



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E
MODELAGEM MOLECULAR

LANALICE RODRIGUES FERREIRA

**PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE ANÁLOGOS DA
NITAZOXANIDA**

BELÉM – PARÁ
2018

LANALICE RODRIGUES FERREIRA

**PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE ANÁLOGOS DA
NITAZOXANIDA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Química Medicinal e Modelagem molecular.

BANCA EXAMINADORA

Rosivaldo dos Santos Borges – UFPA/PPGQMMM – Orientador

Carlos Augusto Lima Barros – UFPA/PPGQMMM – Avaliador Interno

Andrei Leitão – USP/IQSC – Avaliador Externo

Osmarina Pereira da Paixão e Silva – UFPA – Suplente

Data da Defesa ____/____/____.

BELÉM – PARÁ
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

F383p Ferreira, Lanalice Rodrigues.
Planejamento e desenvolvimento de análogos da nitazoxanida / Lanalice Rodrigues Ferreira. — 2018.
51 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular,
Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

1. Nitazoxanida. 2. Relação atividade-estrutura. 3. Nitrocompostos. I. Título.

CDD 615.19

Ao princípio de tudo, DEUS e a minha família.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Pai, inteligência soberana e ao Mestre Jesus, luz do mundo, pela vida e pela realização de um sonho meu e de minha família.

À minha família tão amada por ter permanecido ao meu lado em todos os momentos, em especial, aos meus pais Lenalice e Ricardo por todo amor e paciência; aos meus irmãos Rafael e Luciana pelos momentos felizes e de provações; aos meus sobrinhos amados Gabriel e Kauan, pois desde o ventre já me incentivam a ser uma pessoa melhor e a minha avó Raimunda pela companhia, pela força e por ser exemplo de mulher guerreira.

Ao Dr^a Rosivaldo dos Santos Borges, meu orientador, pelo acolhimento no grupo de pesquisa NESBio. Pelo compartilhamento do saber cotidiano e pelo amplo conhecimento sobre química repassado, pela paciência, dedicação e confiança. Paz e bem!

A Universidade Federal do Pará – UFPA, pela oportunidade de qualificação na minha formação.

A minha amada amiga Ivanete Palheta, companheira de trabalho e da vida, por todo incentivo, confiança e paciência. Por sempre se fazer presente em minha vida.

Aos demais colegas de laboratório que direta ou indiretamente contribuíram para meu engrandecimento, sucesso para todos!

Aos professores integrantes da banca que se disponibilizaram a avaliar e contribuir com o trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A nitazoxanida é uma molécula aplicada na terapêutica como anti-helmíntico, antiparasitário de amplo espectro. Estudos biológicos com esta molécula buscam novos alvos terapêuticos e obtém bons resultados. O objetivo do trabalho foi o planejamento e desenvolvimento de novos derivados estáveis de nitazoxanida. Os cálculos de propriedades eletrônicas – orbitais de fronteira (HOMO e LUMO), potencial de ionização (PI) e afinidade eletrônica (AE), mapa do potencial eletrostático (MPE) – foram realizados usando os pacotes Gaussview e Gaussian. O estudo teórico de nove derivados amino-nitro-azólicos, grupamento, farmacóforo da nitazoxanida, foi realizado usando o método DFT/ B3LYP/6-31G(d,p) e indicaram que modificações no anel tiofeno podem reduzir o potencial redox do composto alterando reatividade e a toxicidade. Nossos resultados confirmam que estes derivados se comportam como melhores eletrófilos, destacando a presença do grupo nitro. Estes resultados são visualizados nos mapas de potenciais eletrostáticos demonstrando regiões que indicam prováveis ataques eletrofilicos. Parâmetros físico-químicos de análogos da nitazoxanida também foram avaliados usando o método DFT/ B3LYP/6-31+G(d,p). Os resultados indicam um aumento significativo na capacidade doadora de elétrons dessas novas moléculas a partir dos valores de HOMO, LUMO e GAP. A adição de mais um grupo nitro nos derivados indicaram maiores estabilidades e maior capacidade de aceitação de elétrons, o que é essencial para atividade biológica de nitrocompostos. Os mapas de potenciais eletrostáticos da nitazoxanida e seus análogos evidenciam a densidade de carga negativa sobre a região que apresenta o grupo nitro de forma significativa, a qual se relaciona com as moléculas derivadas do amino-nitro-azólicos. Além disso, foi realizada uma análise conformacional da nitazoxanida, tizoxanida e um derivado nitazoxamida, obtendo as menores conformações de energia em Kcal/mol obtidas por DFT/B3LYP/6-31G (d, p). O conformero de menor energia da nitazoxanida está de acordo com a estrutura experimental cristalográfica. As estruturas mais estáveis dos derivados são compatíveis em termos de similaridade conformacional. A molécula nitazoxanida e mais três derivados foram sintetizados e são capazes de serem disponibilizados para avaliação biológica para futuros trabalhos.

