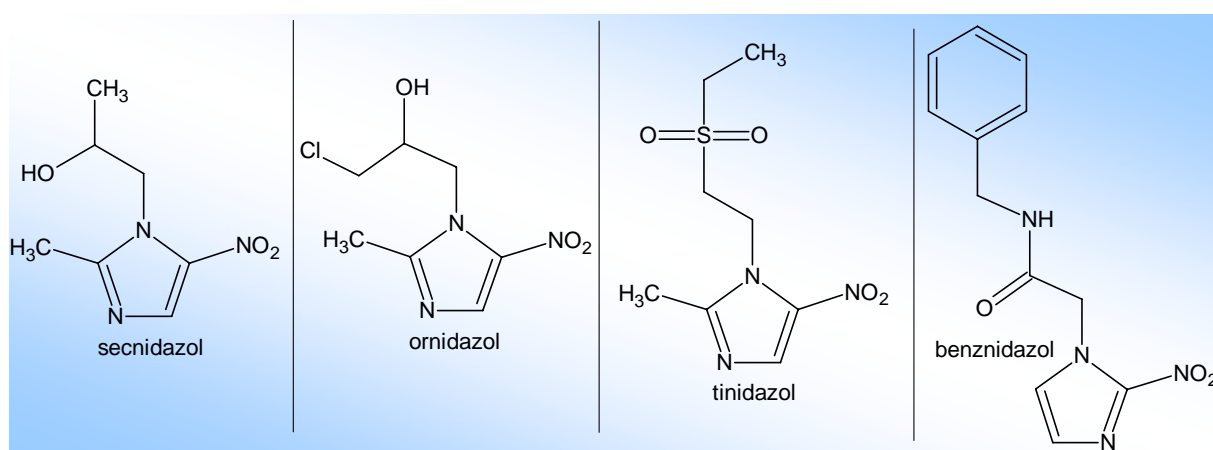


Figura 2. Estrutura química dos diversos derivados imidazólicos.

O benznidazol é outro derivado de 5-nitroimidazol que, também possui atividade contra *T. cruzi*, na Doença de Chagas (figura 2) (BRUNTON et al, 2006).

O secnidazol é um dos derivados nitroimidazólicos mais recentes, e o mais semelhante quimicamente ao metronidazol. Foi inicialmente sintetizado na França pela Rhone Poulenc e introduzido no Brasil em 1975 (SALLES & SALLES, 2000).

1.1.2. Espectro de ação

O metronidazol é classificado como agente antiprotozoário e agente antibacteriano diverso (RANG et al, 2001). O quadro 1, mostra o espectro de ação deste fármaco em ambas as classificações.

O secnidazol possui o mesmo espectro de ação antimicrobiano do metronidazol, contudo, atua em concentrações menores e possui meia-vida mais prolongada (SALLES & SALLES, 2000).

Quadro 1. Espectro de ação do metronidazol.

Antiprotozoário	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Balantidium coli</i>; • <i>Blastocystis hominis</i>; • <i>Chilomastix mesnili</i>; • <i>Dracunculus medinensis</i>; • <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>Campylobacter</i> spp, <i>Fusobacterium varium</i>, <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Gardnerella vaginalis</i> e <i>Helicobacter pylori</i>; <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>Mycobacterium tuberculosis</i> (forma latente), <i>Peptococcus</i> spp. e <i>Peptostreptococcus</i> spp.;

Fonte: (CHO et al, 1982; CHO & HAYNES, 1985; KOROLKOVAS, 1988; BARON, 1991; SILVA, 2006; 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; RANG et al, 2001; TORTORA et al, 2002; MIMS et al, 2005; BRUNTON et al, 2006).

1.1.3. Mecanismo de ação.

Como descrito, o metronidazol e o secnidazol são fármacos 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; SALLES & SALLES, 2000; SISSON et al, 2000; TRABULSI et al, 2000; BENDESKY & MENÉNDEZ, 2002; SISSON et al, 2002; MIMS et al, 2005; BRUNTON et al, 2006; KOROLKOVAS, 2007).

Os organismos anteriormente citados, diferentemente dos aeróbios, possuem componentes transportadores de elétrons, as ferridoxinas, pequenas proteínas Fe-S com suficiente potencial redox negativo para doar elétrons ao metronidazol (BRUNTON et al, 2006).

Organismos anaeróbios ou microaerofílicos susceptíveis ao metronidazol, geram sua energia por meio da fermentação oxidativa de cetoácidos como o ácido 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** (SISSON et al, 2002; BRUNTON et al, 2006).

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 (BENDESKY & MENÉNDEZ, 2002; SISSON et al, 2002; DRUG INFORMATION, 111; BRUNTON et al, 2006).

No *Helicobacter pylori*, o metronidazol e o secnidazol são ativados 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 et al, 2001; JENKS & EDWARDS, 2002).

O mecanismo de ação do metronidazol e do secnidazol, pode ser visto resumidamente na figura 3. O metronidazol é cataliticamente reciclado, pois a perda do elétron do metabólito ativo regenera o composto original (SISSON et al, 2002; BRUNTON et al 2006).

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 (BRUNTON et al, 2006).

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; SISSON et al, 2002).

As células de mamíferos não são danificadas devido a falta de enzimas necessárias para reduzir o grupo nitro do metronidazol, com exceção dos linfócitos circulantes, contudo o sistema de reparo de DNA humano, reverte o dano após o fim do tratamento (BARON, 1991; MENÉNDEZA et al, 2001; MOBLEY et al, 2001; SISSON et al, 2002).

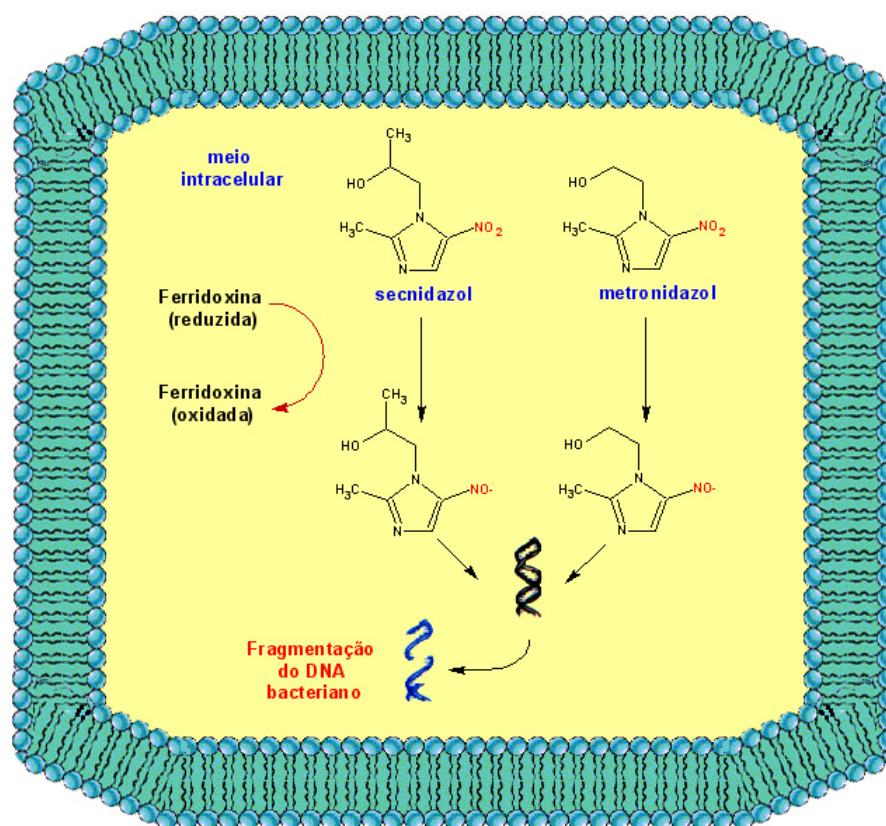


Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação do metronidazol.

1.1.4 Relação Estrutura Atividade (REA).

Existem diversos fármacos com o grupo nitro (NO_2), 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 (NO_2) é favorável, e indispensável, para a atividade antiparasitária de vários derivados nitrados, principalmente do furano, tiofeno e tiazol. Estando representado no quadro 2, os diversos efeitos do grupo nitro (KOROLKOVAS, 1988; SISSON et al, 2002).

Quadro 2. Efeitos do grupo nitro na estrutura do anel imidazólico.

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; SISSON et al, 2002).

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 (BRUNTON et al, 2006).

Para melhorar a hidrossolubilidade de moléculas com grupos nitro, adiciona-se grupos -COOH ou -SO₃ (KOROLKOVAS, 1988). E as posições 1 e 2 são as mais indicadas para modificações na molécula do metronidazol (BARRY et al, 2000).

1.2 Planejamento de pró-fármacos.

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).

1.2.1 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 (CHUNG & FERREIRA, 1999).

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 (CHUNG et al, 2005).

Hoffman, em 1889, transformou o ácido salicílico em ácido acetilsalicílico, utilizando o princípio da latenciação (SILVA et al, 2005).

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 (CHUNG et al, 2005).

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) (CHUNG et al, 2005).

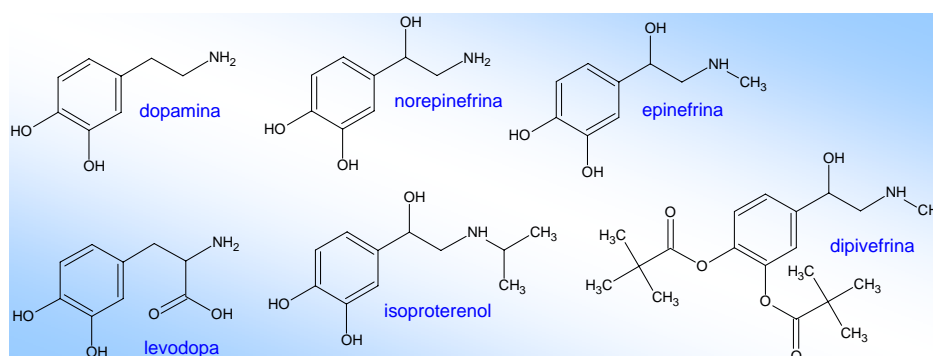


Figura 4. Exemplos de análogo, pró-fármaco e bioprecursor.

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 (SILVA et al, 2005).

Muitas razões justificam a busca por novos fármacos latentes (BUNDGAARD, 1985). 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 (BUNDGAARD, 1985; CHUNG & FERREIRA, 1999; CHUNG et al, 2005; SILVA et al, 2005).

As formas latentes de fármacos podem ser divididas em **pró-fármacos** e **fármacos dirigidos**. E 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 5) (CHUNG et al, 2005; SILVA et al, 2005).

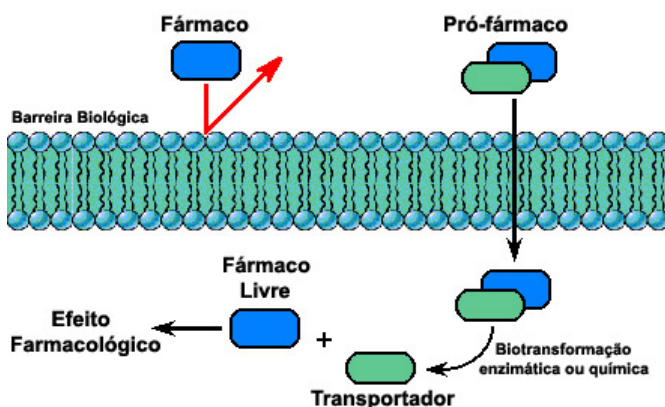


Figura 5. Conceito de Pró-fármaco.

Os pró-fármacos possuem alguns fatores importantes em seu desenvolvimento, para permitir o aprimoramento das propriedades do fármaco matriz (BUNDGAARD, 1985), 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 natural da morfina (CHUNG et al, 2005).

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 (SILVA et al, 2005).

Atualmente, alguns grupos funcionais de fármacos podem ser modificados por reações químicas, produzindo grupos reversíveis muito utilizados no desenvolvimento de pró-fármacos (CHUNG et al, 2005; SILVA et al, 2005).

O desenvolvimento de pró-fármacos tem como objetivo resolver diversos problemas relacionados aos fármacos atuais (BUNDGAARD, 1985), 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.

Diversos pro-fármacos derivados de ésteres com atividade antimicrobiana já foram sintetizados, entre estes pode-se citar: (1) L-084 com elevada taxa de absorção intestinal e com atividade contra bactérias gram positivas e gram negativas, (2) T-91825 derivado de cefalosporina com atividade antimicrobiana “*in vitro*” e “*in vivo*” contra bactérias gram positivas, gram negativas e *Staphylococcus*

aureus meticilina resistente (MRSA), (3) TAK-599 derivado de cefalosporina com atividade em pneumonia animal causada por MRSA e (4) NM394, derivado da prulifloxacina, ativo contra *Pseudomonas aeruginosa* inibindo a DNA girase e as topoisomerasas II e IV (TANI et al, 2002; IIZAWA et al, 2004; ISODA et al, 2006).

1.2.2 Derivados do metronidazol e secnidazol

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 6a).

Em 1984, BUNDGAARD e colaboradores sintetizaram outro éster de metronidazol, melhorando em 50% sua hidrossolubilidade para uso parenteral (figura 6b).

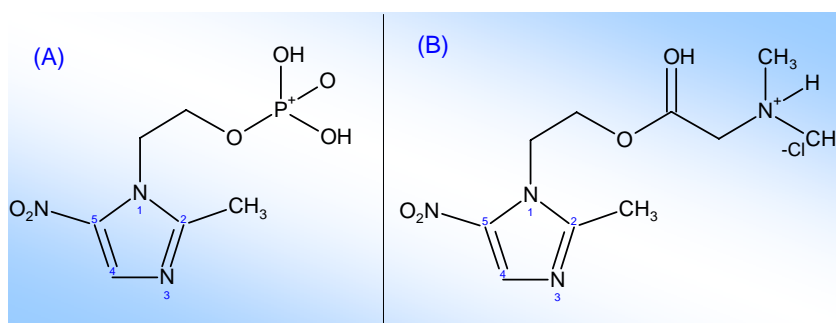


Figura 6. (A) Fosfato de metronidazol e (B) cloridrato de *N,N*-dimetilglicinato de metronidazol.

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 metronidazol + 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 7), administrados por via oral demonstrou que os mesmos eram absorvidos na forma não ionizada, com liberação plasmática prolongada.

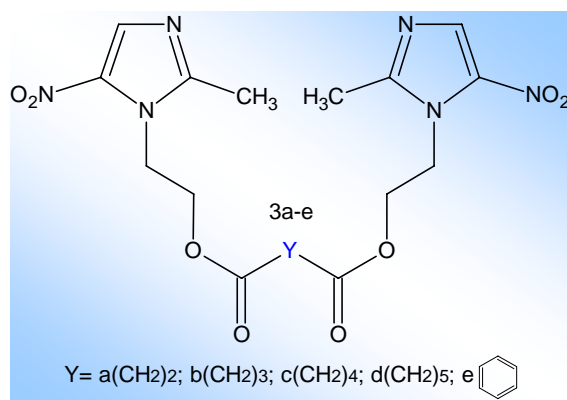


Figura 7. Pró-fármacos de ésteres duplos de metronidazol.

Em 1998, BOWDEN e IZADI desenvolveram um triéster de metronidazol (C₂₇H₂₇N₉O₁₂), (figura 8) o qual possui uma atividade antimicrobiana significativamente maior, quando comparado ao metronidazol.

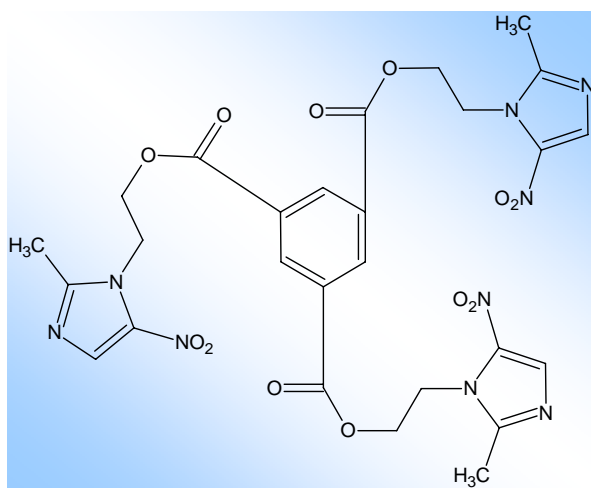


Figura 8. Triéster de metronidazol.

Com a mesma finalidade de CHO e colaboradores (1982) Mahfouz e Hassan (2001), sintetizaram ésteres de metronidazol (figura 9), obtendo excelentes resultados quanto a hidrossolubilidade, estabilidade química e liberação plasmática do pró-fármaco.

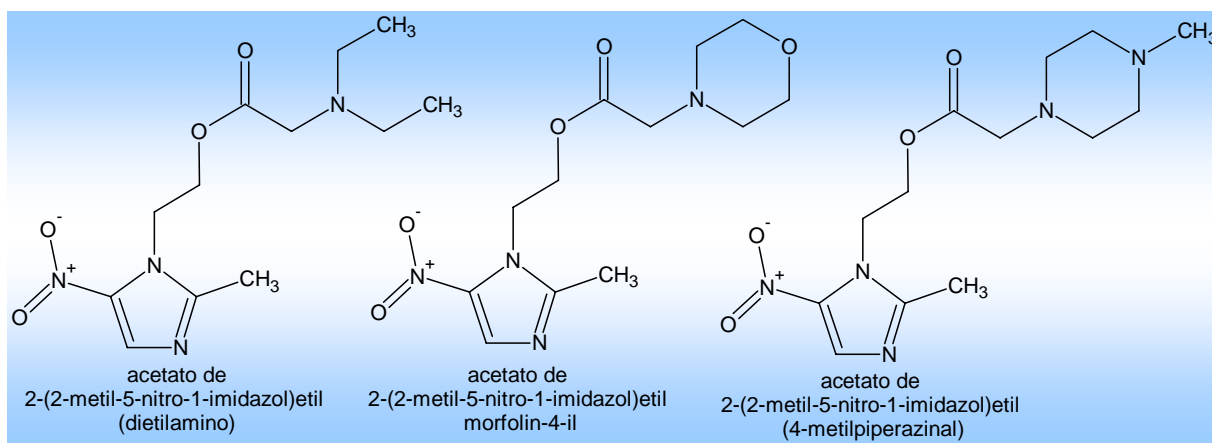


Figura 9. Ésteres de metronidazol sintetizados por MAHFOUZ e HASSAN.

1.3 *Helicobacter pylori*.

O *Helicobacter pylori* é um bastonete gram-negativo, curvilíneo, que mede cerca de 3,5 x 0,5 μ m, pertencente a um grupo de bactérias que se adaptaram ao nicho ecológico gerado pela mucosa gástrica (MURRAY et al, 1999; BROWN, 2000; COTRAN et al, 2000; LACY & ROSEMORE, 2001; MOBLEY et al, 2001; PARK et al, 2001; MURRAY et al, 2007).

Este agente é encontrado na camada de muco do estômago e em grupos acima das junções intercelulares do epitélio, e seu potencial patogênico também está relacionado à urease, mucinase e etc. (COTRAN et al, 2000; MOBLEY et al, 2001; MURRAY et al, 2007).

É uma bactéria de distribuição mundial (figura 10) e possui a estimativa de já ter infectado 50% ou mais da população mundial, tornando-se uma das infecções mais comuns do mundo (IFHII, 1997; BROWN, 2000; MOBLEY et al, 2001; BRUNTON et al, 2006).

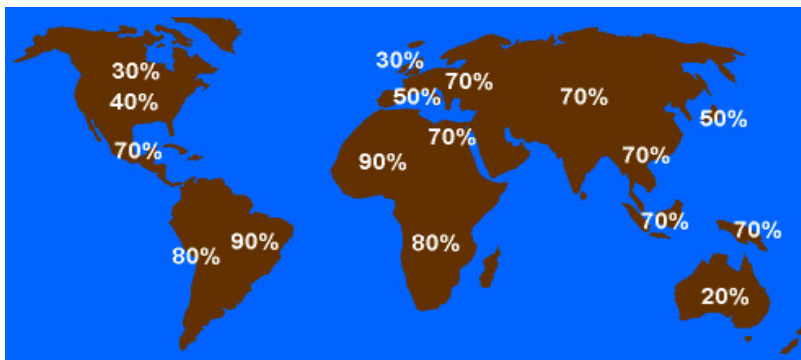


Figura 10. Prevalência de infecção por *H. pylori*.

Este microorganismo pode ser adquirido na infância por volta dos 10 anos e estima-se que mais de 50% das crianças do mundo são portadoras (POUNDER, 1995). Nos países desenvolvidos, onde as condições sanitárias são melhores, a infecção é pouco freqüente na infância, sendo que a incidência aumenta com o avanço da idade na razão de 0,5 a 1,0% por ano e em torno de 50% da população acima de 60 anos apresenta a infecção. Nos países em desenvolvimento, a infecção ocorre de forma precoce e com freqüências mais altas na infância, podendo atingir 80% ou mais dos adultos (figura 11) (BROOKS, 2000; TRABULSI et al, 2000).

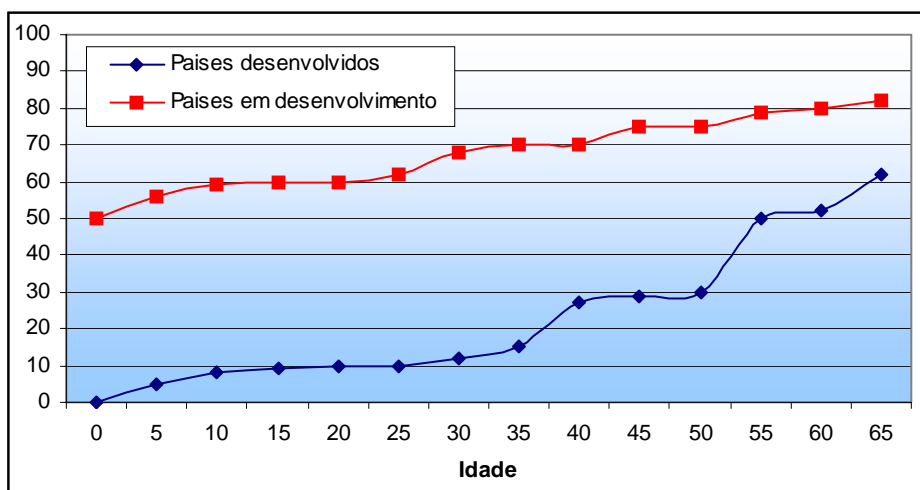


Figura 11. Taxa de infecção por *H. pylori* X idade.

Dentre as principais características estruturais e fisiológicas do *H. pylori*, pode-se destacar o flagelo polar, a ausência de esporos e a ocorrência de porinas. Adicionalmente pode-se citar a síntese de urease, que cliva a uréia endógena

transformando-a em amônia, que resulta em um tamponamento do ácido gástrico, conferindo proteção bacteriana e citotoxicidade para as células da mucosa gástrica. Também deve-se ressaltar como característica fisiológica do *H. pylori* sua ligação com as células epiteliais gástricas através de uma adesina bacteriana, onde essa união é mais forte com as células epiteliais que contêm o antígeno do grupo sanguíneo tipo “O” (SMOOT et al, 1990; MEGRAUD et al, 1992; MITANI-EHARA, 1994; BRZOZOWSKI et al, 1996; MITANI-EHARA et al, 1997; COTRAN et al, 2000; MOBLEY et al, 2001; MURRAY et al, 2007).

O papel do *H. pylori* na patogênese das doenças do TGI como gastrite crônica, úlcera gástrica, úlcera duodenal e câncer gástrico, vem sendo investigado, estando este microorganismo, fortemente associado com a maioria dos casos de úlceras gástricas e duodenais (MATSUKURA et al, 1995; ROITT et al, 1999; COTRAN et al, 2000; MOBLEY et al, 2001; MIMS et al, 2005; SILVA, 2006; MURRAY et al, 2007).

O *H. pylori* está presente em 90% dos pacientes com gastrite crônica (figura 12), sendo que as taxas de colonização aumentam com a idade, atingindo 50% dos adultos americanos acima de 50 anos. Além disso, a erradicação desta bactéria parece reduzir a recorrência da úlcera duodenal, bem como reverter alterações histológicas da gastrite (COTRAN et al, 2000).