Palavras-chave: nitazoxanida, relação estrutura-atividade, nitrocompostos.

ABSTRACT

Nitazoxanide is a molecule applied in the antihelminthic therapy and has a broad spectrum as antiparasitic agent. In biological studies by using this molecule, new therapeutic targets and good results were found. Nevertheless, it still has some chemical and pharmaceutical problems which need improvements. The objective of the study is the design and development of stable nitazoxanide derivatives using molecular modeling and organic synthesis approaches. All calculations of electronic properties such as frontier orbital (HOMO and LUMO), ionization potential (IP) and electronic affinity (AE), electrostatic potential map (MPE) were performed using the Gaussview e Gaussian. The theoretical study of nine amino-nitro-azolic derivatives, an essential moiety of nitazoxanide pharmacophore, was performed using the DFT/B3LYP/6-31G (d,p) method and showed that thiophene ring modifications can reduce the redox potential changing the reactivity and toxicity. All derivatives have better electrophilic properties and depends on the presence of nitro group. These results are confirmed by maps of electrostatic potentials and can indicated the most reactive regions that probable act on electrophilic attacks. Physicochemical parameters of nitazoxanide analogues were also evaluated using the DFT/B3LYP/6-31+G (d,p) method. A significant increase in the electron donating capacity for these new molecules from the HOMO, LUMO and GAP values was observed. An additional nitro group on ring structure beget compounds that have great stability and electron-accepting capacity. This electronic property is essential for biological activity on nitro compounds. The electrostatic potentials for nitazoxanide and its related analogues show the significant negative charge density on the nitro region. In addition, a conformational analysis of nitazoxanide, tizoxanide and a nitazoxamide derivatives was performed. The lower conformer of nitazoxanide agrees with the crystallographic structure. The more stable structures of the derivatives are related to their conformational similarity. The nitazoxanide molecule and three other derivatives have been synthesized and are available for biological evaluation on future works.

Keywords: nitazoxanide, structure-activity relationship, nitrocompounds.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 GERAL	12
2.2 ESPECÍFICOS	12
3. REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS	13
3.2 NITROCOMPOSTOS	14
3.3 NITAZOXANIDA	17
3.3.1 Aspectos químicos	17
3.3.2 Farmacocinética	19
3.3.3 Mecanismo de ação	20
3.3.4 Atividades biológicas	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 MODELAGEM MOLECULAR	25
4.1.1 Potencial de Ionização (PI) e Afinidade eletrônica (AE)	25
4.1.2 Energia dos Orbitais de Fronteira (HOMO e LUMO) e GAP	25
4.1.3 Mapa do potencial eletrostático	26
4.2 COMPOSTOS ESTUDADOS	26
4.3 METODOLOGIA SINTÉTICA	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 MODELAGEM MOLECULAR	29
5.1.1 Estudo teórico de derivados amino-nitro-azólicos	29
5.1.2 Estudo teórico dos análogos da nitazoxanida	34
5.1.3 Análise conformacional da nitazoxanida e análogos	38
5.2 SÍNTESE DA NITAZOXANIDA E ANÁLOGOS PROPOSTOS	40
6. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural da nitazoxanida	10
Figura 2: Reação de hidrólise da nitazoxanida obtendo como produto a tizoxanida	11
Figura 3: Fórmulas estruturais dos nitrofuranos	15
Figura 4: Estrutura de fármacos que apresentam o grupo nitro	15
Figura 5: Fórmulas estruturais da nitazoxanida e seus principais metabólitos: a tizoxanida e glicuronídeo de tizoxanida	17
Figura 6: Fórmula estrutural da NTZ destacando grupamentos importantes para ação biológica da molécula	18
Figura 7: Proposta de via metabólica da NTZ	20
Figura 8: Representação da estrutura PFOR determinada por cristalografia de raios-x	21
Figura 9: Mecanismo de ação da nitazoxanida em bactérias	22
Figura 10: Derivados simplificados amino-nitro-azólicos da nitazoxanida	27
Figura 11: Análogos da nitazoxanida	27
Figura 12: Estruturas otimizadas pelo método B3LYP/6-31G (d,p) de análogos da nitazoxanida	29
Figura 13: Orbitais de fronteira dos derivados amino-nitro-azólicos	32
Figura 14: Mapa do potencial eletrostático dos derivados amino-nitro-azólicos	33
Figura 15: Estruturas otimizadas pelo método B3LYP/6-31+G(d,p) de análogos da nitazoxanida	34
Figura 16: Fórmulas estruturais das moléculas TZN e TZM	35
Figura 17: Fórmulas estruturais das moléculas N-TZN e N-TZM	35
Figura 18: Orbitais de fronteira dos análogos da nitazoxanida	36
Figura 19: Mapa do potencial eletrostático da NTZ e análogos	38
Figura 20: Estruturas utilizadas no estudo de análise conformacional	39

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Metodologia sintética para a preparação da nitazoxanida	28
Esquema 2: Metodologia sintética para obtenção da tizoxanida	28
Esquema 3: Metodologia sintética para a preparação da nitazoxamida	28
Esquema 4: Metodologia sintética para a preparação do derivado nitro-nitazoxamida.....	28
Esquema 5: Síntese da nitazoxanida.	40
Esquema 6: Síntese da tizoxanida	40
Esquema 7: Síntese da nitazoxamida	41
Esquema 8: Síntese da nitro-nitazoxamida	41

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas geram graves problemas que acompanham o crescimento da população mundial, com ênfase para as infecções intestinais de origem helmíntica, protozoária, viral ou bacteriana (SCIOR *et al.* 2015). Novas drogas são desenvolvidas para o tratamento destas doenças, no entanto, as resistências aos medicamentos torna-se um problema, especialmente em infecções bacterianas, pois reduz a disponibilidade de fármacos eficazes (HELPHILL *et al.* 2006; FUJIWARA *et al.* 2018).

A era de descobertas de antibióticos reduziu mundialmente as taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções bacterianas (ADEDEJI, 2016). A capacidade de bactérias resistirem ao efeito do antibiótico para o qual foram inicialmente sensíveis tornam-se uma ameaça diante desta conquista (MUNITA & ARIAS, 2016).

A resistência antibacteriana foi uma preocupação reconhecida por Alexander Fleming ainda no início da era dos antibióticos e, atualmente, é uma questão preocupante para agências de saúde, mídia e líderes em nível mundial (FLEMING, 1945; SHILLACI *et al.* 2017). Em 2016 a Organização Mundial da Saúde (OMS) solicitou uma lista prioritária de bactérias resistentes aos antibióticos para apoiar a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos eficazes (TACCONELLI *et al.* 2018).

A nitazoxanida – **NTZ** (Figura 1) é um medicamento de amplo espectro, comercializada nos Estados Unidos da América como um composto anti-infeccioso licenciado (Alinia[®], Romark Laboratories, Tampa, FL) para tratamento de enterite causada por *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* em crianças e adultos (ROSSIGNOL *et al.* 2009a). No Brasil, é comercializado sob o nome comercial de Annita[®] indicado como anti-helmíntico, antiparasitário de amplo espectro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

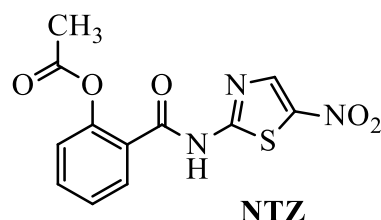


Figura 1. Fórmula estrutural da nitazoxanida.

Apesar da **NTZ** conter grupamentos nitros, uma classe terapêutica caracterizada por sua expressiva toxicidade, estudos relatam que não há toxicidade relevante desta molécula (BOSQUESI *et al.* 2008). De forma seletiva é capaz de bloquear a replicação do vírus da

hepatite C, assim, este mecanismo fornece uma alternativa para explicar a baixa taxa de toxicidade desta molécula (ELAZAR *et al.* 2009; KHATTAB *et al.* 2009).

Outras questões relativas da **NTZ** é sua capacidade de atuar como pró-fármaco, liberando por reação de hidrólise enzimática seu composto bioativo tizoxanida – **TZX** (Figura 2) bem como a influência do grupo acetil em suas propriedades de ADMETox (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) (STOCKIS *et al.* 1996).