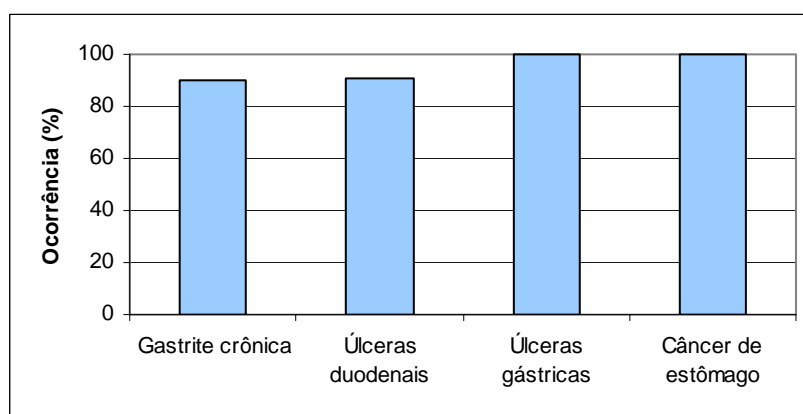


Figura 12. Correlação entre *Helicobacter pylori* e Patologias do TGI.

A infecção crônica pelo *H. pylori* é, de longe, a associação etiológica mais importante na gastrite crônica, além de exercer papel fundamental nas úlceras pépticas e também pode estar associado ao carcinoma e linfoma gástrico (COTRAN et al, 2000; MOBLEY et al, 2001; MURRAY et al, 2007; SIQUEIRA et al, 2007).

A prevalência da infecção entre adultos de Porto Rico excede 80%. Nessa e em outras áreas onde a infecção é endêmica, o microrganismo parece ser adquirido na infância e persiste por décadas. A maioria das pessoas infectadas, também possuem gastrite associada, mas não apresentam sintomas. Entretanto, as pessoas infectadas apresentam maior risco de desenvolver úlcera péptica e, possivelmente, câncer gástrico (MATSUKURA et al, 1995; COTRAN et al, 2000; MIMS et al, 2005; MURRAY et al, 2007; SIQUEIRA et al, 2007).

O *H. pylori* parece ser capaz de iniciar e manter um estado crônico de lesão da mucosa gástrica. Pacientes com gastrite crônica e *H. pylori* geralmente melhoram ao serem tratados com agentes antimicrobianos, sendo as recorrências associadas ao reaparecimento desse microrganismo (COTRAN et al, 2000; MOBLEY et al, 2001).

Em indivíduos infectados pelo *H. pylori* o mesmo posiciona-se na camada superficial da mucosa, entre as microvilosidades das células epiteliais (figura 13). A distribuição dos microrganismos (figura 14) pode ser esparsa e irregular, com áreas de colonização maciça adjacente a áreas sem nenhum microrganismo. Em casos extremos, os microrganismos formam um tapete na superfície luminal das células epiteliais superficiais, nas células do colo mucoso e nas células epiteliais que se localizam nas criptas gástricas, não invadindo a mucosa (COTRAN et al, 2000; MOBLEY et al, 2001; MURRAY et al, 2007).

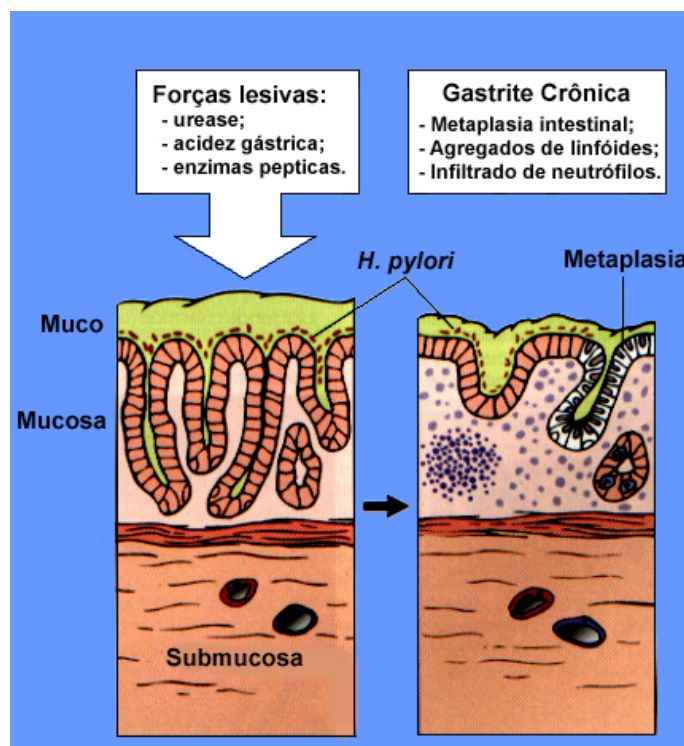


Figura 13. Fisiopatologia da gastrite crônica por *H. pylori*.

Os microrganismos são mais facilmente demonstrados com a coloração pela prata (figura 14), embora possam ser visualizados com a coloração de Giemsa e com a hematoxilina-eosina (COTRAN et al, 2000; MOBLEY et al, 2001; MURRAY et al, 2007).

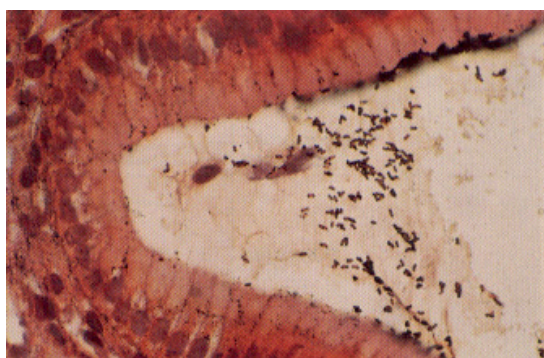


Figura 14. Gastrite crônica por *H. pylori*.

A úlcera é uma abertura na mucosa do trato digestivo, que se estende através do tecido da mucosa até a submucosa, ou ainda em camadas mais profundas. Embora as úlceras possam ocorrer em qualquer região do trato digestivo, as mais prevalentes são as úlceras pépticas (gástricas e duodenais) (COTRAN et al, 2000;

MOBLEY et al, 2001; MURRAY et al, 2007).

São consideradas úlceras pépticas (figura 15), lesões crônicas geralmente isoladas, decorrente de ação agressiva dos sucos pépticos. Nos Estados Unidos, aproximadamente 4 milhões de pessoas têm úlceras pépticas (gástrica e/ou duodenal) e, a cada ano, 350.000 novos casos são diagnosticados. Cerca de 100.000 pacientes são hospitalizados anualmente e aproximadamente 3.000 pessoas morrem a cada ano devido à úlcera péptica. Esta patologia é mais freqüentemente diagnosticada em adultos de meia-idade, mas que podem tornar-se evidentes pela primeira vez durante a juventude. Surgem desencadeadas por um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa da mucosa gastroduodenal e forças lesivas e podem, após um período de semanas a meses, evoluir para a cura com ou sem terapia. Entretanto, mesmo com a cura, a propensão de se desenvolverem úlceras pépticas permanece, em parte, devido à propensão para infecções recorrentes por *H. pylori* (COTRAN et al, 2000; MOBLEY et al, 2001; SIQUEIRA et al, 2007).

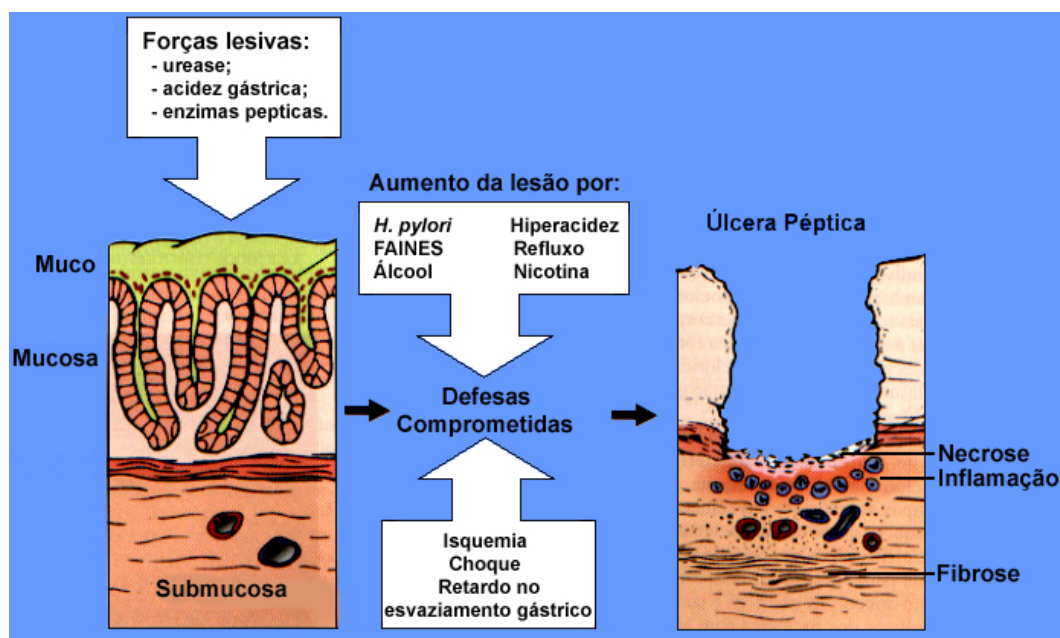


Figura 15. Fisiopatologia da úlcera péptica por *H. pylori*.

O ácido gástrico e a pepsina são essenciais para a formação de ulcerações pépticas (gástricas ou duodenais). O *H. pylori* além de ser encontrado na maioria dessas lesões, biotransforma a uréia em amônia via ação da urease, estimulando a liberação de gastrina, aumentando, paradoxalmente, a produção do ácido gástrico (COTRAN et al, 2000; MOBLEY et al, 2001; SIQUEIRA et al, 2007).

Outros eventos como hiperacidez gástrica, uso crônico de antiinflamatórios não-esteroidais, cirrose alcoólica, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência renal crônica, hipertireoidismo e o hábito de fumar, podem agir isoladamente ou em conjunto com o *H. pylori* para causar uma ulceração péptica (COTRAN et al, 2000; MOBLEY et al, 2001; SIQUEIRA et al, 2007).

O tratamento com antimicrobianos para a infecção por *H. pylori* promove a cura das úlceras e tende a prevenir sua recorrência. Portanto, é de grande interesse a elucidação dos possíveis mecanismos pelos quais esse microrganismo afeta o equilíbrio das defesas da mucosa. Algumas possibilidades incluem:

- O *H. pylori* secreta urease, que gera amônia livre e protease, que fragmenta as glicoproteínas no muco gástrico. Os microrganismos também sintetizam fosfolipases, que lesam as células epiteliais superficiais e levam a produção e liberação dos eicosanóides (mediadores químicos do processo inflamatório).
- Os neutrófilos atraídos pelo *H. pylori* liberam mieloperoxidase, que produz ácido hipocloroso, produzindo em troca, monocloramina na presença de amônia. Onde, tanto o ácido hipocloroso quanto a monocloramina podem lesar e destruir as células de mamíferos.
- Ambas as células, epiteliais mucosas e as células endoteliais da lâmina própria, são alvos importantes das ações destrutivas da colonização pelo *H. pylori*, onde a oclusão trombótica dos capilares superficiais também é causada por um fator bacteriano ativador plaquetário.

- Além da síntese de enzimas pelo *H. pylori*, outros antígenos recrutam células inflamatórias para a mucosa, que esta cronicamente inflamada, torna-se mais suscetível à lesão pelo ácido gástrico.
- Finalmente, acredita-se que a lesão da mucosa permita um vazamento dos nutrientes teciduais para a superfície do micro-ambiente, sustentando, então, a sobrevivência dos bacilos (SMOOT et al, 1990; MEGRAUD et al, 1992; MITANI-EHARA, 1994; BRZOZOWSKI et al, 1996; MITANI-EHARA et al, 1997; COTRAN et al, 2000; MOBLEY et al, 2001; MURRAY et al, 2007).

Dentre os tumores malignos que ocorrem no estômago, o carcinoma é o mais importante e o mais comum (90 a 95%). As demais neoplasias, em ordem de frequência, são os linfomas (4%), tumores carcinóides (3%) e tumores malignos de células estromais (2%). Os principais fatores que parecem afetar a gênese do câncer gástrico são resumidos em ambientais, do hospedeiro e genético, acreditando-se que a infecção por *H. pylori* seja um fator de contribuição, a qual leva a gastrite crônica e metaplasia intestinal, para a carcinogênese gástrica (COTRAN et al, 2000).

Reconhecendo-se que os indivíduos infectados por esta bactéria, representam mais de 50% da população adulta em muitas localidades (figura 10) estima-se que o risco relativo de câncer gástrico em infecção por *H. pylori* é de aproximadamente 3 vezes acima da população geral (COTRAN et al, 2000).

Existem evidências acumuladas que associam a infecção gástrica pelo *H. pylori* à etiologia dos linfomas a carcinomas. Tal relação é mais forte para o linfoma de células B do estômago do que para os carcinomas. Essa relação foi estabelecida com base em estudos epidemiológicos, bem como através da detecção de infecção por *H. pylori* na grande maioria dos casos de linfomas gástricos, onde, após o tratamento da infecção por este microorganismo, pode ser verificada a regressão do

linfoma na maioria dos casos (COTRAN et al, 2000; MOBLEY et al, 2001; SIQUEIRA et al, 2007).

Como os tumores surgem em tecido linfóide associado à mucosa (MALT), tais patologias são muitas vezes denominados MALTomas. As células B que dão origem a esses tumores normalmente residem nas zonas marginais dos folículos linfóides, daí a denominação alternativa de linfoma de zona marginal (COTRAN et al, 2000; MOBLEY et al, 2001; MURRAY et al, 2007).

Acredita-se que a infecção crônica por este microorganismo leve a produção de células T anti *H. pylori*, as quais, ativam uma população policlonal de células B ao secretarem fatores solúveis. Com o decorrer do tempo, surge uma população proliferante de células B monoclonais dependentes de células T, e quando o estímulo antigênico de células T é removido por antimicrobianos, a população proliferante de células B monoclonais desaparece, porém as células B em proliferação acumulam mutações e tornam-se independentes das células T (COTRAN et al, 2000; MOBLEY et al, 2001).

Desde o reconhecimento da associação entre *Helicobacter pylori* e diversas afecções, sobretudo gastrointestinais, as indicações de seu tratamento têm sido ampliadas (MARSHALL & WARREN, 1984; CURRENT EUROPEAN, 1997; MALFERTHEINER et al, 2002).

Atualmente, além da úlcera gastroduodenal, recomenda-se a erradicação do microorganismo em outras condições, como no linfoma “tecido linfóide associado à mucosa” (MALT gástrico), em familiares de primeiro grau de portadores de câncer gástrico e na anemia ferropriva de etiologia obscura, entre outras (MALFERTHEINER et al, 2007).

Embora o *Helicobacter pylori* seja sensível “in vitro” a vários antimicrobianos e a supressão temporária do microrganismo ocorra facilmente ao final do tratamento, a erradicação definitiva, ou seja, a sua ausência em exames realizados pelo menos um mês após o final do tratamento não é facilmente obtida (GERRITS et al, 2006).

Ainda não há nenhuma terapia por antimicrobianos 100% eficaz para o tratamento de infecções gástricas por *H. pylori*. O que existe são protocolos de tratamento que utilizam simultaneamente: antimicrobianos com espectro de ação para *H. pylori*, inibidores de bomba de prótons (IBP) e inibidores de urease. Porém, tais protocolos de tratamento não são efetivos para todos os casos (BRUNTON et al, 2006; MURRAY et al, 2007; SIQUEIRA et al, 2007).

Como a sensibilidade microbiana varia com a localidade geográfica, raça e uso prévio desses medicamentos, a eficácia de um esquema de tratamento em uma comunidade não permite a generalização dos resultados. O ideal é fundamentar o tratamento em estudos de sensibilidade ou, pelo menos, no conhecimento prévio do índice de resistência microbiana (GRAHAM, 1998; HAN, 1999; BRUNTON et al, 2006; MURRAY et al, 2007; SIQUEIRA et al, 2007).

Entre os fatores que parecem contribuir para o insucesso da terapêutica anti-*H. pylori*, estão aqueles relacionados ao regime formulado, à resistência antimicrobiana (especialmente relacionada com a claritromicina e imidazólicos), à falta de adesão ao tratamento, a fatores geográficos e à dose de inibidor de bomba de prótons empregada (MÉGRAUD, 2001; VALLVE et al, 2002; WERMEILLE et al, 2002; MALFERTHEINER et al, 2003).

A terapia com um único antimicrobiano habitualmente leva ao insucesso, os esquemas antimicrobianos duplos inicialmente testados em pediatria apresentavam a duração mínima de quatro semanas e incluíam a associação de bismuto com amoxicilina (ou ampicilina) ou amoxicilina com tinidazol (KIM et al, 2003).

No ambiente hospitalar, onde há considerável percentual de cepas resistentes a agentes imidazólicos, é provável que um esquema duplo que inclua tais fármacos, não seja eficiente. Desde 1989, tem-se utilizado uma associação de amoxicilina (50 mg/kg/dia), metronidazol (20 a 30 mg/kg/dia) e furazolidona (6 a 8 mg/kg/dia), em 3 doses diárias, durante 7 dias, com controle de 84% dos casos. Entretanto, o percentual de efeitos colaterais é significativo (LIND et al, 1999; HARRIS & MISIEWICZ, 2001).

A melhor estratégia terapêutica consiste na utilização de um antissecretor, usualmente um inibidor de bomba de prótons (IBP), associado a dois antibacterianos por um período de 07 a 14 dias. A associação de IBP aos antimicrobianos atua de maneira sinérgica, potencializando os efeitos bactericidas do regime (LIND et al, 1999). Apresentando índices de erradicação consistentemente superiores a 80% (MALFERTHEINER et al, 2002; COELHO & ZATERKA, 2005; MALFERTHEINER et al, 2007).

Como regra, o primeiro regime anti-*Helicobacter pylori* é o que oferece a maior possibilidade de erradicar a infecção. Porém, a falência desses esquemas ocorre em 15 a 20% dos casos, determinando a necessidade de re-tratamento (CHEY & WONG, 2007).

Como segunda linha de tratamento da infecção pelo *H. pylori* recomenda-se a utilização de terapia quádrupla, por no mínimo 07 dias, associando um inibidor de bomba protônica (IBP), subcitrato/subsalicilato de bismuto coloidal, metronidazol e tetraciclina (MALFERTHEINER et al, 2002; MALFERTHEINER et al, 2007).

Recentes modificações no esquema quádruplo com emprego dos fármacos em duas doses diárias, sem comprometimento da eficácia, facilitaram a posologia e favoreceram a adesão ao tratamento (GRAHAM et al, 2004).

Atualmente, vem sendo utilizada a associação de um inibidor da bomba de prótons (omeprazol 20 mg, lansoprazol 30 mg, pantoprazol 40 mg, rabeprazol 20 mg) com amoxicilina 1000 mg e claritromicina 500 mg. Este esquema triplo têm sido mais eficaz que o quadruplo (KATE & ANANTHAKRISHNAN, 2001; SILVA et al, 2004; KOROLKOVAS, 2007).

GRAHAM (2000) recomenda o seguinte esquema de terapia quádrupla: um inibidor de bomba de prótons (2 vezes ao dia) + 500mg de tetraciclina (4 vezes ao dia) + subsalicilato ou subcitrato de Bismuto (4 vezes ao dia) + 500mg de metronidazol (3 vezes ao dia).

Em geral, a eficácia dos regimes de segunda linha varia entre 70 e 80%. Assim, estima-se que 5 a 20% dos pacientes permaneçam infectados após dois cursos de tratamento (GISBERT & PAJARES, 2002).

Os pacientes ainda infectados após regimes terapêuticos incluindo macrolídeos e nitroimidazólicos desenvolvem, com frequência, resistência a pelo menos um desses antibióticos (MÉGRAUD, 2004).

O tratamento convencional com agentes anti-secretórios (bloqueadores H₂ e antiácidos) ou protetores de mucosa, assim como as medidas aplicadas a pura redução do estresse (farmacológicas e psicanalíticas), são ambos efetivos e seguros para a resolução da úlcera péptica comum. O *H. pylori* é, provavelmente, responsável pelas formas avançadas e recidivantes de gastrite, resistentes à terapêutica convencional, sendo aconselhável a sua erradicação nestes casos (SILVA, 2006).

É importante frisar que o sucesso da erradicação de *H. pylori* não depende apenas da susceptibilidade da linhagem bacteriana ao antimicrobiano utilizado na terapia, mas este é um dos principais fatores, especialmente se considerarmos

pacientes infectados com linhagens sensíveis ao antimicrobiano (SIQUEIRA et al, 2007).

Vários autores relacionam as principais classes terapêuticas utilizadas no controle do *Helicobacter pylori*.

Os **antimicrobianos** com espectro de ação para *H. pylori*, são: amoxicilina, azitromicina, cefdinir, claritromicina, , furazolidona, metronidazol, tetraciclina e tinidazol (YOKOYA et al, 1993; ADAMEK et al, 1996; GABRYELEWICZ et al, 1997; SVOBODA et al, 1997; GSCHWANTLER et al, 1998; O'CONNOR et al, 1998; TREVISANI et al, 1998; NISHIKAWA et al, 1999; XIAO et al, 1999; GISBERT et al, 2001; HSU et al, 2001; BRUNTON et al, 2006; SILVA, 2006; KOROLKOVAS, 2007; MURRAY et al, 2007).

Os **inibidores de bomba de prótons** que podem ser utilizados na farmacoterapia da infecção por *H. pylori*, são: omeprazol, pantoprazol, lansoprazol, rabeprazol, subsalicilato ou subcitrato de Bismuto e YJA20379 (TSUCHIYA et al, 1995; ADAMEK et al, 1996; GABRYELEWICZ et al, 1997; SVOBODA et al, 1997; WOO et al, 1998; XIAO et al, 1999; GISBERT et al, 2001; HSU et al, 2001; PARK et al, 2001; RAFFIN et al, 2006; SILVA, 2006; KOROLKOVAS, 2007).

Os **antagonistas de receptor H₂** que podem ser utilizados na farmacoterapia da infecção por *H. pylori*, são: famotidina e ranitidina (SILVA, 2006; KOROLKOVAS, 2007).

Os **inibidores de urease** em fase de estudo clínico para o tratamento de infecções por *Helicobacter pylori*, são: derivados do ácido hidroxâmico, ácido acetohidroxâmico, flurofamida (FFA), ecabet sodium e rabeprazol (SMOOT et al, 1990; SUZUKI et al, 1992; PHILLIPS et al, 1993; ODAKE et al, 1994; KUHNER et al, 1995; TSUCHIYA et al, 1995; ITO et al, 1998; WOO et al, 1998; OHTA et al, 2001; PARK et al, 2001).

1.4 Resistência bacteriana.

É importante relatar ainda sobre a resistência bacteriana, pois 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 o aumento de dose do antimicrobiano, 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 do microorganismo já é tão eficiente, que sobrepuja o aumento de dose (BRUNTON et al, 2006; MURRAY et al, 2007).

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; MIMS et al, 2005).

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 do antimicrobiano. (ROITT et al, 1999; TRABULSI et al, 2000; NESTER et al, 2001; MIMS et al, 2005).

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; MIMS et al, 2005).

A resistência adquirida é um fenômeno casual da bactéria, onde o antimicrobiano funciona como seletor das cepas resistentes. Tal resistência é decorrente de uma alteração genotípica, expressa durante o seu metabolismo (figura 16) e que pode ser de natureza cromossômica (figura 17) ou plasmidial (figuras 17 e 18) (JENSEN et al, 1997; TRABULSI et al, 2000; NESTER et al, 2001; TORTORA et al, 2002).