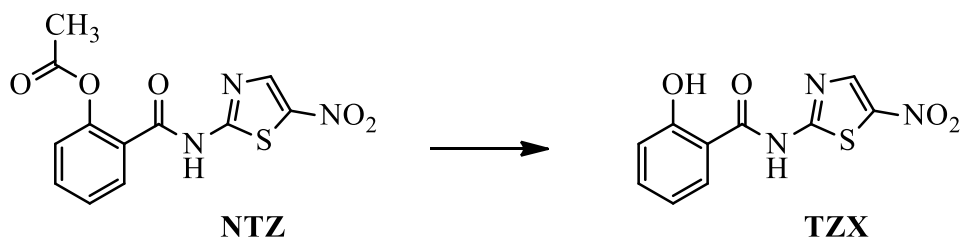


Figura 2. Reação de hidrólise da nitazoxanida obtendo como produto a tizoxanida.

Entre os patógenos prioritários listados pela OMS para pesquisas e desenvolvimento de novos antibióticos encontram agentes que se correlacionam com estudos de atividades biológicas da **NTZ**. Na lista de prioridade de patógenos críticos encontram-se *Enterobacteriaceae*, dentre estas a *Escherichia coli*, para a qual há estudos que indicam a **NTZ** como candidata a prevenção de infecções causada por este patógeno (SHAMIR *et al.* 2010; BOLICK *et al.* 2013). *Pseudomonas aeruginosa* resistente à meticilina (MRSA) faz parte da lista de prioridades altas e a **NTZ** e seu metabólito ativo, a **TZX**, inibiram crescimento *in vitro* cepas de MRSA (TCHOUAFFI-NANA *et al.* 2010).

Ainda na lista de prioridades altas a bactéria *Helicobacter pylori*, resistente a claritromicina, foi um importante patógeno estudado para determinar o mecanismo de ação da molécula **NTZ** (SISSON *et al.* 2002; HOFFMAN *et al.* 2007), além de estudos que indicam que a **NTZ** é uma molécula não-mutagênica, quando relacionada com o metronidazol, demonstrando eficácia antibacteriana, desempenhando um papel fundamental na obtenção de avanços para a introdução de drogas na terapêutica, podendo atuar no reposicionamento farmacêutico (HEMPHILL *et al.* 2006; VENTOLA, 2015).

Diante de uma crise de produtividade na descoberta de novos fármacos, empresas biofarmacêuticas recorrem a farmacopeias existentes na intenção de reposicionar medicamentos para novos usos terapêuticos, buscando reduzir custos e tempo de inserir medicamentos no mercado, apoiados na disponibilidade de dados farmacocinéticos,

toxicológicos e de segurança previamente verificados (ASHBURN & THOR, 2004; PADHY & GUPTA, 2011). Ainda neste campo de redução de custos de desenvolvimento de fármacos, a Química Medicinal que investiga fármacos seguros e potentes evoluiu de forma significativa planejando, sintetizando e avaliando moléculas candidatas a fármacos (SATYANARAYANAJAIS & HILL, 2011).

O planejamento de forma racionalizada, amparada por métodos que possibilitam análises prévias de moléculas bioativas, intensifica o processo de descobertas de drogas contribuindo na triagem e identificação de parâmetros químicos fundamentais, sendo caracterizado como um processo rápido, integrado e altamente direcionado (OSAKWE, 2016).

Neste contexto, há algum tempo o Núcleo de Estudo e Seleção de Moléculas Bioativas (NESBio) da Universidade Federal do Pará (UFPA) desenvolve moléculas bioativas com elevado valor químico, farmacêutico e medicinal. Os estudos incluem trabalhos envolvendo nitrocompostos, dos quais obtiveram-se correlações dos cálculos teóricos com análise biológicas, investigando possíveis mecanismos de ação de moléculas bioativas e seus derivados (VALE *et al.* 2013; BORGES *et al.* 2015)

Assim, o principal objetivo deste estudo é o desenvolvimento de análogos da nitazoxanida, através da aplicação de métodos teóricos para elucidação das propriedades físico-químicas e reatividade da nitazoxanida e seus novos derivados, capazes de serem sintetizados e disponibilizados para avaliação biológica.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Planejar e desenvolver novos derivados estáveis de nitazoxanida por meio de modelagem molecular.

2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar uma análise estrutural da nitazoxanida;
- Apresentar novos derivados da nitazoxanida com maior estabilidade química e metabólica;
- Descrever suas propriedades físico-químicas teóricas obtidas por modelagem molecular;
- Propor sínteses para novos derivados da nitazoxanida.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

De modo conceitual, a Química Medicinal preocupa-se com planejamentos, identificações e preparações de compostos biologicamente ativos. De forma interdisciplinar possui como foco racionalizar a ação dos fármacos a nível molecular (WERMUTH *et al.* 1998; BARREIRO, 2009).

Ligadas às inovações científicas e tecnológicas, o planejamento e o desenvolvimento de fármacos são processos complexos, longos e de altos custos (GUIDO *et al.* 2008a). Os planejamentos podem ser amparados por programas computacionais de química que permitem análises teóricas de atividades biológicas e propriedades físico-químicas das moléculas, sendo auxiliado por outras áreas, como química orgânica, química quântica, físico-química, química inorgânica, bioquímica, biologia molecular, a farmacologia e a toxicologia, as quais conjuntamente definem a Química Medicinal (MONTANARI, 2000; CARVALHO *et al.* 2003).

Novos fármacos podem ser planejados por análise de dados teóricos de estrutura-atividade de forma tradicional por meio da técnica de modelagem molecular, a qual investiga estrutura e propriedades moleculares utilizando a química computacional e técnicas de visualização gráfica (SANT'ANNA, 2002).

Por meio de cálculos computacionais (mecânica molecular, métodos semi-empíricos, cálculos *ab initio*) é possível prever propriedades, como: energia de formação, energia de ativação, momento dipolo, características de orbitais moleculares, polarizabilidades, caráter hidrofóbico, coeficiente de partição (logP) (COHEN, 1996; SANT'ANNA, 2002).

Entre as ferramentas mais utilizadas de aplicação da mecânica quântica para solução de problemas químicos está a Teoria do Funcional de Densidade (*Density Functional Theory* – DFT), utilizada para a determinação de propriedades de um sistema a partir de um funcional da densidade eletrônica do sistema estudado (BURKE, 2012).

Para uma correlação mais precisa do funcional para a energia de troca e de correlação pode-se aplicar o método DFT juntamente com o modelo do funcional de troca híbrido de três parâmetros de Becke e do funcional de correlação de Lee-Yang-Parr (B3LYP) (LEE *et al.* 1998). Esta relação é amplamente utilizada em literaturas aplicadas em cálculos computacionais

de química medicinal devido a qualidade de seus resultados (BARREIRO & FRAGA, 2008 KUMAR *et al.* 2012).

Diante destas propriedades podem-se atingir os objetivos mais específicos da modelagem molecular, à saber: visualização tridimensional e análise conformacional de fármacos; estudar o grupo farmacofórico; verificar a importância da natureza e grau de substituição de grupos funcionais; observar os aspectos estereoquímicos dos fármacos e sua relação com a atividade biológica; relacionar a estrutura e as propriedades físicas de uma mesma série de fármacos; prever os mecanismos moleculares envolvidos na ação dos fármacos (CARVALHO *et al.* 2003).

Os aspectos teóricos das simulações computacionais, podem descrever resultados experimentais, além de fornecer explicações e subsídios para preceder a execução dos ensaios biológicos (MONTANARI, 2000). Entre os estudos prévios que relacionam estrutura química e atividade biológica, as propriedades de ADMETox devem ser consideradas para que as falhas no final do processo de planejamentos e análises das moléculas sejam amenizadas e os cálculos computacionais possam prever as atividades especuladas (VAN DE WATERBEEMD & GIFFORD, 2003; SCOTTI *et al.* 2007).

3.2 NITROCOMPOSTOS

Ainda que o número de agentes terapêuticos disponíveis para tratamentos diversos seja significativo, estes são comprometidos por fatores essenciais, tais como: incidência de resistência microbiana, efeitos colaterais e tóxicos, baixa eficácia e seletividades (PAULA *et al.* 2009).

O planejamento de novos derivados bioativos torna-se alternativa para a introdução de terapias eficazes, sendo necessário o conhecimento e as estratégias da influência ao se introduzir grupos químicos específicos, atentando para as propriedades físico-químicas e eletrônicas da molécula, e, assim, sua eficácia biológica (WERMUTH, 2003).

Os nitrocompostos foram introduzidos na terapêutica na década de 40, testados em diversas doenças, sendo os nitrofuranos os primeiros compostos nitroheterocíclicos usados, entre estes o nitrofural (nitrofurazona) (**1**), a furazolidona (**2**) e a nitrofuratoína (**3**) demonstrado na Figura 3, sendo empregados por mais de 50 anos como antibacterianos (RAETHER & HÄNEL, 2003; BOSQUESI *et al.* 2009).