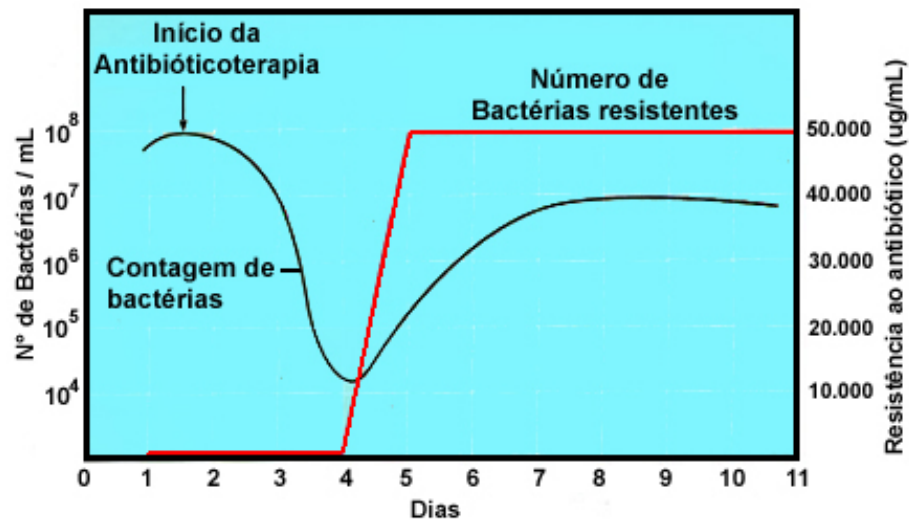


Figura 16. Seleção de mutantes resistentes a um antibiótico durante a terapia antimicrobiana.

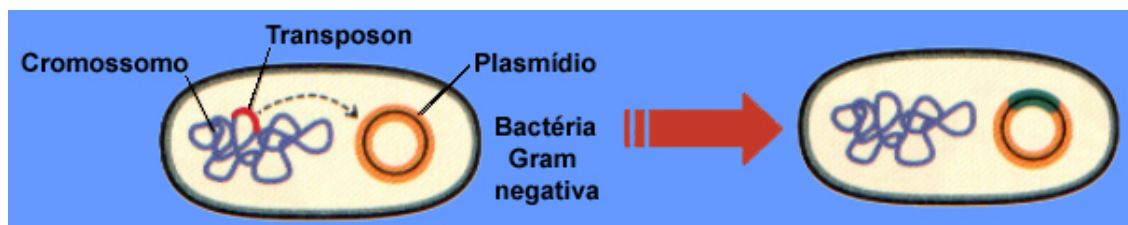


Figura 17. Representação esquemática da migração do gene de resistência bacteriana do Cromossomo para o Plasmídeo.

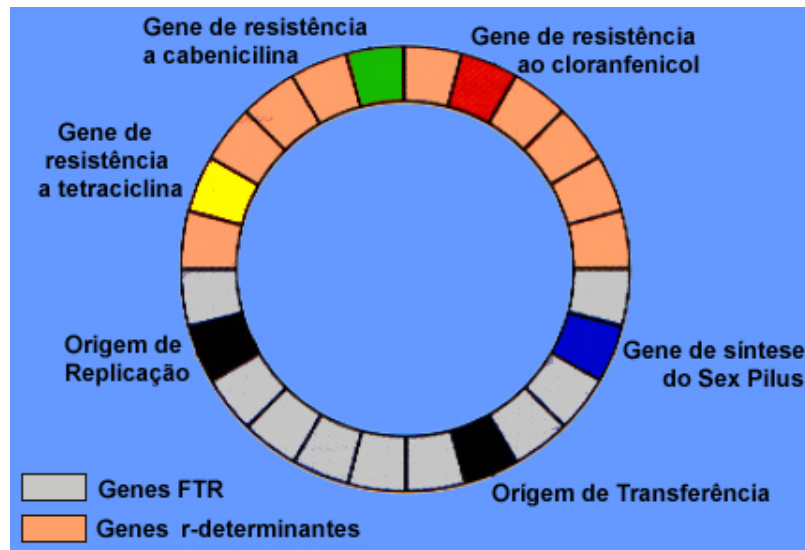


Figura 18. Representação esquemática de um Plasmídeo contendo genes de resistência bacteriana.

As mutações cromossômicas e aquisição de plasmídios (figura 18), podem dar origem a uma bactéria resistente por diversos mecanismos, como por exemplo (figura 19) (BARON, 1991; JENSEN et al, 1997; ROITT et al, 1999; TRABULSI et al, 2000; ALCAMO, 2001; TORTORA et al, 2002; MIMS et al, 2005):

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.

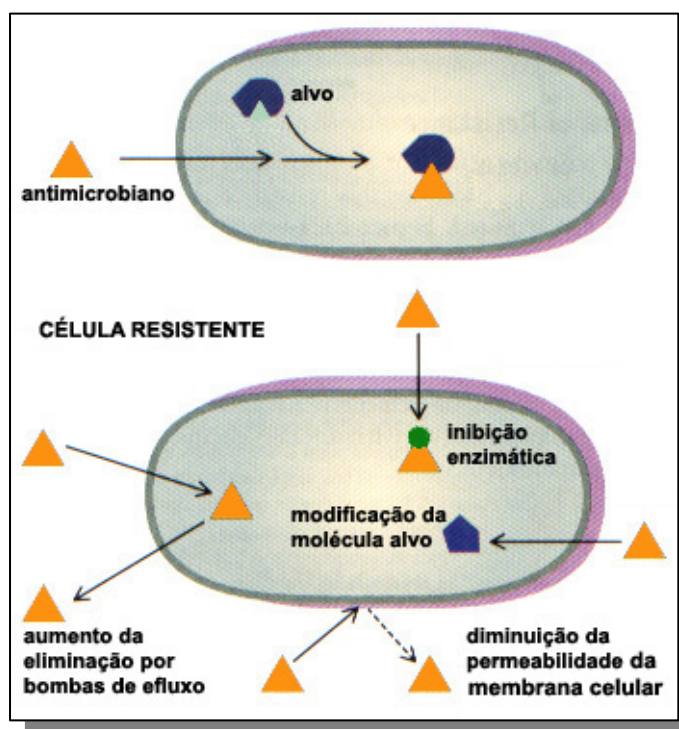


Figura 19. Representação esquemática dos mecanismos comuns de resistência bacteriana a antimicrobianos.

BRUNTON e colaboradores (2006) citam que a resistência ao metronidazol, pode ser explicada por 2 processos:

- 1º ⇒ pela alta concentração local de O_2 ;
- 2º ⇒ 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.

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*, provavelmente pelo uso excessivo odontológico e ginecológico, ocorre em função de mutações tipo frameship (alterações no quadro de leitura), que podem ser induzidas por inserções ou deleções no gene **rdxA** que codifica para a proteína **RdxA** a qual 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 (JEONG et al, 2000; MCATEE et al, 2001; MOBLEY et al, 2001; VAN et al, 2001; FANG et al, 2002; 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 (JEONG et al, 2000; MCATEE et al, 2001; MOBLEY et al, 2001; JENKS & EDWARDS, 2002).

1.5 Referências.

ADAMEK et al, R.J. et al. Cure of *Helicobacter pylori* infection: role of duration of treatment with omeprazole and amoxicillin. **Am. J. Gastroenterol.** v.91, n.1, p. 98-100.

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

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

BARRY, C.E. et al. 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.** v.511, p. 133–144, 2002.

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

BROWN, L.M.. **Epidemiol Rev.** v.22, n.2, p. 283-97, 2000.

BRUNTON, L.L; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 11 ed. Rio de Janeiro: McGaw-Hill, 2006. p. 9950 e 880.

BRZOZOWSKI, T. et al. Mucosal irritation, adaptive cytoprotection, and adaptation to topical ammonia in the rat stomach. **Scand. J. Gastroenterol.** v.31, n.9, p. 837-46, 1996.

BUNDGAARD, H. **Prodrug design.** Amsterdam: Elsevier, p. 360, 1985.

CHEY, W.D.; WONG, B.C. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. American College of Gastroenterology Guideline on

the Management of *Helicobacter pylori* Infection. **Am J Gastroenterol**; v.102, n. 8, p.1808-25, 2007.

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

CHO, M.J. et al. Metronidazole Phosphate: A water soluble prodrug for parenteral solutions of metronidazole. **J. of Pharmaceutical Sciences**. v.71, n.4, p. 410 – 414, 1982.

CHUNG, M-C. et al. **Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 41, n. 2, p. 155-179, 2005.

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

COELHO, L.G.V.; ZATERKA, S. Federação Brasileira de Gastroenterologia e Núcleo Brasileiro para o Estudo de *Helicobacter*. Second Brazilian Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection. **Arq Gastroenterol**; v.42, n.2, p.128-32, 2005.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 283 e 708 - 721.

CURRENT EUROPEAN Concepts IN THE MANAGEMENT OF *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION. The Maastricht Consensus Report. European *Helicobacter Pylori* Study Group. **Gut**; v.41, n.1, p.8-13, 1997.

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

FANG, H. et al. New findings in beta-lactam and metronidazole resistant *Bacteroides fragilis* group. **Int. J. Antimicrob. Agents**. v.19, n.5, p. 361-70, 2002.

GABRYELEWICZ, A. et al. Multicenter evaluation of dual-therapy (omeprazol and amoxicillin) for *Helicobacter pylori*-associated duodenal and gastric ulcer (two years of the observation). **J. Physiol. Pharmacol**. v.48, n.4, p. 93-105, 1997.

GERRITS, M.M. et al. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. **Lancet. Infect. Dis.** v.6, n.11, p.699-709, 2006.

GISBERT, J.P. et al. High efficacy of ranitidine bismuth citrate, amoxicillin, clarithromycin and metronidazole twice daily for only five days in *Helicobacter pylori* Eradication. **Helicobacter.** v.6, n.2, p. 157-162, 2001

GISBERT, J.P.; PAJARES, J.M. *Helicobacter pylori* 'rescue' regimen when proton pump inhibitor-based triple therapies fail. **Aliment Pharmacol. Ther.;** v.16, n.6, p.1047-57, 2002.

GRAHAM, D.Y. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implication for therapy. **Gastroenterology.** v.115, p. 1272-7, 1998.

GRAHAM, D.Y. et al. Twice daily (mid-day and evening) quadruple therapy for *H. pylori* infection in the United States. **Dig Liver Dis;** v.36, n.6, p.384-7, 2004.

GRAHAM, D.Y. Therapy of *Helicobacter pylori*: current status and issues. **Gastroenterology;** v.118, S2-8, 2000.

GSCHWANTLER, M. et al. Eradication of *Helicobacter pylori* by a 1-week course of famotidine, amoxicillin and clarithromycin. **Eur J Gastroenterol Hepatol.** v.10, n.7, p. 579-82, 1998.

HARRIS, A; MISIEWICZ, J.J. Management of *Helicobacter pylori* infection. **Brit. Med. J.** v.323, p.1047-1049, 2001.

HSU, C.C. et al. Famotidine Versus Omeprazole, in combination with Amoxicillin and Tinidazole, for eradication of *Helicobacter pylori* infection. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.** v.13, n.8, p.921-926, 2001.

IFHII: About *Helicobacter pylori*. International Foundation for Helicobacter and Intestinal Immunology 1997.

IIZAWA, Y. et al. In vitro antimicrobial activity of T-91825, a novel anti-MRSA cephalosporin, and in vivo anti-MRSA activity of its prodrug, TAK-599. **J. Infect. Chemother.** v.10, n.3, p. 146-56, 2004.

ISODA, T. et al. Syntheses and pharmacokinetic studies of prodrug esters for the development of oral carbapenem, L-084. **J. Antibiot. (Tokyo)**. v.59, n.4, p. 241-7, 2006.

ITO, Y. et al. Ecabet sodium, a locally acting antiulcer drug, inhibits urease activity of *Helicobacter pylori*. **Eur. J. Pharmacol.** v.345, n.2, p.193-8, 1998.

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

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

JEONG, J.Y. et al. Sequential inactivation of rdxA (HP0954) and frxA (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **J. Bacteriol.**;182(18):5082-90, 2000.

KATE, V; ANANTHAKRISHNAN, N. Treatment of *Helicobacter pylori* infection- a review. **Indian J. of Pharmacology**. 33: 410-416, 2001.

KIM, J.J; KIM, J.G; KWON, D.H. Mixed-infection of antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolated in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing. **Helicobacter**. v.8, n. 202-6, 2003.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara 2007/2008**. 14 ed. Guanabara Koogan, 2007. p.644.

KOROLKOVAS, A. **Essentials of Medicinal Chemistry**. 2 ed. New York: Wiley, 1988. p. 97 – 104.

KUHLER, T.C. et al. Structure-activity relationship of omeprazole and analogues as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. **J. Med. Chem.** v.38, n.25, p. 4906-16, 1995.

LACY, B.E; ROSEMORE, J. **J. Nutr.** v.131, n.10, p.2789S-2793S, 2001.

LAND, K. M; JOHNSON, P.J. Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacteria and protozoa. **Drug Resistance Updates**. n.2. p. 289–294, 1999.

LIND, T. et al. The MACH2 study: role of omeprazole in eradication of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. **Gastroenterology**. v.116, n.2, p.248-53, 1999.

MAHFOUZ, N.M; FADL, T.A; DIAB; A.K. Metronidazole twin ester prodrugs: synthesis, physicochemical properties, hydrolysis kinetics and anti-giardial activity. **Euro J. of Medical Chemistry**. v.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. **J. of Pharmacy and Pharmacology**. v.53. p. 841-848, 2001.

MALFERTHEINER, P. et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection – The Maastricht III Consensus Report. **Gut**. v.56, n.6, p.772-81, 2007.

MALFERTHEINER, P. et al. European *Helicobacter pylori* study group (EHPSG). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht 2-2000 Consensus report. **Aliment Pharmacol Ther**; v.16, n.2, p.167-80, 2002.

MALFERTHEINER, P; PEITZ, U; TREIBER, G. What constitutes failure for *Helicobacter pylori* eradication therapy? **Can. J. Gastroenterol.**; v.17 (Suppl B), p.53-57, 2003.

MARSHALL, B.J; WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**. v.1, n.8390, p.1311-5, 1984.

MATSUKURA, N; ONDA, M; YAMASHITA, K. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer and gastric cancer. **Gan To Kagaku Ryoho**. v.22, n.2, p. 169-78, 1995.

MCATEE, C.P; HOFFMAN, P.S; BERG, D.E. Identification of differentially regulated proteins in metronidazole resistant *Helicobacter pylori* by proteome techniques. **Proteomics**. v.1, n.4, p. 516-21, 2001.

MEGRAUD, F; NEMAN-SIMHA, V; BRUGMANN, D. Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter pylori* urease on human epithelial cells. **Infect Immun.** v.60, n.5, p.1858-63, 1992.

MÉGRAUD, F. et al. *Helicobacter pylori* resistance to antimicrobial agents after failure of an initial treatment and impact on results of second-line treatment strategies: A multicenter prospective study. **Gastroenterol;** v.120(supl.1), p.A15, 2001.

MÉGRAUD, F. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. **Gut.** v.53, n.9, p.1374-84, 2004.

MENÉNDEZA, D. et al. DNA breakage due to metronidazole treatment. **Mutation Research.** v.478. p. 153–158, 2001.

MIMS, C. et al. **Microbiologia Médica.** 3ed. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2005. p. 212 e 315.

MITANI-EHARA, S. Studies on gastric mucosal cell injury induced by *Helicobacter pylori*. **Hokkaido Igaku Zasshi.** v.69, n.4, p.836-46, 1994.

MITANI-EHARA, S. et al. Studies on gastric mucosal cell injury induced by *Helicobacter pylori*. **J. Clin. Gastroenterol.** v.25, p. S164-8, 1997.

MOBLEY, H.L.T; MENDZ, G.L; HAZELL, S.L. ***Helicobacter pylori*: physiology and genetics.** Washington: ASM Press, 2001. p. 03-91 e 459-530.

MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology.** 7 ed. Washington: ASM Press, 1999. p.1492 e 1656.

MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology.** 9ed. v.1, 2007. p. 947-956.

NESTER, E.W. et al. **Microbiology: A Human Perspective.** 3ed. Boston: Mc Graw Hill, 2001. p. 70, 191, 208, 211 – 216, 498, 499 e 509 – 511.

NISHIKAWA, K. et al. Eradication of *Helicobacter pylori* using 30 mg or 60 mg lansoprazole combined with amoxicillin and metronidazole: one and two weeks of a new triple therapy. **J. Gastroenterol.** v.34, n.11, p.72-5, 1999.

O'CONNOR, H.J. et al. Lansoprazole triple therapy for *Helicobacter pylori*-is 5 days enough? **Aliment. Pharmacol. Ther.** v.12, n.3, p.273-6, 1998.

ODAKE, S. et al. Inhibition of *Helicobacter pylori* urease activity by hydroxamic acid derivatives. **Biol. Pharm. Bull.** v.17, n.10, p.1329-32, 1994.

OHTA, T. et al. Marked reduction of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by urease inhibitors, acetohydroxamic acid and flurofamide, in Mongolian gerbils. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.285, n.3, p.728-33, 2001.

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

PARK, I.S. et al. **Yonsei Med. J.** v.42, n.4, p.457-70, 2001.

PERMENTIER, D. et al. Syntesys of dipeptide ester of metronidazole and evaluation of their hidrolytic stability. **Bull. Soc. Chim. Belg.** v.101, n.8, p.701 – 707, 1992.

PHILLIPS, K. et al. Antibacterial action of the urease inhibitor acetohydroxamic acid on *Helicobacter pylori*. **J. Clin. Pathol.** v.46, n.4, p.372-3, 1993.

POUNDER, R.E. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v.9, s.2, p. 33-39, 1995.

RAFFIN, R.P. et al. Sodium pantoprazole-loaded enteric microparticles prepared by spray drying: effect of the scale of production and process validation. **Int. J. Pharm.** v.324, n.1, p.10-8, 2006.

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. et al. **Microbiologia Médica.** 2 ed. São Paulo: Manole, 1999. 259, 268, 413, 414, 429 e 528 p.

SALLES, J.M.C; SALLES, M.J.C. **Antimicrobianos: Quando indicar, como Usar**. Belém: Editora da UFPA, 2000. p. 448 e 449.

SÁNCHEZ, J.S. Resistance to antibiotics. **Rev. Latinoam. Microbiol.** v.48, n.2, p.105-12, 2006.

SILVA, L.B.L. et al. Atenção farmacêutica a pacientes com gastrite *Helicobacter pylori* positivo. **Infarma.** v.16, n.7/8, p.70-73, 2004.

SILVA, A.T.A. et al. Advances in Prodrug Design. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.** v.5, n.10, p.893-914, 2005.

SILVA, P. **Farmacologia.** 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 886, 1036 – 1039 e 1094.

SIQUEIRA, J.S.; et al. Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori* – Revisão. **RBAC.** v.39, n.1, p.9-13, 2007.

SISSON, G. et al. Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanide, nitrofurans, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.46, n.7, p.2116-23, 2002.

SISSON, G. et al. Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in *Helicobacter pylori* and in *Escherichia coli* containing a cloned H. pylori RdxA(+) (Nitroreductase) gene. **J. Bacteriol.** v.182, n.18, p. 5091-6, 2000.

SMOOT, D.T. et al. *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. **Infect Immun.** v.58, n.6, p.1992-4, 1990.

SUZUKI, H. et al. *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. **Am. J. Physiol.** v.263, p. G719-25, 1992.

SVOBODA, P. et al. Pantoprazole-based dual and triple therapy for the eradication of *Helicobacter pylori* infection: a randomized controlled trial. **Hepatogastroenterology.** v.44, n.15, p.886-90, 1997.

TANI, M. et al. Inhibitory activity of NM394, the active form of prodrug prulifloxacin against type II topoisomerase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Jpn. J. Antibiot.** v.55, n.6, p. 882-5, 2002.

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

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 et al, L.R. et al. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 92, 97, 103 – 109, 266 e 291.

TREVISANI, L. et al. Evaluation of a new ultrashort triple therapy for *Helicobacter pylori* disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v.12, n.12, p.1269-72, 1998.

TSUCHIYA, M. et al. *Helicobacter pylori* urease inhibition by rabeprazole, a proton pump inhibitor. **Biol Pharm Bull.** v.18, n.8, p.1053-6, 1995.

USP DI: Drug Information for the Health Care Professional. 19 ed. v1. Massachusetts: Micromedex, 1999. p. 1996, 1997 e 2002.

VALLVE, M. et al. Single vs. Double dose of proton pump inhibitor in triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: A meta-analysis. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v.16, n.6, p.1149-56, 2002.

VAN, D.W.E.J. et al. Mechanism and clinical significance of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **Scand J. Gastroenterol Suppl.** v.234, p.10-4, 2001.

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

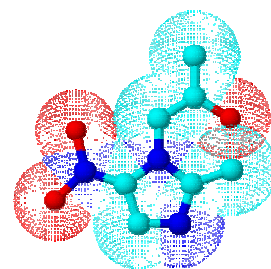
WERMEILLE, J. et al. Failure of *Helicobacter pylori* eradication: is poor compliance the main cause? **Gastroenterol. Clin. Biol.** v.26, n.3, p.216-9, 2002.

WOO, T.W. et al. Inhibitory action of YJA20379, a new proton pump inhibitor on *Helicobacter pylori* growth and urease. **Arch. Pharm. Res.** v.21, n.1, p.6-11 p. 1998.

XIAO, S.D. et al. High cure rate of *Helicobacter pylori* infection using tripotassium dicitrato bismuthate, furazolidone and clarithromycin triple therapy for 1 week. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v.13, n.3, p.311-5, 1999.

YOKOYA, Y; IKEDA, F; MINE, Y. Antibacterial activity of cefdinir and omeprazole against *Helicobacter pylori* and their inhibition on H. pylori-producing urease. **Kansenshogaku Zasshi.** v.67, n.9, p.808-15, 1993.

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



Capítulo 2

Objetivos

Neste capítulo são apresentados os objetivos fundamentais desta tese de doutorado, envolvendo o processo de latenciação no desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos potencialmente ativos contra o *Helicobacter pylori*.

2. OBJETIVOS

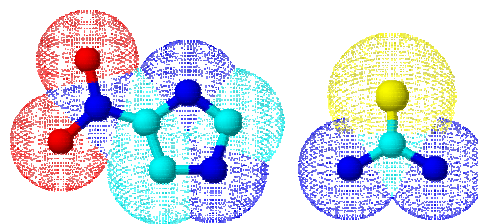
2.1 Objetivo Geral.

Modificar a estrutura do metronidazol, secnidazol, e tiouréia a fim de obter derivados com atividade contra o *Helicobacter pylori*.

2.2 Objetivos Específicos.

- Obtenção de compostos derivados de metronidazol, secnidazol e tiouréia;
- Padronização de metodologia “in vitro” e “in vivo” para avaliação de atividade dos derivados de metronidazol, secnidazol e tiouréia contra *Helicobacter pylori*.

Capítulo 3



Processo de obtenção dos compostos derivados de nitroimidazóis e tiouréia.

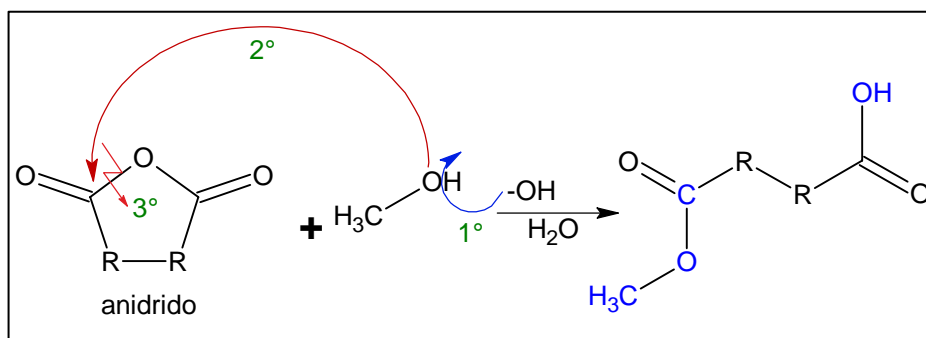
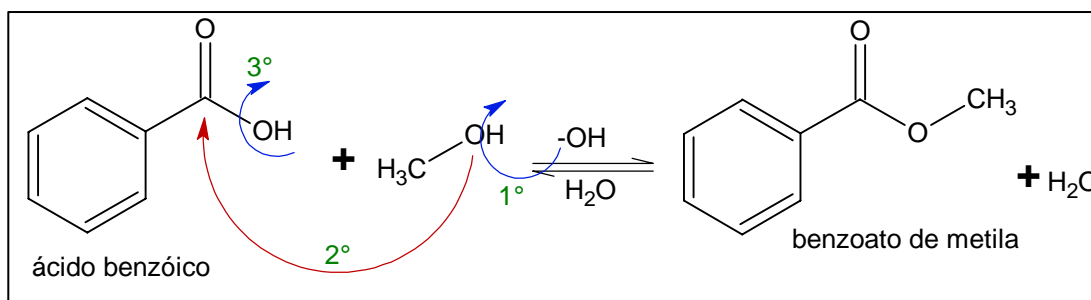
Neste capítulo são apresentadas e discutidas as metodologias de síntese, e a identificação estrutural dos compostos derivados de metronidazol, secnidazol e tiouréia.

Os compostos foram sintetizados no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos (*Lapdesf*), do Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCF-Unesp-Araraquara.

3. PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS DERIVADOS DE NITROIMIDAZÓIS E TIOURÉIA

3.1 Metodologias de síntese.

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

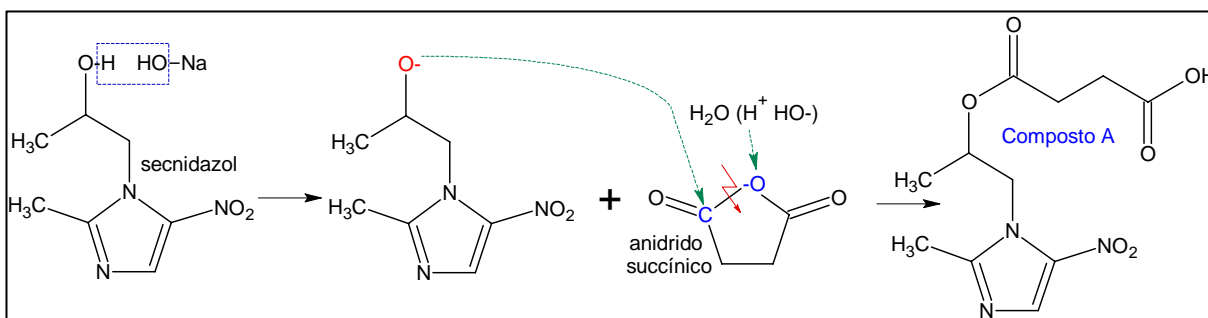


Em geral, o rendimento da reação de esterificação aumenta pelo(a):

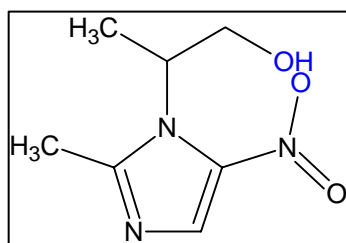
- Remoção de água da mistura reacional a medida que a mesma se forma;
- Excesso de ácido carboxílico ou de álcool no meio reacional.

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

O mecanismo de reação para as sínteses propostas (*mostrado a seguir*), baseia-se no fato do NaOH, retirar o H da hidroxila alcoólica do secnidazol ou metronidazol, gerando um alcoolato, o qual ataca a carbonila dos anidridos succínico, diglicólico e glutárico, originando assim os compostos propostos.



Outro motivo para que esta reação se processe em meio alcalino, 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 quantidade de base adicionada ao meio, foi determinada experimentalmente, pela verificação do pH do meio reacional, uma vez que o pH da reação decresce drasticamente logo após a adição dos anidridos e desta forma, dificulta a formação do alcoolato.

O metronidazol e secnidazol utilizados foram cedidos pela empresa E.M.S-SIGMA Pharma, e os demais reagentes foram obtidos dos seguintes fornecedores: tiouréia (Acros), anidrido succínico (Merck), anidrido diglicólico (Aldrich) e anidrido glutárico (Aldrich).

Para a obtenção dos ésteres de metronidazol e secnidazol, reagiu-se os mesmos com anidrido succínico, anidrido diglicólico e anidrido glutárico. Para obtenção de outro éster derivado de tiouréia, reagiu-se o mesmo com anidrido succínico, como apresentado nos esquemas a seguir.

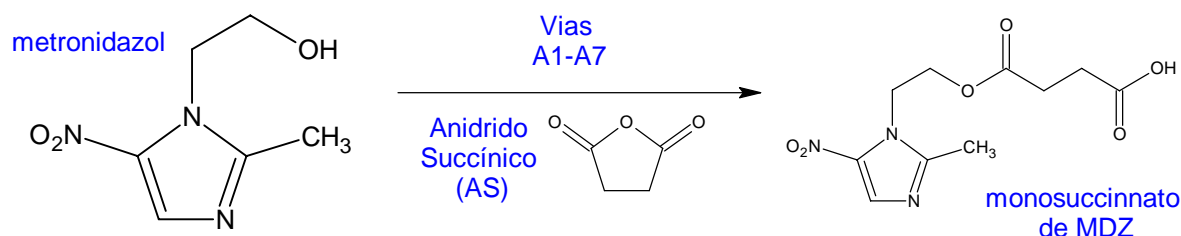


Tabela 1. Resultados gerais das sínteses do monosuccinato de metronidazol.

VIA	Mdz (g)	AS (g)	Solvente (mL)	Catalisador	T°C	Tempo de reação (h)	Produto
A1	3,15	2,0	Metanol (30)	NaOH 2N 2mL	60	2	Não obtido
A2	3,15	2,0	Metanol (30)	NaOH 4N 2mL	60	2	Não obtido
A3	3,15	2,0	Metanol (30)	NaOH 6N 2mL	60	2	Não obtido
A4	3,15	2,0	Metanol (30)	NaOH 8N 2mL	60	2	Não obtido
A5	3,15	2,0	Metanol (30)	NaOH 10N 2mL	60	2	Não obtido
A6	3,15	2,0	Metanol (30)	NaOH 15N 2mL	60	2	Obtido
A7	1,00	0,6	ACN (90)	DMAP 35mg	25°C	48	Obtido

* Rendimento de 94% (A6) e 95% (A7).

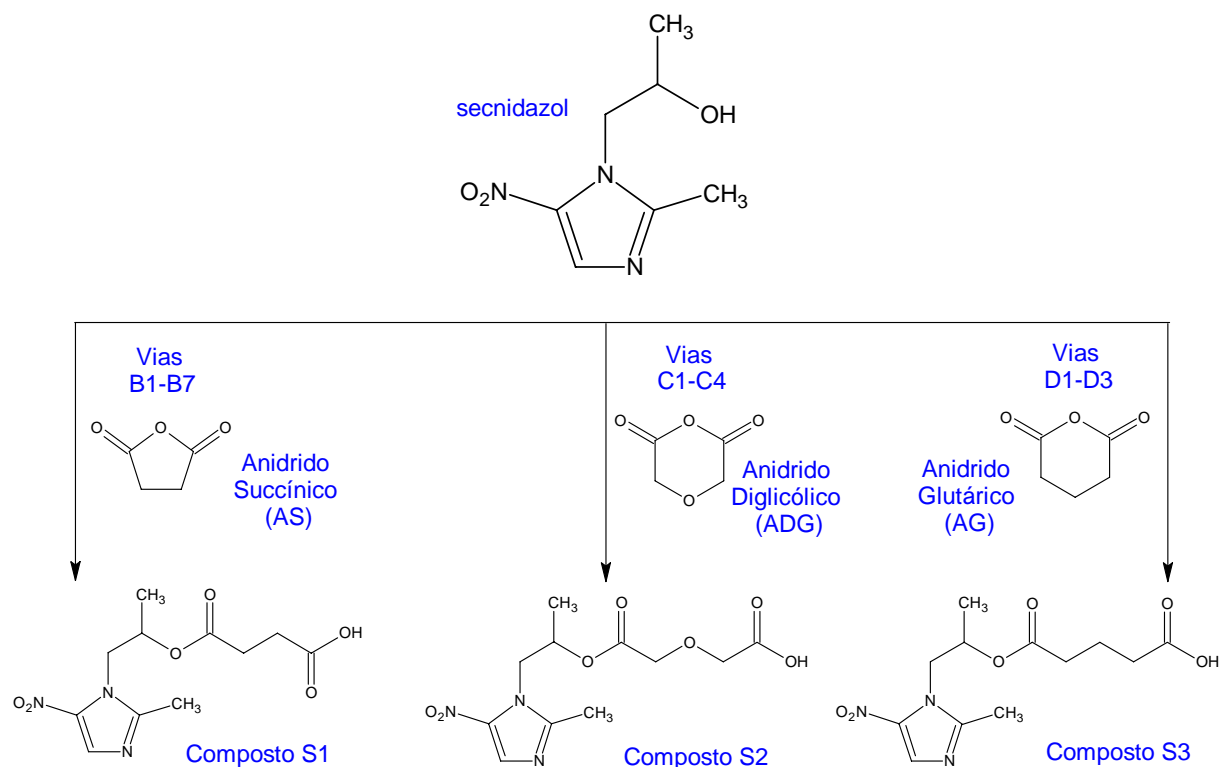


Tabela 2. Resultados gerais da síntese do composto S1.

VIA	Sdz (g)	AS (g)	Solvente (mL)	Catalisador	T °C	Tempo de reação (h)	Produto
B1	1,0	0,5	THF (50)	t-butóxido de K (0,6g)	-10/60	0,5/1	Não obtido
B2	1,0	0,5	THF (50)	t-butóxido de K (0,6g)	-30/60	0,5/1	Não obtido
B3	1,0	0,5	DMF (7,0)	t-butóxido de K (0,6g)	-10/60	0,5/1	Não obtido
B4	1,0	0,5	DMF (7,0)	t-butóxido de K (0,6g)	-30/60	0,5/1	Não obtido
B5	0,3	0,2	Acetonirila (90)	DMAP 0,5g	25	48	Não obtido
B6	3,3	2,0	Metanol (30)	NaOH 10N 2mL	60	2	Não obtido
B7	3,3	2,0	Metanol (30)	NaOH 15N 2mL	60	2	Obtido

* Rendimento de 86%.

Tabela 3. Resultados gerais da síntese do composto S2.

VIA	Sdz (g)	ADG (g)	Solvente (mL)	Catalisador	T°C	Tempo de reação (h)	Produto
C1	0,3	0,2	Acetonirila (90)	DMAP 0,5g	25	48	Não obtido
C2	3,1	2,0	Metanol (30)	NaOH 15N 2mL	60/25	5/19	Não obtido
C3	3,1	2,0	Metanol (60)	NaOH 15N 2mL	60/25	5/19	Não obtido
C4	3,1	2,0	Metanol (100)	NaOH 15N 2mL	60/25	5/19	Obtido

* Rendimento de 96%.

Tabela 4. Resultados gerais da síntese do composto S3.

VIA	Sdz (g)	AG (g)	Solvente (mL)	Catalisador	T°C	Tempo de reação (h)	Produto
D1	0,3	0,2	Acetonirila (90)	DMAP 0,5g	25	48	Não obtido
D2	3,0	2,5	Metanol (30)	NaOH 15N 2mL	25	5	Não obtido
D3	3,0	2,5	Metanol (60)	NaOH 15N 2mL	25	5	Obtido

* Rendimento de 78%.

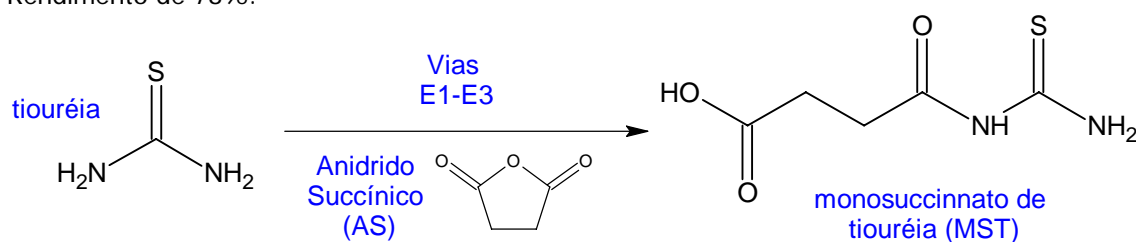


Tabela 5. Resultados gerais da síntese do composto MST.

VIA	TU (g)	AS (g)	Solvente	Catalizador	T°C	Tempo de reação	Produto
E1	0,38	0,5	Isopropanol (20 mL)	nenhum	25	96 h	Não obtido
E2	0,38	0,5	Isopropanol (20 mL)	DMAP (0,3 mmol)	25	96 h	Não obtido
E3	0,76	1,0	---	nenhum	180	25 min	Obtido

* Rendimento de 26%.

3.2 Identificação dos Compostos Matrizes

Antes de se iniciar a síntese dos compostos, procedeu-se a análise espectrométrica dos compostos de partida: metronidazol, secnidazol e tiouréia. Tal identificação foi necessária para comprovação da identidade da matéria prima, além do fato de que tais dados servem como base para interpretação dos espectros dos derivados obtidos.

A faixa de fusão apresentada pelo metronidazol foi de 158 – 160°C, do secnidazol foi de 76 – 78°C, e o da tiouréia foi de 176 – 178°C; todos dentro do estabelecido pela literatura (The Merck Index, 2001).

Nas tabelas 6 e 7, constam todos os valores de absorção no infravermelho e atribuições no RMN H^1 do metronidazol e secnidazol.

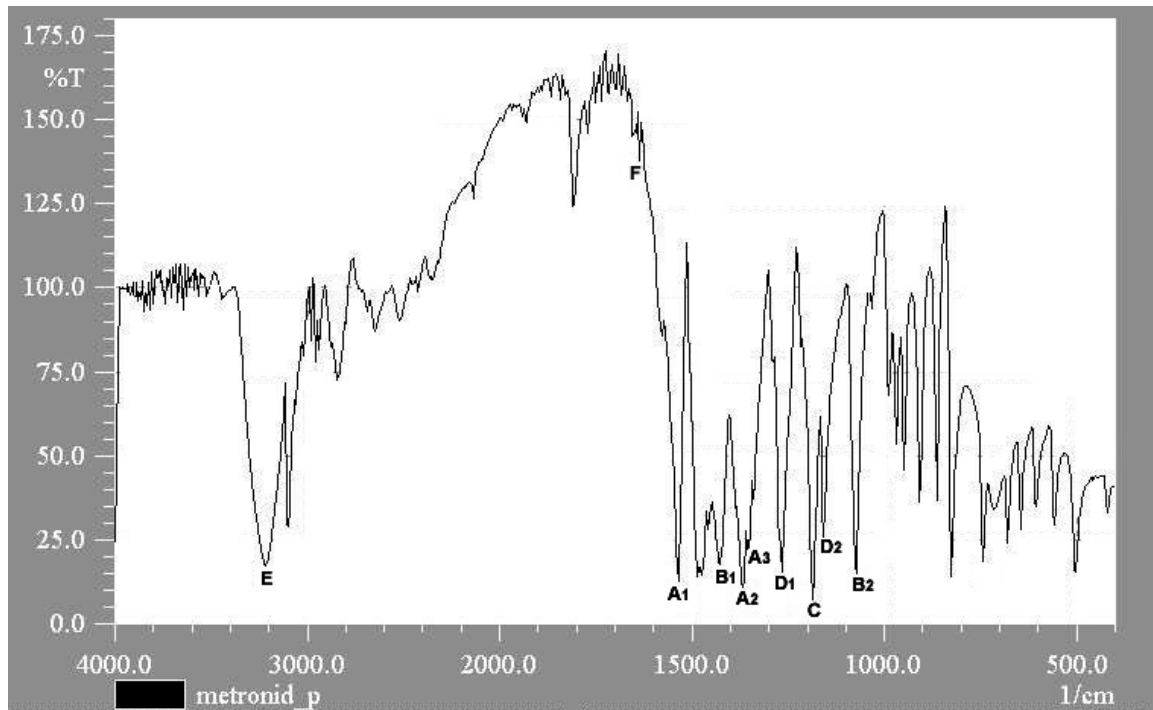
As atribuições dos estiramentos de infravermelho, RMN 1H e RMN ^{13}C , estão fundamentadas segundo dados de SILVERSTAIN (1994) e PAVIA (1996), sendo apresentados nas tabelas 6 a 7 e nos espectros de 1 a 4.

Tabela 6. Bandas de absorção no espectro de infravermelho do metronidazol e do secnidazol (KBr).

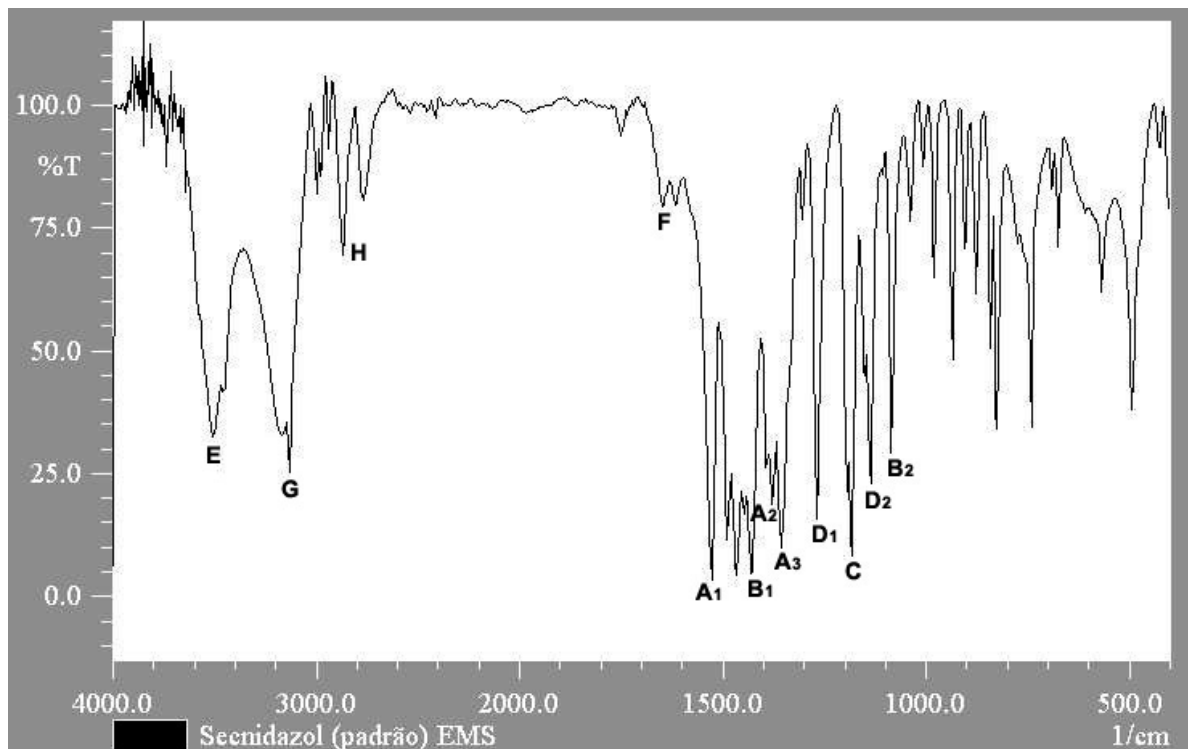
Grupo	Marcador	Metronidazol	Secnidazol
		ν (cm^{-1})	ν (cm^{-1})
NO ₂	A1 e A2	1535 e 1369	1525 e 1379
N=O (R-NO ₂)	A3	1353	1357
C-N (alifático)	B1 e B2	1429 e 1074	1429 e 1085
C-O	C	1188	1184
C-OH (primário)	D1 e D2	1265 e 1159	1269 e 1137
OH	E	3219	3508
C=C ou C=N	F	1652	1647

Tabela 7. Atribuições dos sinais de RMN ^1H em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$ do metronidazol e do secnidazol.

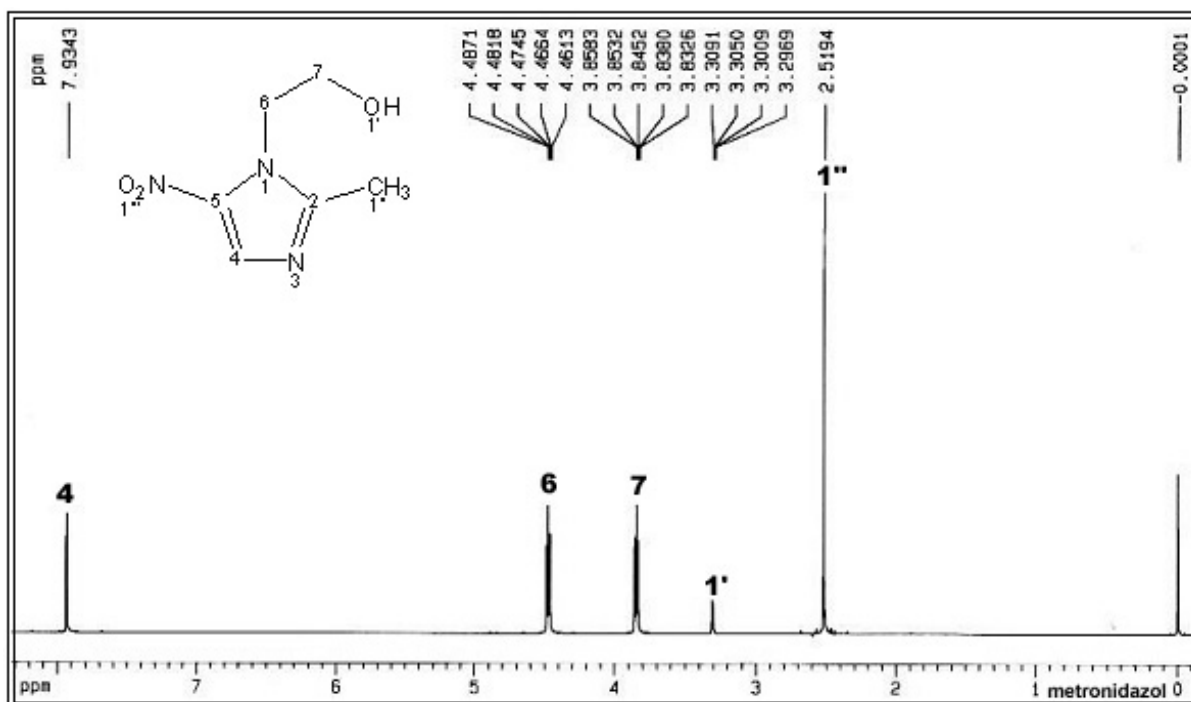
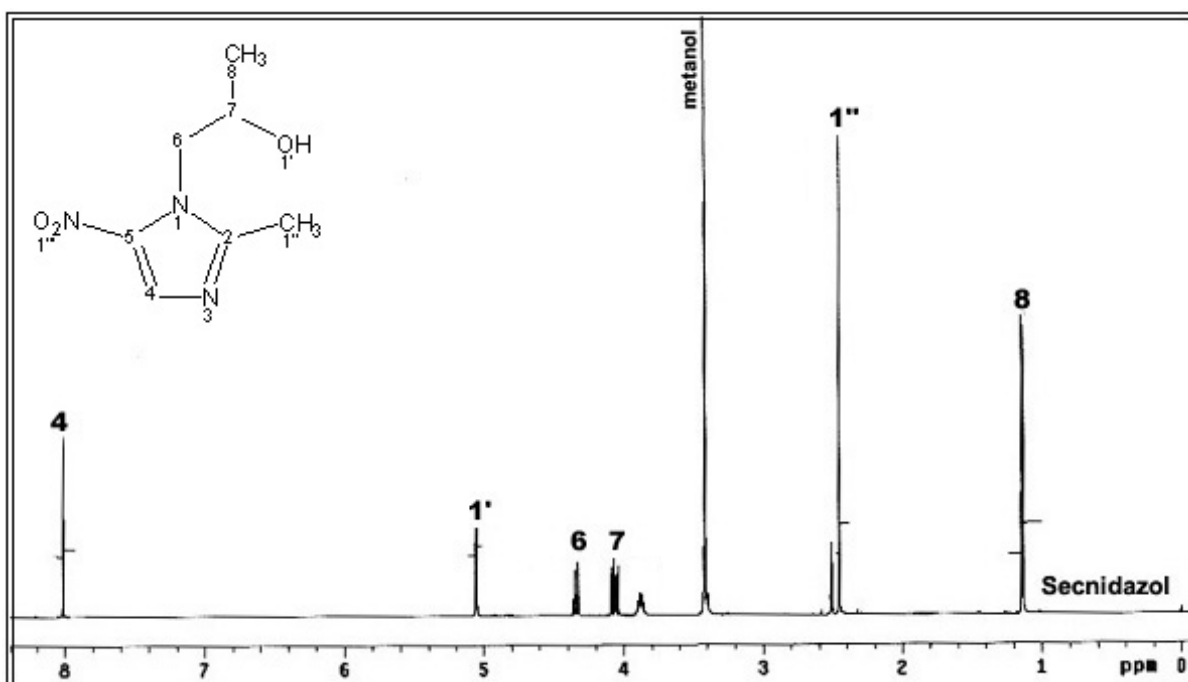
Posição	Metronidazol	Secnidazol
	$\delta ^1\text{H J (Hz)}$	$\delta ^1\text{H J (Hz)}$
4	7,93 s	8,01 s
6	4,47 t (J=2,5)	4,35 m
7	3,84 t (J=2,5)	3,82 m
8	---	1,13 d
1'	3,30 s	5,08 s
1''	2,52 s	2,51 s



Espectro 1. Infravermelho do metronidazol (KBr).



Espectro 2. Infravermelho do secnidazol (KBr).

Espectro 3. RMN ^1H do metronidazol em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.Espectro 4. RMN ^1H do secnidazol em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.

3.3 Identificação dos compostos Monosuccinato de MDZ, S1, S2, S3 e MST

A formação do Monosuccinato de MDZ foi confirmada pelo espectro de infravermelho, pela presença de todos os estiramentos do metronidazol além dos estiramentos de (ν C=O de éster) e (ν C=O de ácido carboxílico); no espectro de RMN de ^1H , pelos deslocamentos químicos δ (ppm) típicos do metronidazol e de mais 2 sinais nas posições 2' e 3' da cadeia lateral; e no espectro de RMN de ^{13}C , pelos deslocamentos químicos δ (ppm) típicos do metronidazol e de mais 4 sinais de $\text{C}_{1'}$, $\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{3'}$ e $\text{C}_{4'}$.

A obtenção do composto (S1) foi confirmada pelo espectro de infravermelho, pela presença dos principais estiramentos do secnidazol além dos estiramentos de (ν C=O de éster) e (C=O de ácido carboxílico); no espectro de RMN ^1H , pelos deslocamentos químicos δ (ppm) típicos do secnidazol e de mais 2 sinais nas posições 2' e 3' da cadeia lateral; e no espectro de RMN de ^{13}C (6), pelos deslocamentos químicos δ (ppm) típicos do secnidazol e de mais 4 sinais de $\text{C}_{1'}$, $\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{3'}$ e $\text{C}_{4'}$.

A obtenção do composto (S2) foi confirmada pelo espectro de infravermelho, pela presença dos principais estiramentos do secnidazol além dos estiramentos de (ν C=O de éster) e (ν C=O de ácido carboxílico); no espectro de RMN ^1H , pelos deslocamentos químicos δ (ppm) típicos do secnidazol e de mais 2 sinais nas posições 2' e 4' da cadeia lateral; e no espectro de RMN de ^{13}C , pelos deslocamentos químicos δ (ppm) típicos do secnidazol e de mais 4 sinais de $\text{C}_{1'}$, $\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{4'}$ e $\text{C}_{5'}$.

A obtenção do composto (S3) foi confirmada pelo espectro de infravermelho, pela presença dos principais estiramentos do secnidazol além dos estiramentos de (ν C=O de éster) e (ν C=O de ácido carboxílico); no espectro de

RMN ^1H (11), pelos deslocamentos químicos δ (ppm) típicos do secnidazol e de mais 3 sinais nas posições 2', 3' e 4' da cadeia lateral; e no espectro de RMN de ^{13}C , foram observados sinais muito fracos de $\text{C}_{1'}$, $\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{4'}$ e $\text{C}_{5'}$.

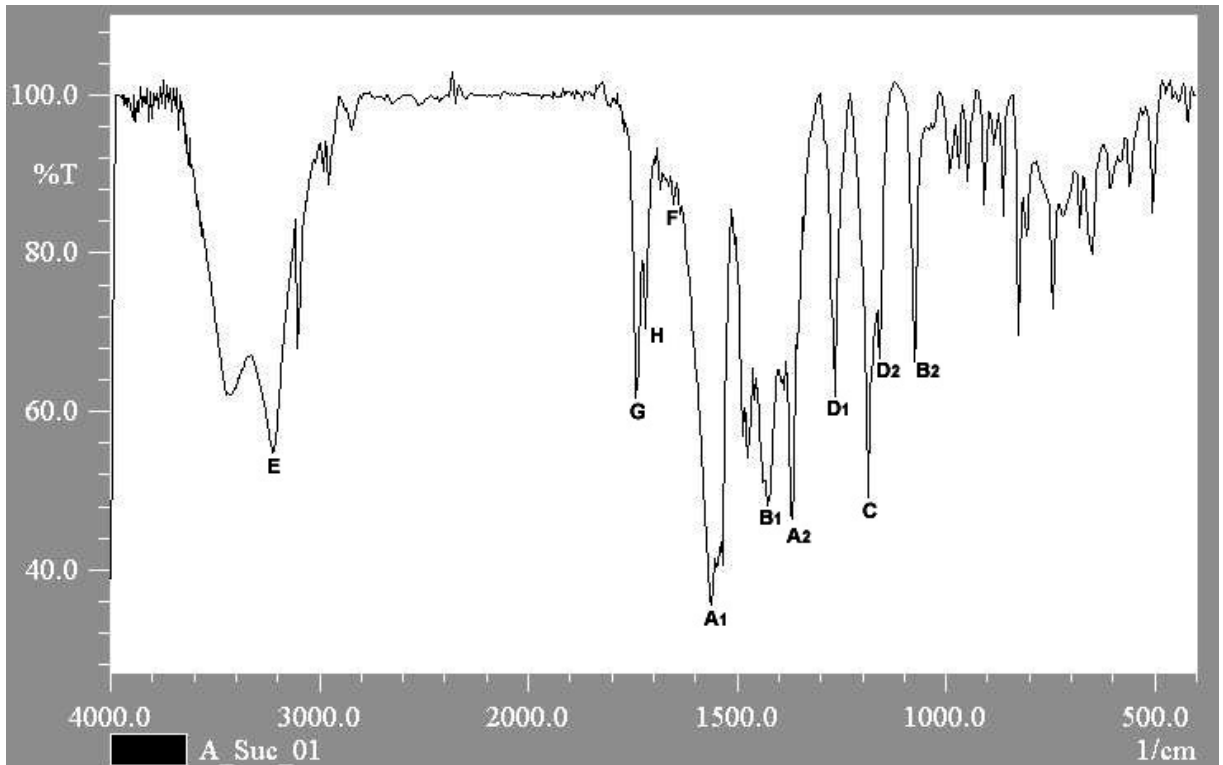
A obtenção do Monosuccinato de tiouréia (MST) foi confirmada pelo espectro de infravermelho, pela presença dos estiramentos de (ν C=S de éster), (ν C=O de amida) e (ν C=O de ácido carboxílico); no espectro de RMN ^1H , pelos deslocamentos químicos δ (ppm) nas posições 2, 3, NH e NH_2 .

Tabela 8. Bandas de absorção no espectro de infravermelho do monosuccinato de metronidazol, composto S1, S2 e S3 (KBr).

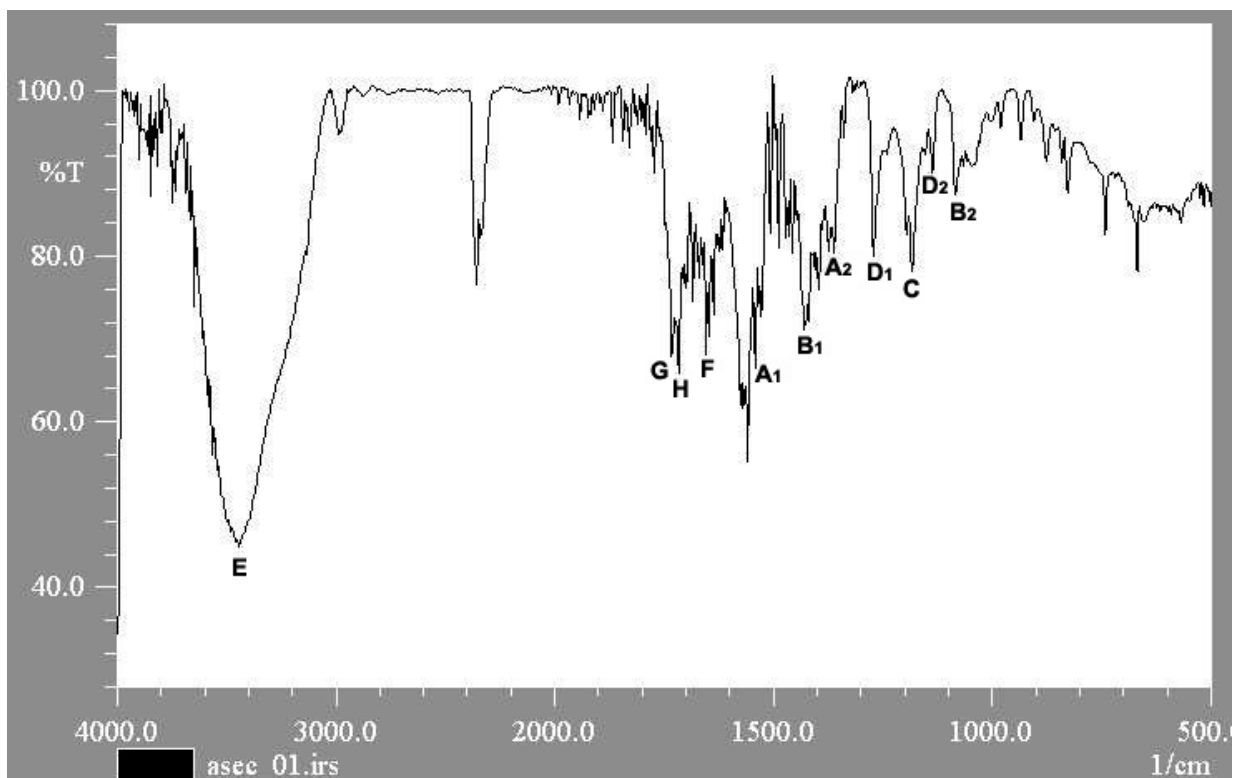
Grupo	Marcador	Monosuccinato de MDZ	Composto S1	Composto S2	Composto S3
		ν (cm^{-1})	ν (cm^{-1})	ν (cm^{-1})	ν (cm^{-1})
NO_2	A_1 e A_2	1535 e 1369	1527 e 1378	1527 e 1309	1529 e 1379
C-N (alfático)	B_1 e B_2	1425 e 1074	1429 e 1085	1417 e 1053	1429 e 1085
C-O	C	1188	1182	1182	1184
C-OH (primário)	D_1 e D_2	1265 e 1159	1269 e 1137	1271 e 1136	1271 e 1135
OH	E	3220	3419	3413	3446
C=C ou C=N	F	1654	1652	1600	1647
C=O (éster)	G	1739	1733	1739	1739
C=O (ác. carboxílico)	H	1718	1716	1718	1724

Tabela 9. Atribuições dos sinais de RMN ^1H e ^{13}C em $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ do monosuccinato de metronidazol, composto S1, S2 e S3.

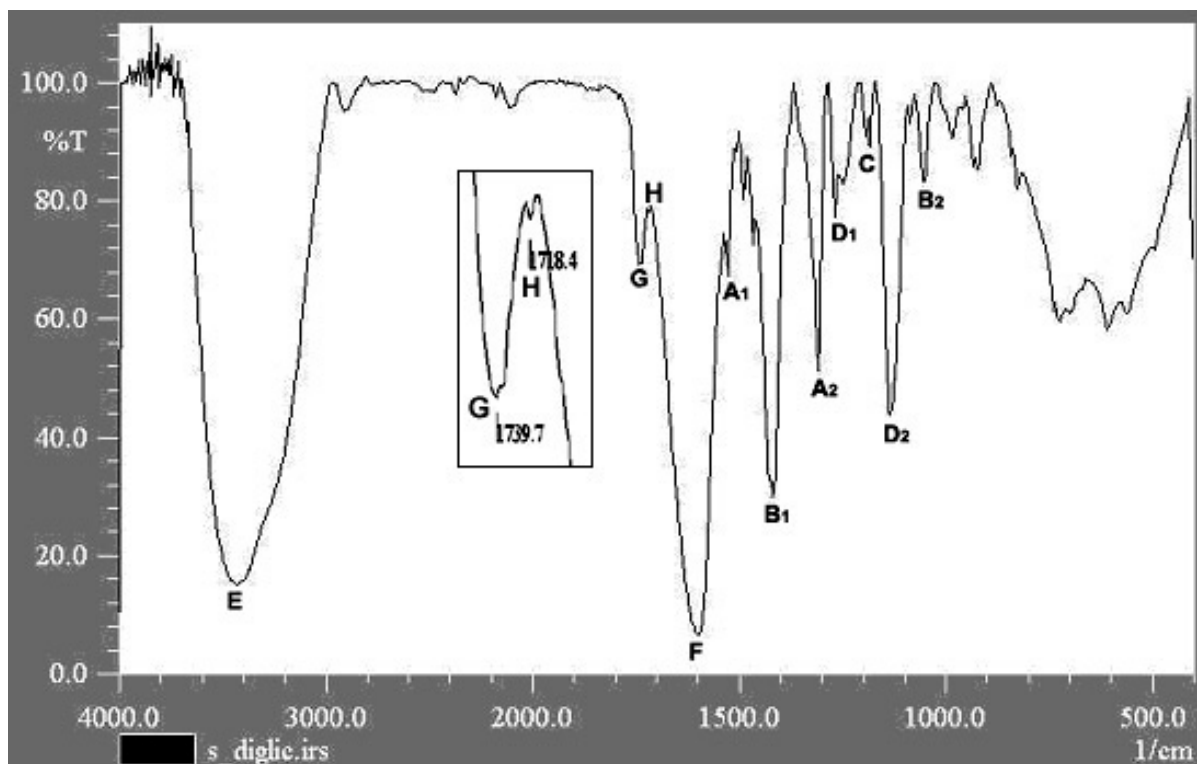
Posição	Monosuc MDZ		Composto S1		Composto S2		Composto S3	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2	---	253,1	---	151,9	---	151,9	---	151,9
4	7,94 s	132,5	7,99 s	---	7,98 s	---	7,98 s	---
5	---	140,0	---	132,8	---	132,7	---	132,7
6	4,48 t	52,0	4,33 d	52,5	4,33 d	65,5	4,33 d	52,5
7	3,85 t	61,6	3,82 m	65,5	3,82 m	66,7	3,82 m	65,6
8	---	---	1,11 d	20,8	1,11 d	20,7	1,11 d	20,8
9	2,53 s	14,3	2,44 s	14,3	2,44 s	14,3	2,44 s	14,3
1'	---	175,9	---	173,6	---	171,0	---	170
2'	2,41 t	31,6	2,39 t	30,3	3,66 s	51,2	1,91 t	33,0
3'	2,57 t	33,4	2,20 t	31,8	---	---	1,65 dd	22,0
4'	---	180,5	---	174,9	4,14 s	52,4	2,26 t	35,0
5'	---	---	---	---	---	172,0	---	172



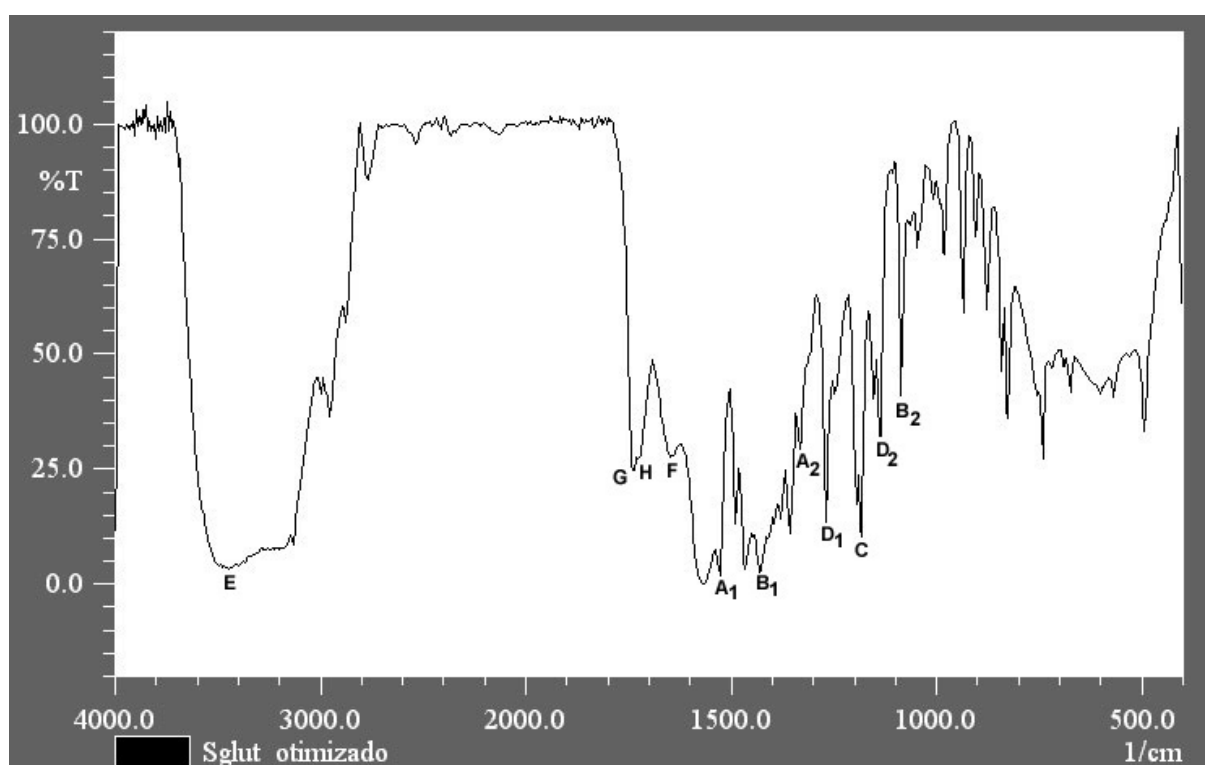
Espectro 5. Infravermelho do Monosuccinato de Metronidazol (KBr).



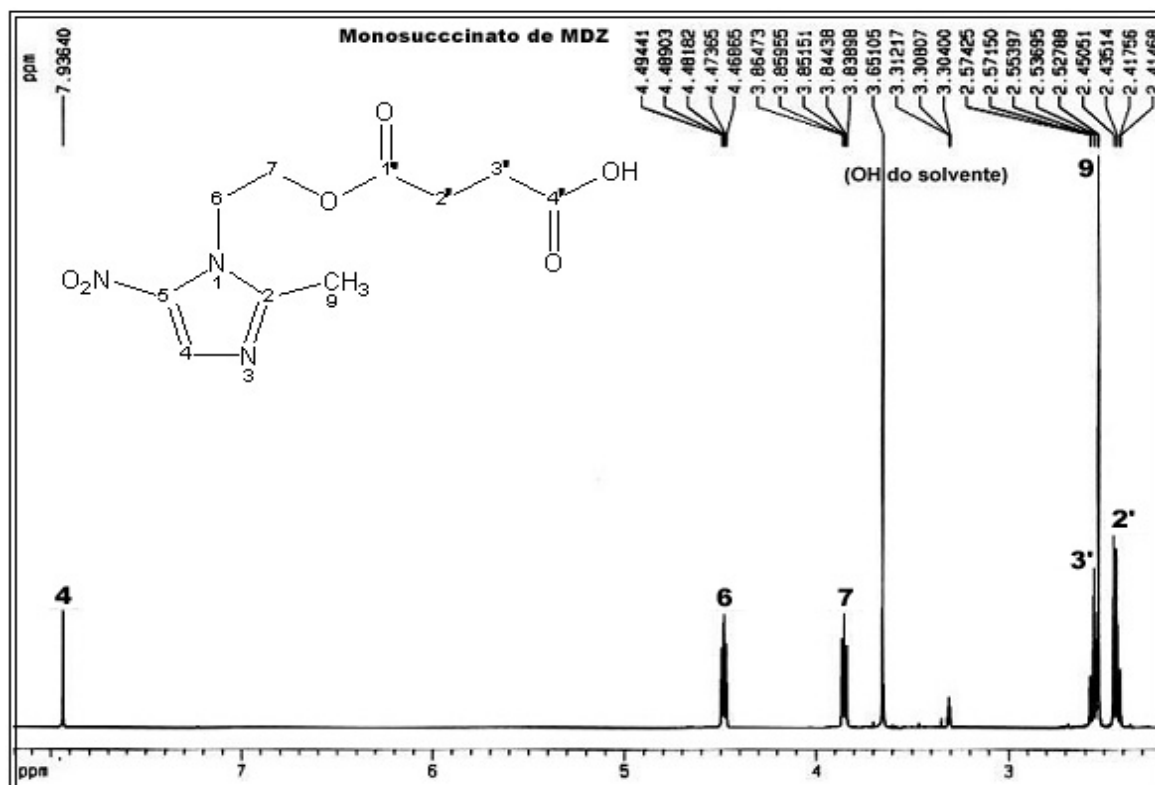
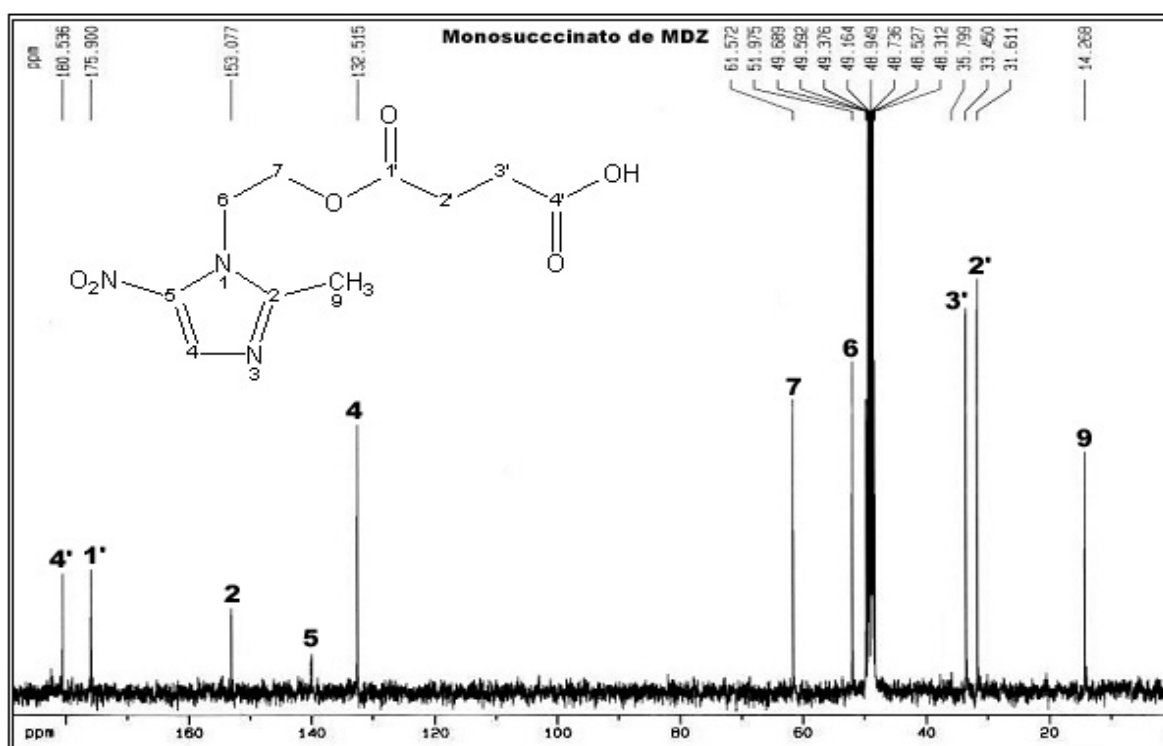
Espectro 6. Infravermelho do Composto S1 (KBr).

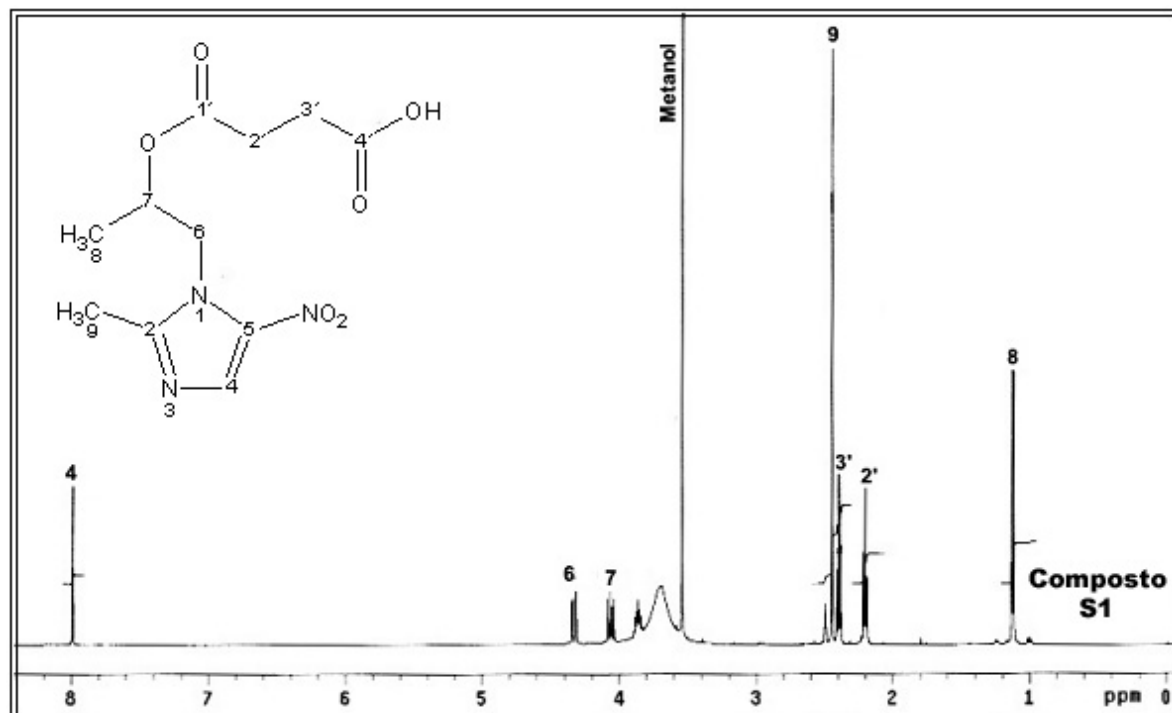
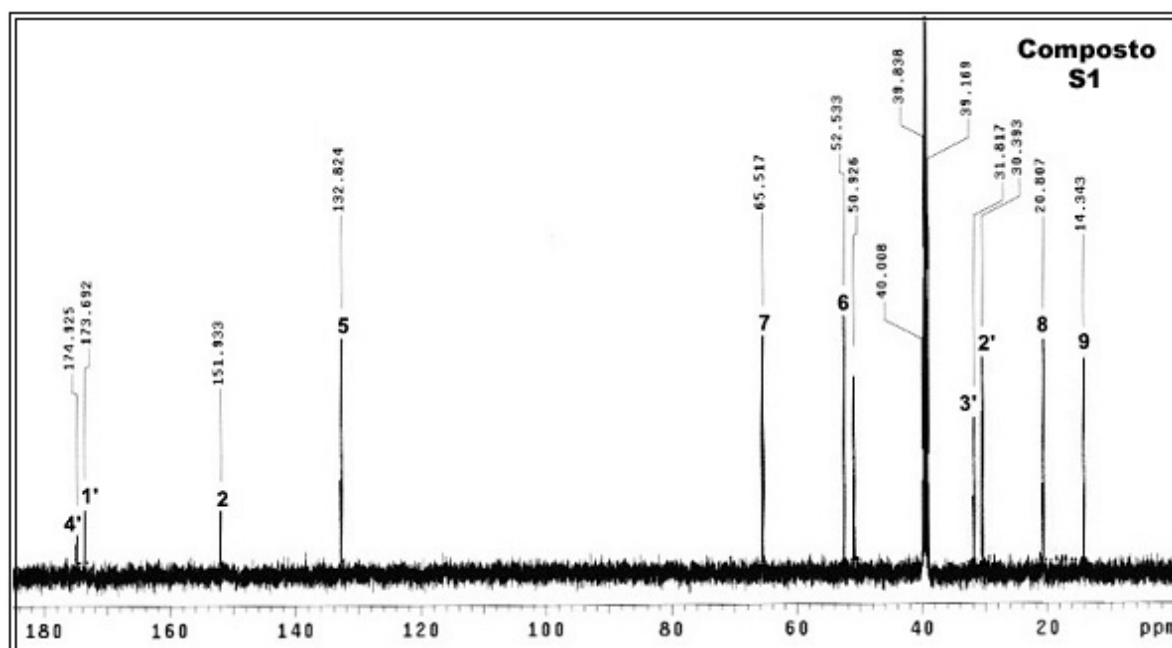


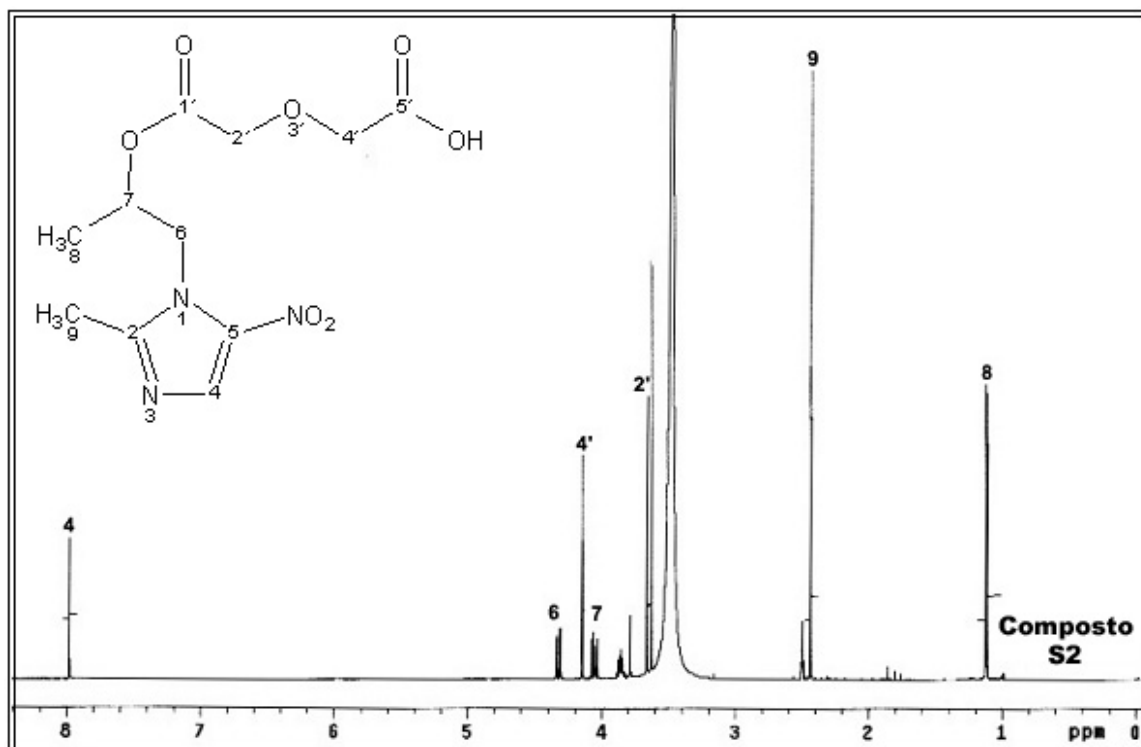
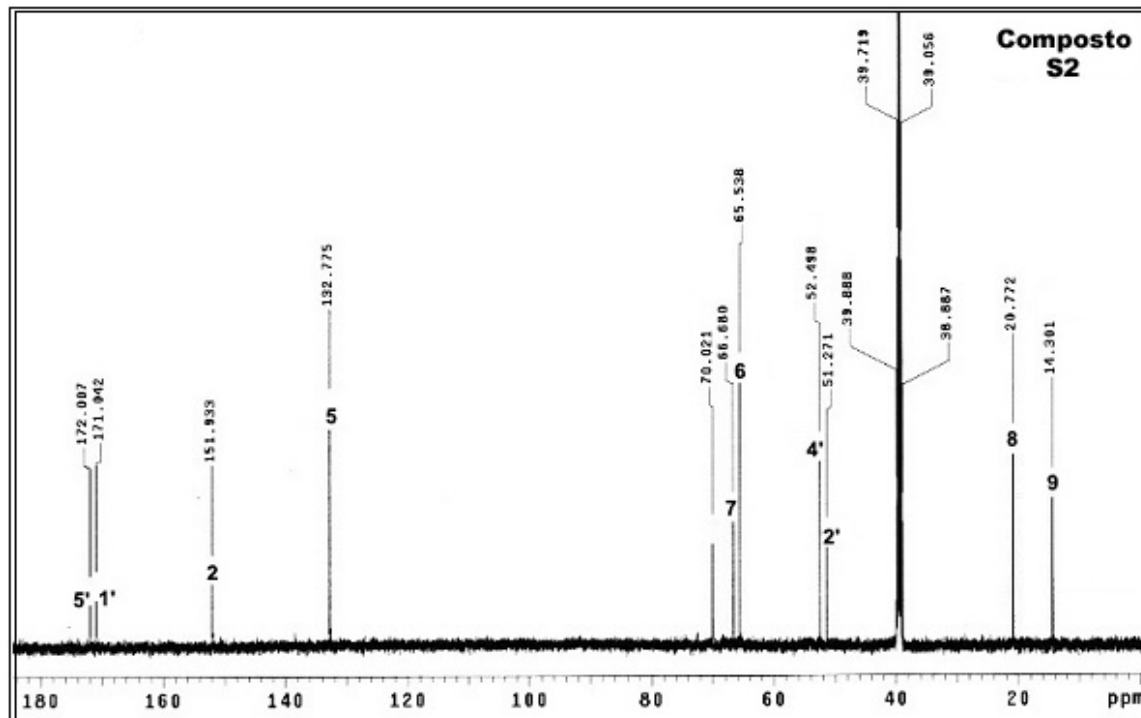
Espectro 7. Infravermelho do Composto S2 (KBr).



Espectro 8. Infravermelho do Composto S3 (KBr).

Espectro 9. RMN de ^1H do Monosuccinato de MDZ em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.Espectro 10. RMN de ^{13}C do Monosuccinato de MDZ em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.

Espectro 11. RMN de ¹H do Composto S1 em CH₃OH-d₄.Espectro 12. RMN de ¹³C do Composto S1 em DMSO-d₆.

Espectro 13. RMN de ^1H do Composto S2 em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.Espectro 14. RMN de ^{13}C do Composto S2 em DMSO-d_6 .

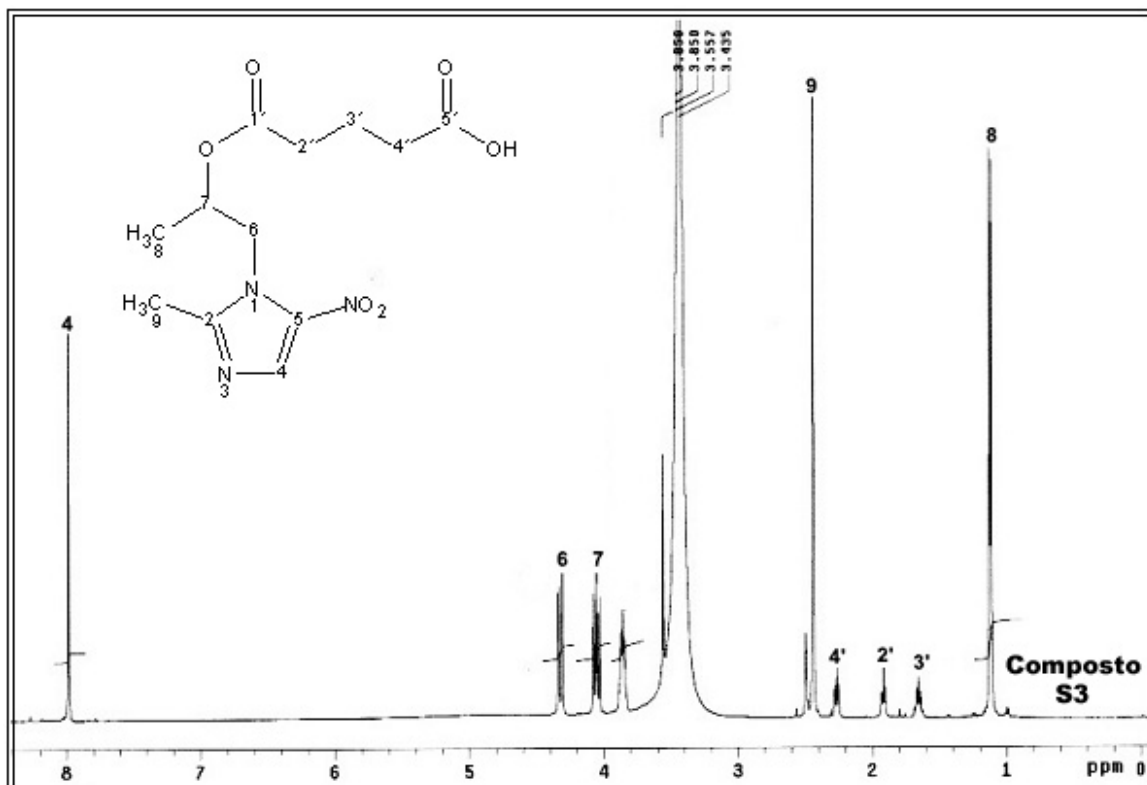
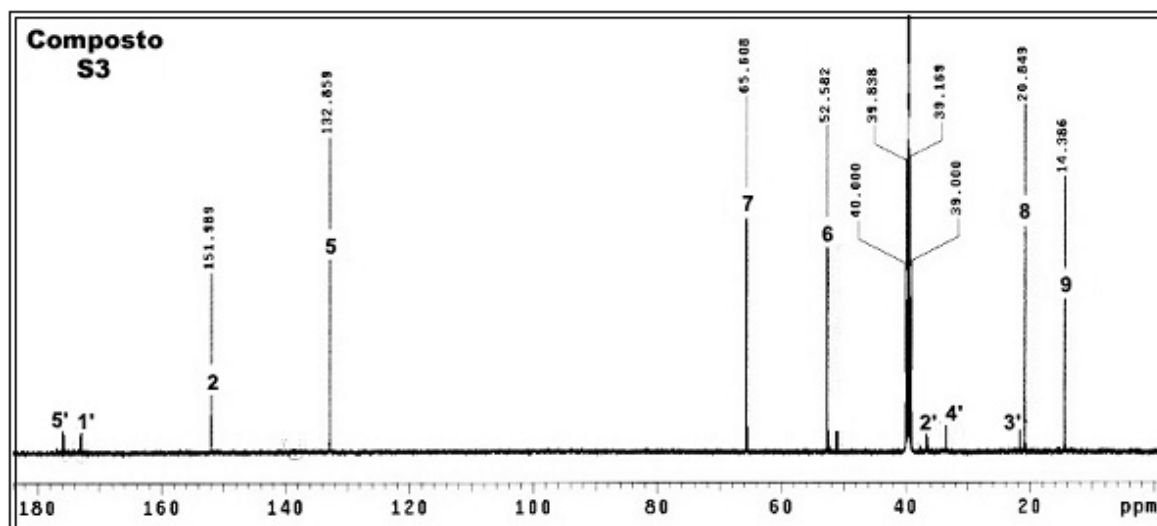
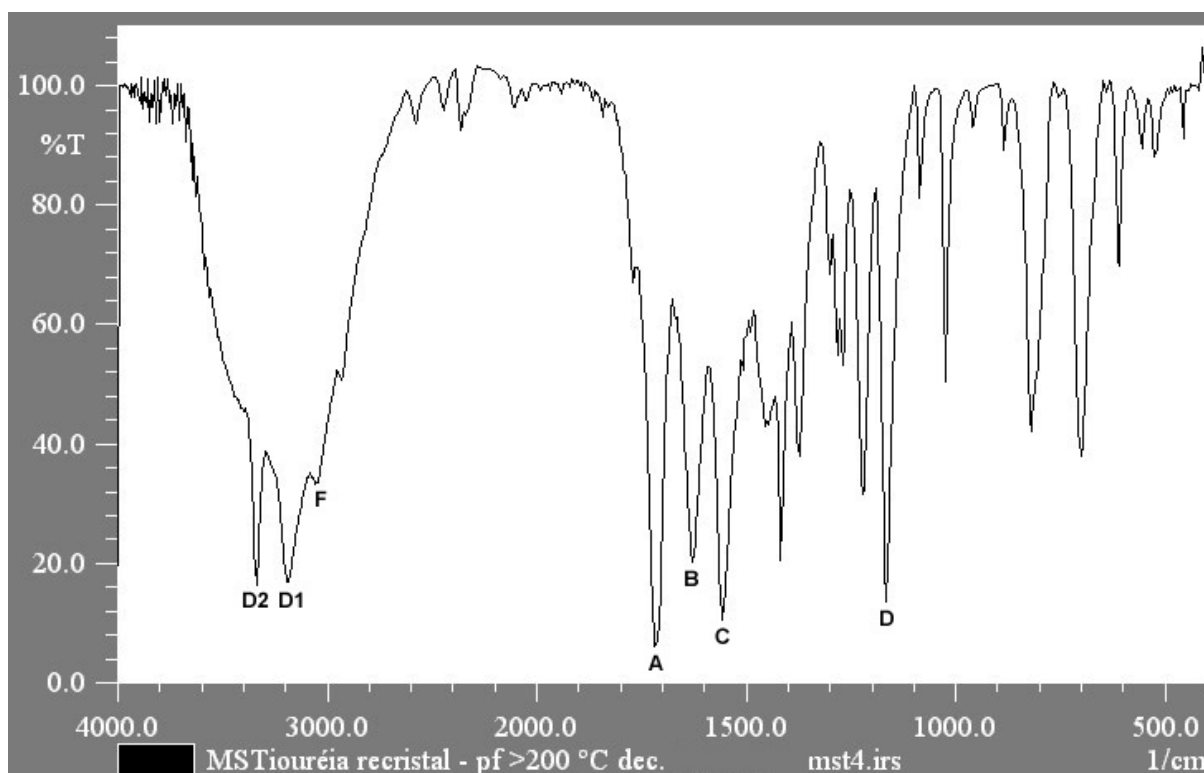
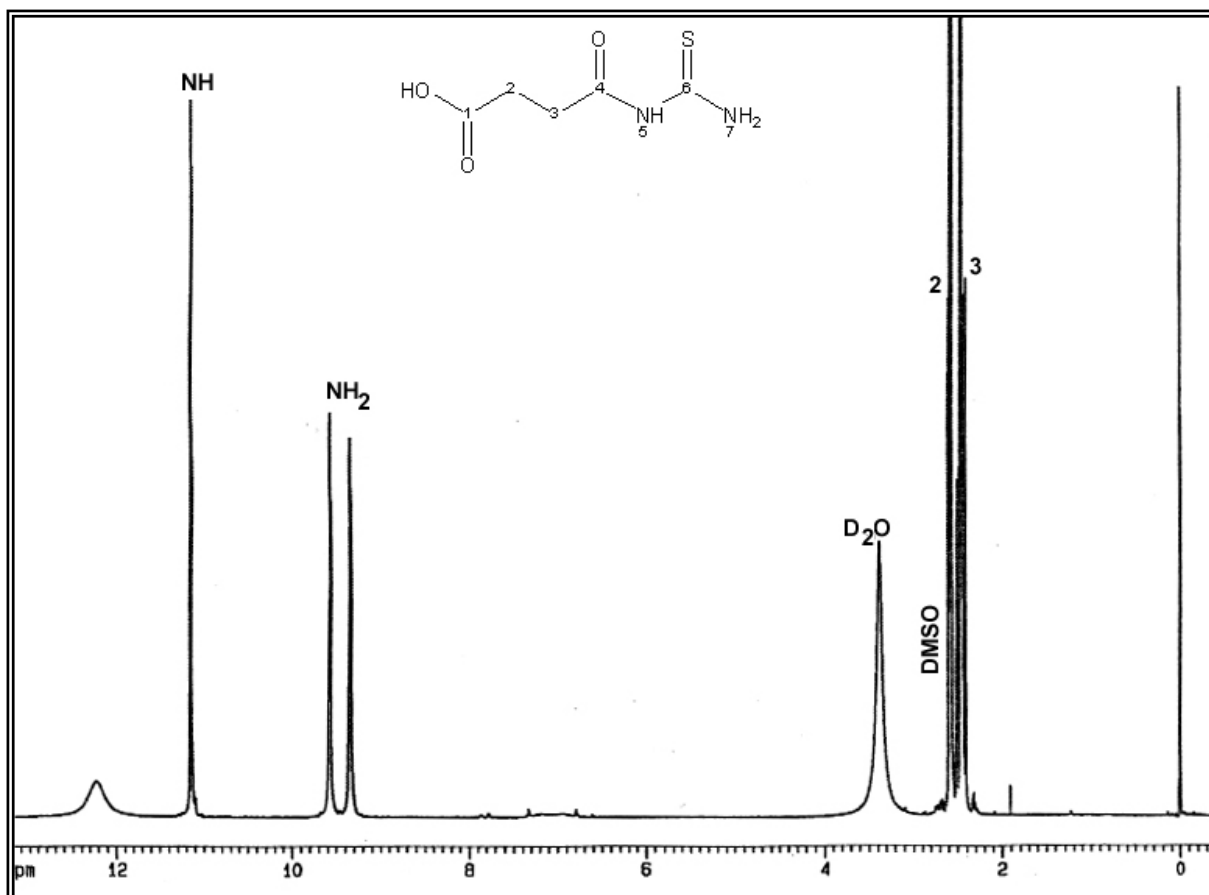
Espectro 15. RMN de ^1H do Composto S3 em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$.Espectro 16. RMN de ^{13}C do Composto S3 em DMSO-d_6 .

Tabela 10. Bandas de absorção no espectro de infravermelho (KBr) e Atribuições dos sinais de RMN ^1H em $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$ do MST.

Infravermelho			RMN	
Grupo	Marcador	ν (cm^{-1})	Posição	^1H
C=O (ác. carboxílico)	A	1716	1	---
C=O (amida)	B	1627	2	3,60 t
NH (1 ^a ou 2 ^a)	C	1558	4	---
C=S	D	1164	3	3,40 t
NH ₂	D1 e D2	3338 e 3188	5a/b	9,3 s / 9,6 s
OH	F	3057	6	---
---	---	---	7	11,05 s



Espectro 17. Infravermelho do MST (KBr).



Espectro 18. RMN de ^1H do MST em DMSO-d_6 .

3.4 Referências.

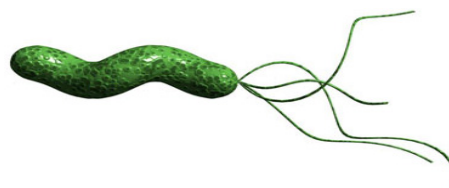
MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry**. 3 ed. New York: Wiley-Interscience, 1985. p. 486.

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

PERMENTIER, D. et al. Synthesis of dipeptide ester of metronidazole and evaluation of their hydrolytic stability. **Bull. Soc. Chim. Belg.** v.101, n.8, p.701 – 707, 1992.

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

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



Capítulo 4

Ensaio “in vitro” e “in vivo” para determinação de atividade contra *Helicobacter pylori*.

Neste capítulo são apresentadas e discutidas, as padronizações das metodologias “in vitro” e “in vivo” para verificação da atividade anti-*Helicobacter pylori*. Também serão discutidos os resultados dos testes de atividade “in vivo”, dos compostos derivados de metronidazol, secnidazol e tiouréia sintetizados neste trabalho.

Os ensaios de atividade anti-*Helicobacter pylori* foram desenvolvidos no laboratório de Fisiologia dos Microrganismos, do Departamento de Ciências Biológicas da FCF-Unesp-Araraquara.

4. ENSAIOS “IN VITRO” E “IN VIVO” PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE CONTRA *HELICOBACTER PYLORI*.

Com a finalidade de se verificar a atividade antibacteriana dos compostos obtidos, contra o *Helicobacter pylori*, alguns métodos “in vitro” e um “in vivo” foram propostos e testados.

O primeiro ensaio testado foi o método de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica (ELLOF, 1998; DEVIENNE & RADDI, 2002; GABRIELSON et al, 2002; PALOMINO et al, 2002; SANCHES, 2004; MONTEJANO et al, 2005); o segundo ensaio envolveu o teste de difusão em ágar, estando de acordo com a proposição do III Consenso de Maastrich (2005) (in: MAGALHÃES, 2008) e o terceiro teste “in vivo”, foi padronizado segundo os experimentos de: FALK et al, 1993; TOUATI et al, 2000; WANG et al, 2001; FREITAS et al, 2002; SALGADO, 2002; SGOURAS et al, 2004; CUSTÓDIO et al, 2005; BITTENCOURT et al, 2006; MOHAMMED et al, 2006.

4.1 Amostra Bacteriana.

Em todos os ensaios foi utilizada a cepa de referência de *Helicobacter pylori* ATCC-43504, isolada de mucosa gástrica de humano.

4.2 Método de diluição em microplacas.

A metodologia deste teste está fundamentada no trabalho dos seguintes autores: CHAND et al, 1994; DEVIENNE & RADDI, 2002; PALOMINO et al, 2002; SANCHES, 2004; MONTEJANO et al, 2005.

4.2.1 Preparo da suspensão bacteriana.

A suspensão bacteriana foi preparada adicionando-se uma cultura de *Helicobacter pylori* de 72 horas, em um tubo contendo solução estéril de PBS com pH7,0, até obter turvação igual ao tubo 0,5 da escala Mc Farland, que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC/mL. Tal concentração, ainda foi confirmada por leitura espectrofotométrica, no comprimento de onda de 620 nm com valor de absorbância entre 0,10 a 0,15 correspondente a 10^8 UFC/mL (CHAND et al, 1994; DEVIENNE & RADDI, 2002; SANCHES, 2004).

A determinação da concentração de células viáveis/mL, foi realizada com o plaqueamento de 0,1mL de suspensão bacteriana seguido da contagem de colônias formadas após o período adequado de incubação.

4.2.2 Preparo das substâncias de referência e controle negativo.

Foram preparadas as soluções de antimicrobianos como referências (metronidazol, amoxicilina e tetraciclina) e como controle negativo a solução de PBS. Tais soluções foram preparadas um dia antes de sua utilização e guardadas à temperatura de 5°C. As concentrações das soluções de metronidazol, tetraciclina e amoxicilina foram de 5µg/mL, 10µg/mL e 0,12µg/mL em CMH respectivamente.

A solução de PBS foi composta de 1,636 g de cloreto de sódio, 0,072 g de fosfato de sódio monobásico, 0,53 g de fosfato de sódio dibásico em 200mL de água mili-Q, ajustando o pH para 7,0 com solução de hidróxido de sódio (0,1 e 1N)

4.2.3 Preparo da solução de resazurina.

A solução de resazurina teve sua concentração padronizada em 0,1mg/mL de água mili-Q estéril.

Tal substância é um indicador de óxido-redução, que vem sendo utilizado para revelar alteração de pH no meio determinado pelo crescimento bacteriano (PALOMINO et al, 2002; MONTEJANO et al, 2005).

4.2.4 Método de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica.

Foram preparadas duas microplacas seguindo o procedimento a seguir (figura 20).

Inicialmente adicionou-se 100µL de água mili-Q estéril em cada poço da fileira 1 e 5 (A-H) seguido de 100µL do caldo Muller Hinton em cada poço da fileira 2, 3 e 4 (A-H) e 100µL no poço (2A) da solução do fármaco (total 200µL); após homogeneização retirou-se 100µL do poço (2A) e transferiu-se para o (2B) homogeneizando novamente; repetiu-se este último procedimento (do 2B para o 2C e assim em diante) até o poço (2H), descartando os 100µL finais; a seguir, adicionou-se 30µL da suspensão de bactéria (10^8 UFC/mL) em cada poço da fileira 2, 3 e 4 (A-H); subsequentemente adicionou-se: (a) 100µL do caldo Muller Hinton e 30µL da suspensão de bactéria (10^8 UFC/mL) em cada poço da fileira 6 (A-H) (**controle da bactéria +**), (b) 100µL do caldo Muller Hinton em cada poço da fileira 7 (A-H) (**controle do meio**), (c) 100µL do **controle de metronidazol** e 30µL da suspensão de bactéria (10^8 UFC/mL) em cada poço da fileira 8 (A-H), (d) 100µL do **controle de amoxicilina** e 30µL da suspensão de bactéria (10^8 UFC/mL) em cada poço da fileira 9 (A-H), e (e) 100µL do **controle de**

tetraciclina e 30µL da suspensão de bactéria (10^8 UFC/mL) em cada poço da fileira 10 (A-H);

Das duas microplacas preparadas, uma foi lida em leitor de microplacas em 595nm e em seguida, incubada junto com a outra microplaca à 37°C com 7-10% CO₂ durante 48 horas. Após esse período de incubação, ambas foram analisadas a olho nú levando-se em conta a turvação do meio; por leitura espectrofotométrica em leitor de microplaca a 595nm; e com 30µL da solução de resazurina por poço, com incubação em temperatura ambiente por 2 horas, sendo verificado o crescimento microbiano com o surgimento da cor rosa nos poços da fileira 6 (**controle da bactéria +**); onde rosa (+) e azul (-) para crescimento microbiano.

Cada ensaio foi realizado em duplicata e repetido três vezes em semanas consecutivas. O procedimento técnico da diluição em microplacas está esquematizado na figura 20.

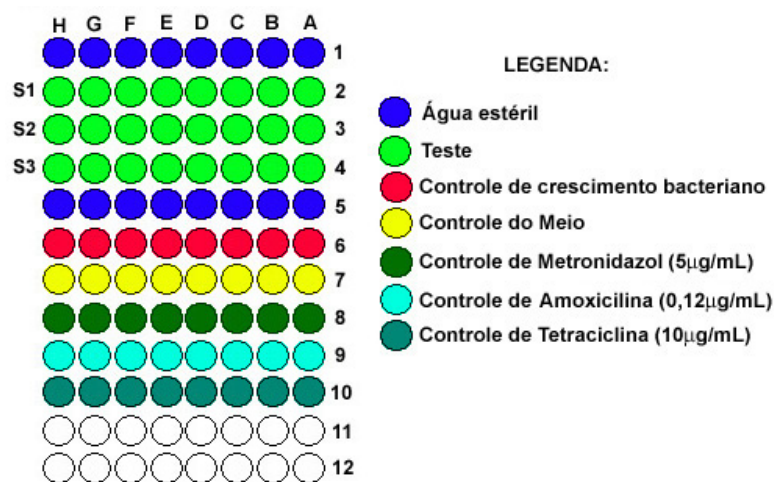


Figura 20. Configuração esquemática do teste de diluição em microplacas.

4.3 Método de difusão em ágar.

Seguindo as recomendações das “Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana” do (CLSI)NCCLS/OPAS/ANVISA e a proposição do III Consenso de Maastrich (2005) (in: MAGALÃES, 2008), partiu-se para o teste de difusão em ágar utilizando o *Helicobacter pylori*.

O método de difusão em ágar seguiu o procedimento representado na figura 21, onde:

As bactérias do estoque (refrigerado) foram semeadas em caldo Muller Hinton acrescido de 5% de SFB, com incubação a 37°C com 8-10% CO₂ e 60-80% de umidade durante 48 horas.

O crescimento bacteriano obtido foi semeado em 03 diferentes placas de petri de vidro contendo ágar Muller Hinton (5% SdC), e incubadas a 37°C com 8-10% CO₂ e 60-80% de umidade durante 48 horas.

Posteriormente foi semeada com alça de Drigalski, 300µL da suspensão bacteriana à concentração de 10⁸UFC/mL (escala 0,5 de Mc Farland) sobre ágar Muller Hinton (5% SdC). Em seguida adicionou-se com uma pinça, discos estéreis contendo cada substância teste (S1, S2 e S3) e controles (metronidazol e secnidazol) por placa, com as mesmas concentrações molares. Incubando-se esta placa a 37°C com 8-10% CO₂ e 60-80% de umidade durante 48 horas e após a incubação foi realizada a leitura do halo de inibição (em raio e diâmetro).



Figura 21. Metodologia do teste de difusão em ágar para o *Helicobacter pylori*.

4.4 Método de atividade “in vivo” contra *Helicobacter pylori*.

Na busca por um teste que pudesse verificar a atividade antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*, dos compostos obtidos via sintética, foi padronizado um ensaio “in vivo” (figuras 22, 23 e 24), fundamentado nos seguintes autores: FALK et al, 1993; TOUATI et al, 2000; WANG et al, 2001; FREITAS et al, 2002; SALGADO, 2002; SGOURAS et al, 2004; CUSTÓDIO et al, 2005; BITTENCOURT et al, 2006; MOHAMMED et al, 2006.

O ensaio divide-se nas seguintes etapas:

- Ativação das cepas e preparo de estoques de *Helicobacter pylori*;
- Indução da infecção no rato;
- Farmacoterapia;
- Extração de material biológico;
- Análise microbiológica;
- Análise histológica.

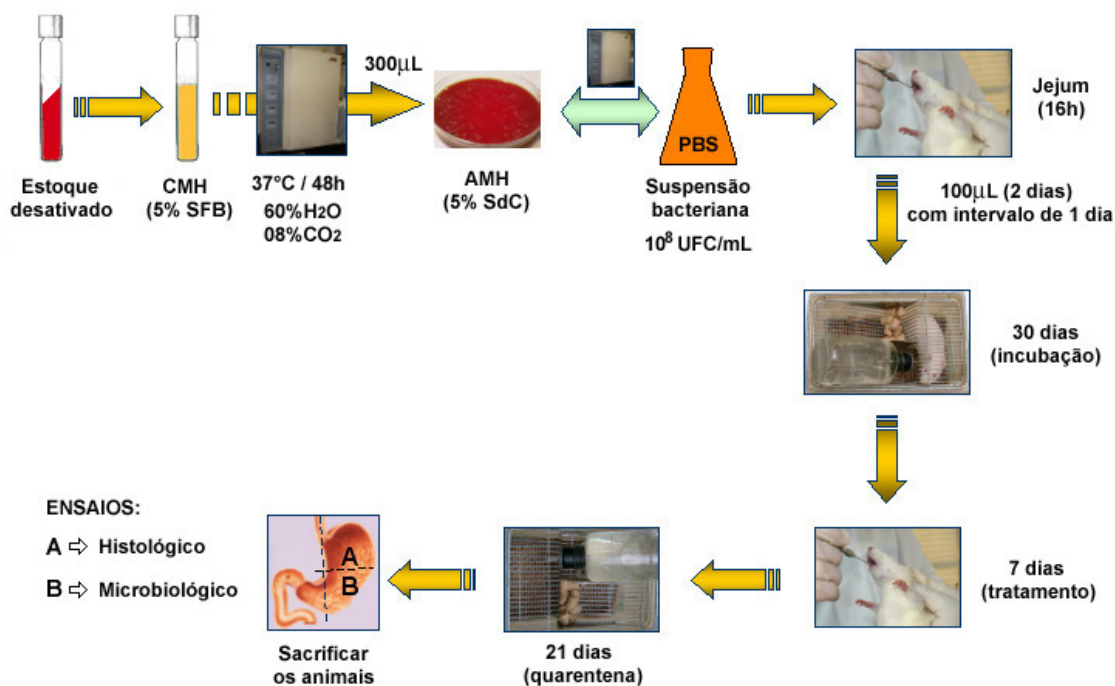


Figura 22. Representação esquemática do teste de atividade “in vivo” contra *Helicobacter pylori*.

4.4.1 Ativação das cepas de *Helicobacter pylori*.

A ativação das cepas e preparo dos estoques de *H. pylori* seguiu o seguinte procedimento:

As bactérias do estoque (refrigerado) foram semeadas em caldo Muller Hinton acrescido de 5% de SFB, com incubação a 37°C com 8-10% CO₂ e 60-80% de umidade durante 48 horas.

O crescimento bacteriano obtido foi semeado em 03 diferentes placas de petri de vidro contendo ágar Muller Hinton (5% SdC), e incubadas a 37°C com 8-10% CO₂ e 60-80% de umidade durante 48 horas.

O crescimento obtido nas placas de estoque ativado, foram utilizadas para o preparo da suspensão bacteriana em PBS na concentração de 10⁸UFC/mL, que irá induzir a infecção no animal.

4.4.2 Indução da infecção.

O presente método consistiu em se deixar primeiramente os animais (ratos Wistar albinos machos) em jejum de água e de e comida por 16 horas (sem cama de manavalha) antes do início do experimento, e em ambiente climatizado (25°C).

Para a indução da infecção, foi preparada uma suspensão bacteriana em PBS de 10⁸UFC/mL, administrando-se por via oral, 100µL da suspensão por 2 dias com intervalo de 1 dia e espera 30 dias (período de incubação). Neste período os animais pesavam em média de 220g, sendo divididos em grupos de 05 animais por caixa, assim identificados: **grupo-1** (metronidazol), **grupo-2** (secnidazol), **grupo-3** (composto-S1), **grupo-4** (composto-S2), **grupo-5** (composto-S3), **grupo-6** (monossuccinato de metronidazol), **grupo-7** (MST); e **grupo-8** (controle negativo – infectado – não tratado).

Segundo PING e colaboradores (2006) da American Society for Microbiology, o número mínimo de animais para este experimento é o de três por grupo.

4.4.3 Farmacoterapia e extração de material biológico.

Após o período de incubação iniciou-se a farmacoterapia com as substâncias de cada Grupo, onde a posologia de metronidazol referente a 500mg/70Kg, duas vezes ao dia, durante 7 dias, fundamentou-se no trabalho de GRAHAM (2000), sendo seu equivalente molar, utilizado para as demais substâncias dos outros grupos.

O início dos ensaios microbiológico e histológico, só devem ocorrer após 21 dias do fim do tratamento, com a finalidade de evitar resultados falso-positivos da atividade antimicrobiana, uma vez que pode ocorrer neste período uma re-infecção.

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, seguido da retirada de seu estômago em fluxo laminar, onde o mesmo foi subdividido em duas partes das quais a parte superior é utilizada para teste histológico e a inferior para o ensaio microbiológico.

4.4.4 Análise microbiológica.

Esta etapa do experimento “in vivo” (figura 23), inicia-se logo após retirada da parte inferior do estômago, devendo-se imediatamente lavar a mesma com solução PBS estéril e semear em ágar Muller Hinton (5% SdC), incubando a placa a 37°C com 8-10% CO₂ e 60-80% de umidade durante 48 horas, onde após tal período realizou-se a contagem das colônias e a coloração de gram para confirmação microscópica de sua estrutura morfológica.

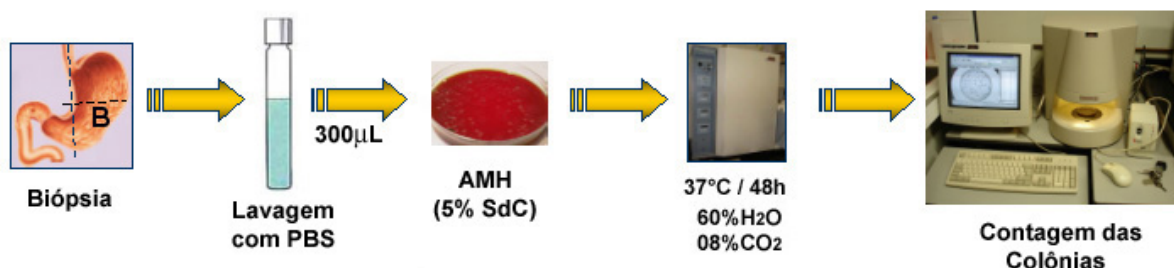


Figura 23. Representação esquemática do ensaio microbiológico.

4.4.5 Análise Histológica.

Para realização do estudo histológico (figura 24), deve-se logo após retirada da parte superior do estômago, lavar o mesmo imediatamente com solução estéril de PBS e em seguida fixá-lo com formalina 10%.

Após a fixação, incorporou-se a amostra em parafina, para realização dos cortes histológicos na espessura de 4µm em micrótomo. Antes de se realizar a observação via microscopia ótica, as amostras são coradas separadamente em 2

sistemas distintos: Coloração Giemsa / May-Grunwald para verificação de colonização por *Helicobacter pylori* e Coloração hematoxilina-eosina para estudo do grau de inflamação pelo Sistema de Sydney.

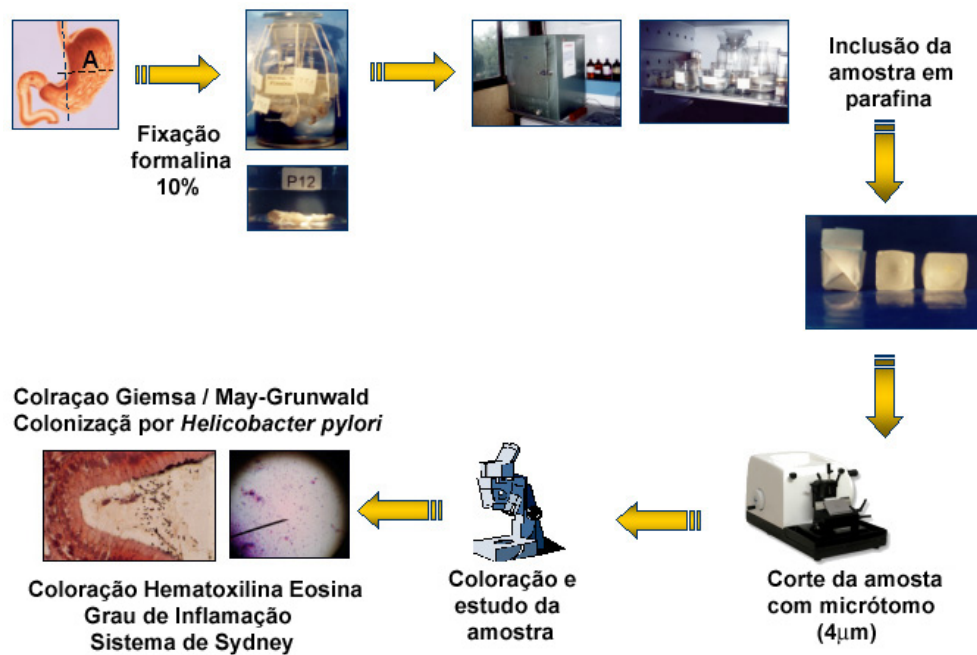


Figura 24. Representação esquemática do ensaio histológico.

4.5 Resultados do método de diluição em microplacas.

O teste de diluição em microplacas utilizado para verificação de atividade contra o *Helicobacter pylori*, não demonstrou resultado satisfatório, uma vez que não houve o crescimento bacteriano nos micropoços, verificado pela leitura espectrofotométrica e pela revelação com a resazurina (figura 25), onde a cor azul indicou o não crescimento bacteriano.

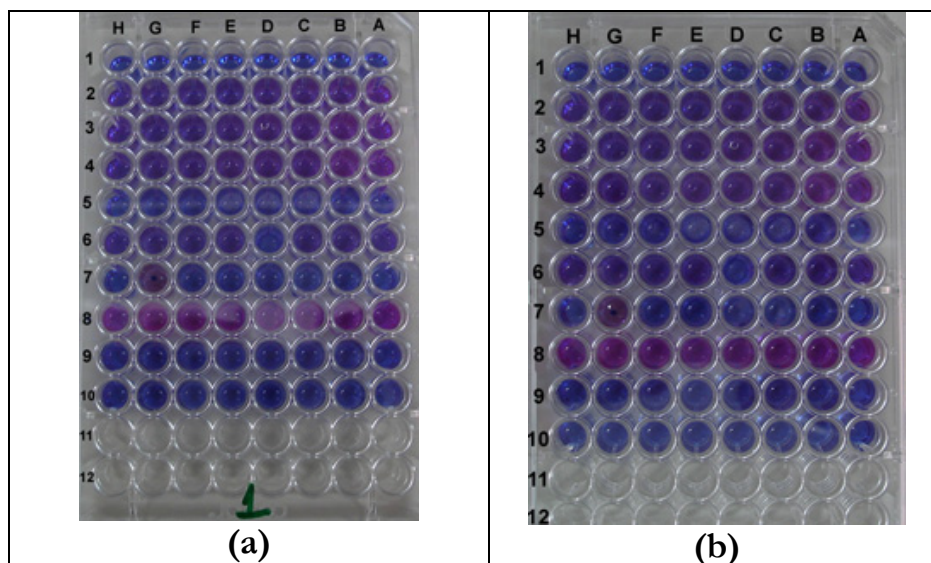


Figura 25. Revelação das microplacas com resazurina, onde:
(a) suspensão de bactéria de 10^8 UFC/mL.
(b) suspensão de bactéria de 10^3 UFC/mL.

A exemplo do trabalho de XIUPING & MICHAEL (2000) foram realizadas tentativas de reativação da cepa supracitada em meios líquidos e sólidos enriquecidos com Soro Fetal Bovino (SFB) ou Sangue de Carneiro à concentrações de CO_2 entre 5-10%, onde observou-se pela coloração de Gram, um melhor crescimento no meio líquido enriquecido com SFB, seguido de repiques em meio sólido enriquecido com sangue ou plasma de carneiro (tabelas 11 e 12).

Seguiu-se então com ativação da cepa utilizando as especificações da tabela 11, onde pode-se constatar o crescimento do *Helicobacter pylori* pela turvação do meio e coloração de Gram.

Tabela 11. Condições experimentais para crescimento de *Helicobacter pylori* em meio líquido.

Meio	Enriquecido	CO ₂	Umidade	Temp.	Período de incubação	Crescimento
CMH	---	5 – 7,5%	↓ 60%	37°C	48h	negativo
	5% SFB	5 – 7,5%	↓ 60%	37°C	48 h	negativo
	5% SFB	8 – 10%	60 – 80%	37°C	48 h	positivo

Tabela 12. Condições experimentais para crescimento de *H. pylori* em meio sólido.

Meio	Enriquecido	CO ₂	Umidade	Temp.	Período de incubação	Crescimento
AMH	5% SdC	5 – 7,5%	↓ 60%	37°C	48h	negativo
		8 – 10%	↓ 60%	37°C	48h	negativo
		8 – 10%	60 – 80%	37°C	48h	positivo
	5% PdC	8 – 10%	60 – 80%	37°C	48h	positivo
TSA	5% SdC	8 – 10%	60 – 80%	37°C	48h	positivo
	5% PdC					
BAB	5% SdC	8 – 10%	60 – 80%	37°C	48h	positivo
	5% PdC					

Também pode-se determinar algumas informações importantes para o crescimento do *Helicobacter pylori*, tais como:

1. O controle da temperatura de preparo do ágar sangue deve ser rigoroso (entre 40 a 45°C), para que não ocorra a lise das hemácias. Fator crucial para o crescimento do *Helicobacter pylori*.
2. O tempo de envelhecimento do sangue do carneiro, deve ser superior a 2 semanas, pois abaixo deste período, não será observado o crescimento do *Helicobacter pylori* no ágar sangue.
3. O *Helicobacter pylori* (estoque), não cresce sem repique prévio em CMH/SFB.
4. Antes de preparar a suspensão bacteriana de *Helicobacter pylori* para administração no animal, deve-se repicá-la em CMH/SFB.
5. O *Helicobacter pylori* (isolado da mucosa do estômago de rato), cresce no ágar sangue (5%SdC), sem a necessidade de ativação prévia da cepa em SFB.

4.6 Resultado do método de difusão em ágar

Não foi observada a presença de halo de inibição (figura 25), em nenhum dos compostos testados (S1, S2 e S3) nem mesmo nos controles de metronidazol e secnidazol, onde foi respeitada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 8µg/mL do metronidazol, citada por ALA e colaboradores (2002).

Também não houve formação de halo de inibição para o metronidazol nas concentrações de: 5µg/mL; 10µg/mL; 0,05mg/mL; e 5mg/mL.

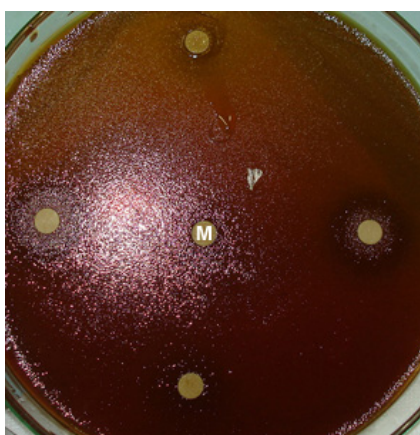


Figura 26. Resultado do teste de difusão em ágar para o *Helicobacter pylori*.

4.7 Resultado do método “in vivo” de atividade contra *Helicobacter pylori*

O estudo estatístico deste teste foi realizado por meio de uma análise de variância, onde o contraste entre as médias foi efetuado usando os testes de TUKEY e DUNCAN a 0,05 (ESTAT - UNESP).

Tais análises demonstraram que nenhum composto apresentou comportamento estatístico semelhante aos grupos do metronidazol, secnidazol ou controle negativo (infectado – não tratado). Portanto podemos afirmar que: os compostos S1, S2, monossuccinato de metronidazol e MST são estatisticamente diferentes do controle negativo e que o composto S3 possui comportamento estatístico diferente do metronidazol e do secnidazol.

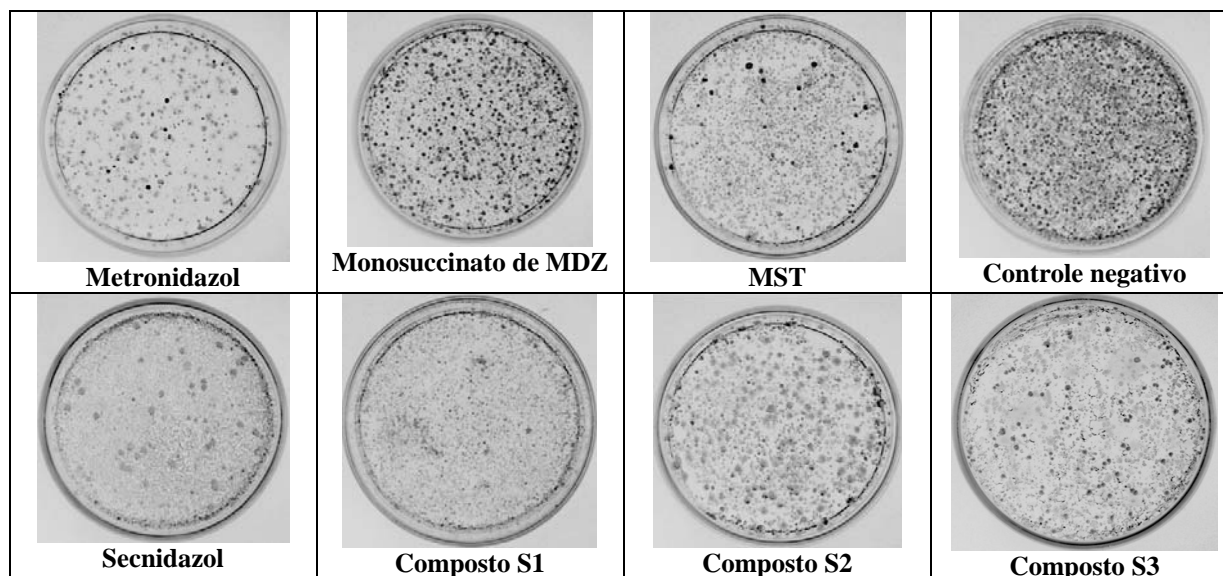


Figura 27. UFC/placa de *Helicobacter pylori* isolado de estômago de ratos após tratamento.

Tabela 13. Número de UFC/placa de *Helicobacter pylori* isolados de estômago de ratos após tratamento.

Composto	N° UFC
Metronidazol (MDZ)	372 ± 14
Secnidazol	780 ± 48
Composto S1	1019 ± 47
Composto S2	932 ± 21
Composto S3	606 ± 61
Monosuccinato de MDZ	1004 ± 20
MST	1093 ± 21
Controle negativo (sem tratamento)	1242 ± 39

TESTE DE TUKEY (CV=2.28)			TESTE DE DUNCAN (CV=2.35)		
TRAT.	MEDIA		TRAT.	MEDIA	
8	35.2400	A	8	35.2400	1- Metronidazol (MDZ)
7	33.0729	B	7	33.0729	2- Secnidazol
3	31.9259	BC	3	31.8101	3- Composto S1
6	31.6989	CD	6	31.6989	4- Composto S2
4	30.5287	D	4	30.5287	5- Composto S3
2	27.9196	E	2	27.9196	6- Hemisuccinato de MDZ
5	24.6067	F	5	24.6067	7- MST
1	19.3027	G	1	19.3027	8- Controle (-)

Figura 28. Resultado da análise de variância, usando os testes de TUKEY e DUNCAN a 0,05 da atividade antibacteriana contra *Helicobacter pylori* "in vivo".

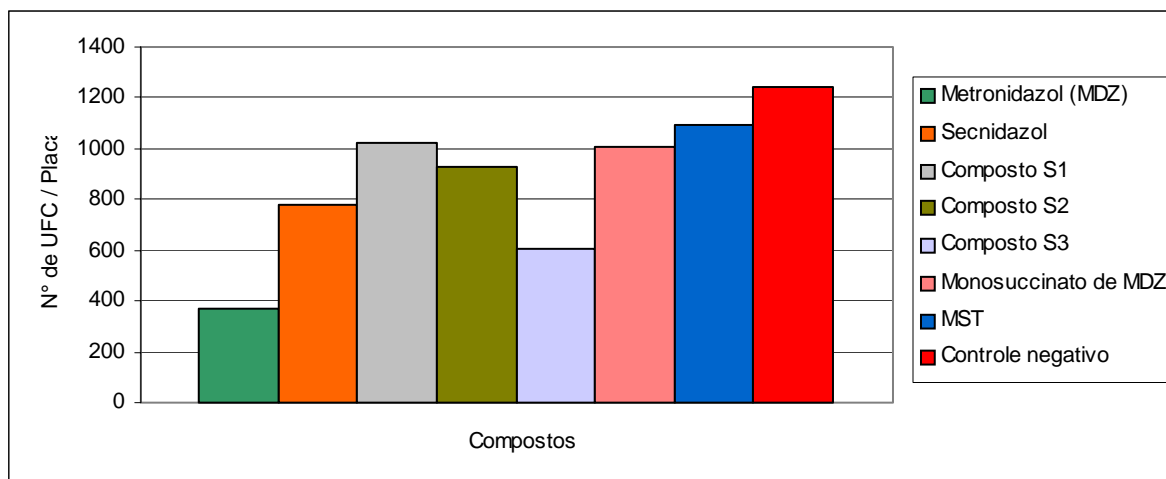


Figura 29. Número de UFC/placa de *Helicobacter pylori* isolado de estômago de ratos após tratamento por 7 dias (500mg/70Kg; 2x/dia).

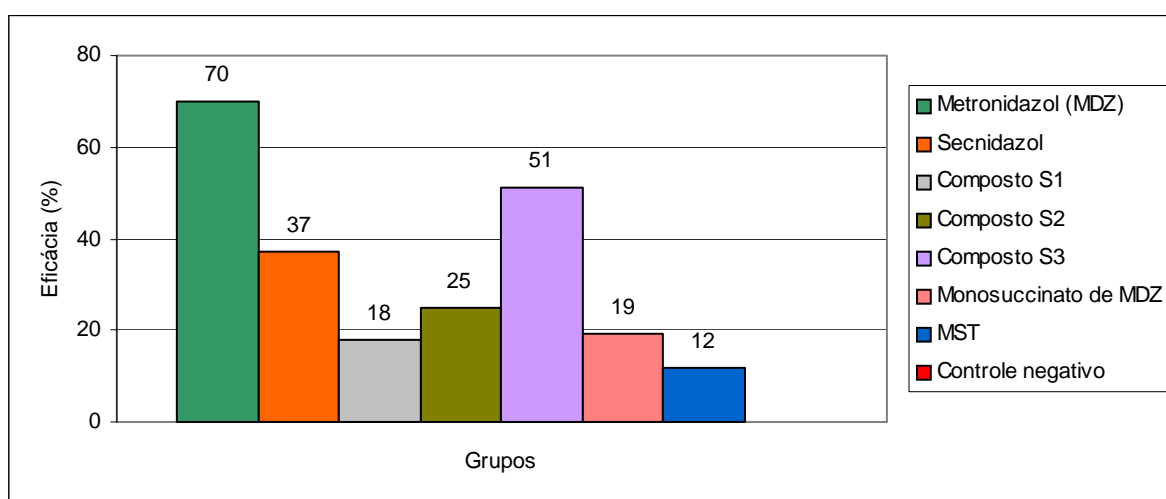


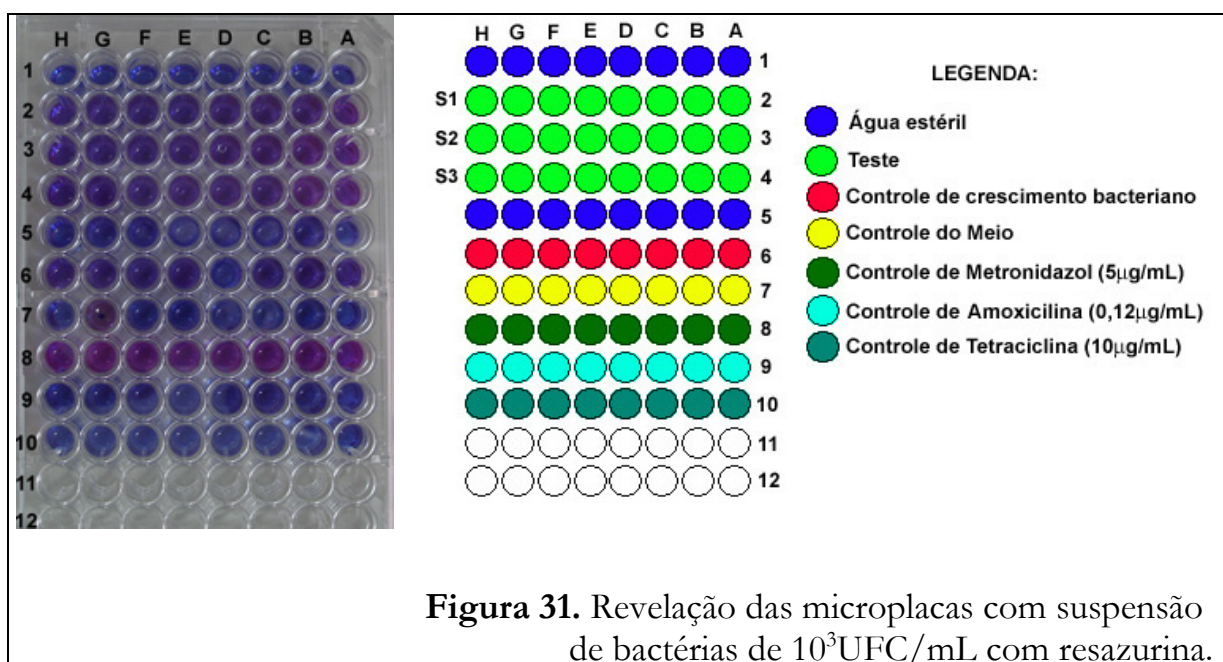
Figura 30. Percentual de eficácia na inibição do número de UFC/placa, no tratamento de ratos com *Helicobacter pylori*, após tratamento de 7 dias (500mg/70Kg; 2x/dia).

4.7 Resultado da análise histológica

A análise histológica foi realizada em um estudo piloto, ficando as amostras para análise posterior não constantes deste trabalho de tese.

4.8 Discussão do método de diluição em microplacas.

Devido o primeiro procedimento deste teste, ter mostrado-se ineficiente quanto ao crescimento bacteriano pelas leituras no espectrofotométricas (relação entre absorbância e N° de UFC) e revelação com a resazurina (figura 31), repetiu-se o mesmo procedimento, com outra suspensão de bactéria na concentração de 10^3 UFC/mL, que deveria favorecer seu crescimento em meio líquido, uma vez que há um número menor de microrganismos competindo pelos nutrientes do meio. Contudo o segundo experimento também mostrou-se ineficaz, onde mantinha-se o resultado de não crescimento microbiano em todos os poços, inclusive o do controle negativo (figura 31).



O não crescimento bacteriano ou crescimento insuficiente, pode ter ocorrido devido: (1) a pequena quantidade de amostra bacteriana ($30\mu\text{L}$); (2) ao tempo de incubação inapropriado; (3) a ausência de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultura. Sendo que o SFB poderia ter sido utilizado, uma vez que a taxa de ligação do metronidazol à proteínas plasmáticas como a albumina é baixa.

A revelação por rezasurina também não mostrou-se eficaz, provavelmente pela baixa taxa de crescimento bacteriano e pela baixa saturação de oxigênio no meio.

4.9 Discussão da metodologia de difusão em ágar

A ausência de halo de inibição (figura 26), em todos os compostos testados (S1, S2, S3, secnidazol e metronidazol) não indica necessariamente ausência de atividade antimicrobiana, pois devido ao caráter químico desses compostos, pode ter ocorrido a não difusão dos mesmos dos discos para o meio de cultura, o que explicaria a ausência do halo no disco contendo metronidazol com concentrações bem acima de sua Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Uma possível solução para este problema seria repetir o teste, substituindo o solvente utilizado para diluir os compostos por um agente tensoativo como o Tween 80.

4.10 Discussão da metodologia de atividade “in vivo” contra *Helicobacter pylori*

Após o estudo estatístico (figuras 27, 28, 29 e 30) pode-se concluir que:

1. Os compostos S1, S2, monossuccinato de metronidazol e MST são estatisticamente diferentes do controle negativo, portanto possuem atividade contra o *Helicobacter pylori*, mas esta é inferior à atividade do metronidazol e do secnidazol.
2. O composto S3 possui comportamento estatístico diferente do metronidazol e do secnidazol, contudo possui atividade contra o *Helicobacter pylori*, intermediária a desses fármacos de referência.

4.11 Referências.

BITTENCOURT, P.F.S. et al. Gastroduodenal peptic ulcer and *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents (Úlcera péptica e *Helicobacter pylori* em crianças e adolescentes). **Jornal de Pediatria**. v.82, n.5, 2006.

CHAND, S. et al. Rapid screening of antimicrobial activity of extracts and natural products. **J. Antibiotic**. v.47, p. 1295-1304, 1994.

CLSI(NCCLS); OPAS; ANVISA. **Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo**. v.25, n.1, p. 139-148, sd.

CUSTÓDIO, R.O. et al. Identificação do *Helicobacter pylori* pela citologia do escovado gástrico: comparação com o método histológico (*Helicobacter pylori* identification by brush gastric cytology:a comparison with histologic method). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.38, n.4, p.322-325, 2005.

DEVIENNE, K.F; RADDI, M.S. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Brazilian Journal Microbiology**. v.33, p.166-168, 2002.

ELLOF, J.N.A. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extract for bacteria. **Planta Médica**. v.64, p.711-13, 1998.

ESTAT - **Sistema para Análises Estatísticas (ver 2.0)** – UNESP. PCAV; Campos de Jaboicabau. Polo computacional / Departamento de Ciências Exatas.

FALK, P. et al. An in vitro adherence assay reveals that *Helicobacter pylori* exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 90 (1993)

FREITAS, D.D. et al. Efeito Da Infecção Pelo *Helicobacter pylori* na apoptose e na proliferação celular da mucosa gástrica, em doentes com Dispepsia Funcional. **J. Port. Gastrenterol**. v.9, p.178-186, 2002.

GABRIELSON, J. et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **J. Microb. Methods**. v.50, p.63-73, 2002.

GRAHAM, D.Y. Therapy of *Helicobacter pylori*: current status and issues. **Gastroenterology**. v.118, p.S2-8, 2000.

MAGALHÃES, M. ***Helicobacter pylori* droga resistente: novo desafio em gastroenterologia**. disponível em: www.laboratoriolpc.com.br/artigo18.shtml. Acesso em: 09/06/2008.

MOHAMMED, I; et al. Antimicrobial activity of *Sapindus mukorossi* and *Rheum emodi* extracts against *H pylori*: In vitro and in vivo studies. **China World J. Gastroenterol**. v.12, n.44, p.7136-7142, 2006.

MONTEJANO, H.A. et al. The excited-states quenching of resazurin and resorufin by p-benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**. n.64. p. 117-124, 2005.

PALOMINO, J.C. et al. Rezazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents. Chemother**. v.46, n.8, p. 2720-2722, 2002.

PING, T.M. et al. *Helicobacter pylori* infection and the murine gastric microbiota. **American Society for Microbiology**. 2006.

SALGADO, F. Increased in-vitro and in-vivo biological activity of lipopolysaccharide extracted from clinical low virulence vacA genotype *Helicobacter pylori* strains. **J. Med. Microbiol**. v.51, p. 771–776, 2002.

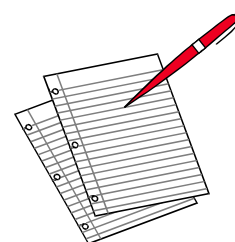
SANCHES, A.C.C. **Estudo Farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* B; Atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante de seus extratos**. Araraquara, 2004. 214 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, 2004.

SGOURAS, D. et al. In Vitro and In Vivo Inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* Strain Shirota. **Applied And Environmental Microbiology**. v.70, n.1, p.518–526, 2004.

TOUATI, E. et al. Short-term infection with *Helicobacter pylori* and 1 week exposure to metronidazole does not enhance gastric mutation frequency in transgenic mice. **J. of Antimicrobial Chemotherapy**. v.46, p.987-992, 2000.

WANG, X. et al. Inhibition of *Helicobacter Pylori* infection by bovine milk glycoconjugates in a BALB/cA mouse model. **J. Med. Microbiolog.** v.50, p. 430-435, 2001.

XIUPING, J; MICHAEL, P.D. Growth Supplements for *Helicobacter pylori*. **J. of Clinical Microbiology**. v.38, n.5, p.1984 –1987, 2000.



Capítulo 5

Concluões e Ppectsivas.

Neste capítulo estão apresentadas as conclusões desta tese de doutorado, envolvendo o processo de latenciação no desenvolvimento de novos fármacos com atividade contra o *Helicobacter pylori*.

5. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

Os pró-fármacos monosuccinato de metronidazol, monosuccinato de tiouréia (MST), S1, S2 e S3 foram obtidos com êxito.

Todos os compostos supracitados apresentaram algum tipo de atividade “in vivo” contra o *Helicobacter pylori*, porém quando comparados ao metronidazol, essa atividade não é tão significativa. Contudo quando esta comparação é feita em relação ao seu fármaco matriz (o secnidazol), o composto S3 (ácido 5-[1-metil-2-(2-metil-5-nitro-imidazoil)etóxi]-5-oxopentanóico) demonstra atividade superior a este, provavelmente pela modificação molecular ter facilitado o acesso do fármaco ao interior da bactéria possivelmente por canais presentes na estrutura da bactéria.

O monosuccinato de tiouréia (MST) apresentou rendimento muito baixo pela via de síntese proposta, além do fato de ser o detentor do menor percentual de eficácia contra o *Helicobacter pylori*. Estes resultados tornam desinteressantes o prosseguimento dos estudos com esta molécula.

Em continuidade a este trabalho, é interessante o desenvolvimento e ensaio antimicrobiano de novos fármacos oriundos da ligação da tiouréia (inibidor de urease) com moléculas dos compostos (antimicrobianos) monosuccinato de metronidazol, S1, S2 e S3, com a finalidade de se otimizar a atividade “in vivo” (por ação sinérgica) contra o *Helicobacter pylori*.

Anexos



Parecer do Comitê de Ética.

*Procedimentos de síntese dos
compostos propostos.*

Anexo 1. Parecer comitê de ética.**unesp**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 23/2007

Interessados: ANTONIO TÁVORA DE ALBUQUERQUE SILVA

Orientador: Profa. Dra. Chung Man Chin

Projeto: Desenvolvimento de pró-fármacos derivados de secnidazol potencialmente ativos contra *Helicobacter pylori***Parecer nº 10/2008 – Comitê de Ética em Pesquisa**

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Desenvolvimento de pró-fármacos derivados de secnidazol potencialmente ativos contra *Helicobacter pylori*", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em junho de 2008.

Araraquara, 8 de abril de 2008.


Prof. Dr. AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

Anexo 2. Procedimentos de síntese dos compostos propostos.

⊗ Síntese do composto S1.

Adicionar em 30mL de metanol aquecido a 60°C, 3,3g secnidazol, esperando dissolver todo o secnidazol; em seguida adicionar 2 mL de NaOH (15N) e esperar 5 minutos; adicionar mais 2,0g de anidrido succínico; deixar em refluxo com agitação a 60°C por 2 horas controlando o pH sempre acima de 7,0. Após 2 horas, forçar a re-cristalização do secnidazol que não reagiu “overnight” com refrigeração entre 4 a 8°C, filtrar e rota-evaporar o solvente onde o compsto S1 (monosuccinato de secnidazol) está solúvel.

⊗ Síntese do composto S2.

Adicionar em 100mL de metanol aquecido a 60°C, 3,1g secnidazol, esperando dissolver todo o secnidazol; em seguida adicionar 2 mL de NaOH (15N) e esperar 5 minutos; adicionar mais 2,0g de anidrido diglicólico; deixar em refluxo com agitação a 60°C por 5 horas e a 25°C por mais 19 horas, controlando o pH sempre acima de 7,0. Após 24 horas, forçar a re-cristalização do secnidazol que não reagiu “overnight” com refrigeração entre 4 a 8°C, filtrar e rota-evaporar o solvente onde o compsto S2 está solúvel.

⊗ Síntese do composto S3.

Adicionar em 60mL de metanol aquecido a 60°C, 3,0g secnidazol, esperando dissolver todo o secnidazol; em seguida adicionar 2 mL de NaOH (15N) e esperar 5 minutos; adicionar mais 2,5g de anidrido glutárico; deixar em agitação a 25°C por 5 horas controlando o pH sempre acima de 7,0. Após 5 horas, forçar a re-cristalização do secnidazol que não reagiu “overnight” com refrigeração entre 4 a 8°C, filtrar e rota-evaporar o solvente onde o compsto S3 (monosuccinato de secnidazol) está solúvel.

⊗ Síntese do monosuccinato de metronidazol.

Adicionar em 10mL de metanol aquecido a 60°C, 0,315g metronidazol, esperando dissolver todo o metronidazol; em seguida adicionar 2 mL de NaOH (1N) e esperar 5 minutos; adicionar mais 0,2g de anidrido succínico; deixar em refluxo com agitação a 60°C por 2 horas controlando o pH sempre acima de 7,0. Após 2 horas, forçar a re-cristalização do metronidazol que não reagiu “overnight” com refrigeração entre 4 a 8°C, filtrar e rota-evaporar o solvente onde o monosuccinato de metronidazol está solúvel.

⊗ Síntese do monosuccinato de tiouréia.

0,76g de tiouréia foram misturados a 1,0g de anidrido succínico e aquecido à 180°C durante 25 minutos. Após a fusão do anidrido succínico, a mistura de forte coloração amarelada torna-se completamente sólida. Em seguida adiciona-se 30mL de água e a mesma é aquecida até 80°C. Após filtração do material insolúvel, o líquido amarelo é re-cristalizado durante 24 horas, obtendo-se um cristal amarelo.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)