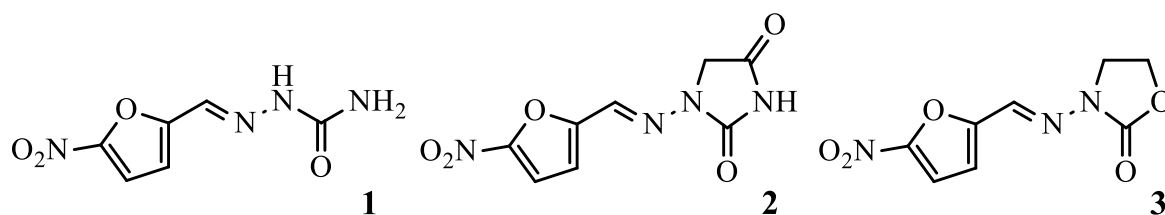


Figura 3. Fórmulas estruturais dos nitrofuranos: nitrofurazona (1), nitrofuratoína (2) e furazolidona (3).

Os grupos nitros são encontrados em potentes agentes terapêuticos, tais como em fármacos antibacterianos como: metronidazol (4), secnidazol (5), tinizadol (6); anti-inflamatório: nimesulida (7); ansiolíticos: nitrazepam (8), clonazepam (9) (Figura 4) (BOSQUESI *et al.* 2008; PAULA *et al.* 2009).

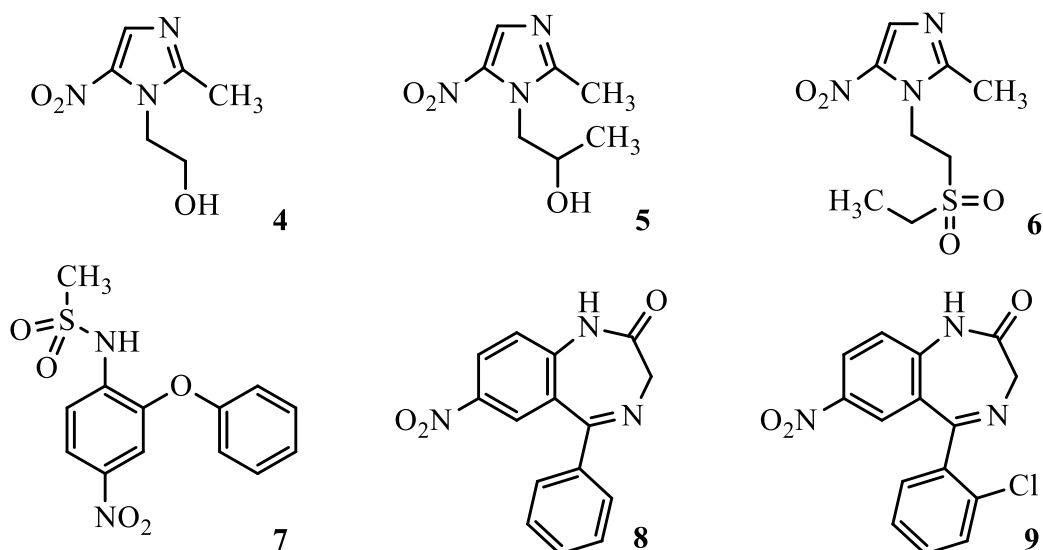


Figura 4. Estrutura de fármacos que apresentam o grupo nitro: metronidazol (6), scnidazol (7), tinizadol (8), nimesulida (11), nitrazepam (11), clonazepam (12).

Os mecanismos de ação destes nitroderivados ainda não estão completamente elucidados em nível molecular, visto que depende das diferenças estruturais dos compostos. As atividades biológicas destes compostos é, geralmente, dependente da presença do grupo nitro, resultando em mudanças na estabilidade da molécula intermediada por interações entre estes nitrocompostos e seu alvo biológico (TAMULIENE *et al.* 2017).

Compreende-se que o mecanismo de ação dos nitrocompostos envolve, primeiramente, uma ou mais reações de redução do grupo nitro, característica resultante do caráter intensamente acceptor de elétrons, acompanhadas de inibição de enzimas metabólicas essenciais às exigências energéticas da célula de parasitas (VIODÉ *et al.* 1999; YAN *et al.* 2005; MAYA *et al.* 2007).

Ainda que haja potentes fármacos que apresentam o grupo nitro em suas moléculas, estes são alvos de inúmeras discussões que apontam elucidacões de sua toxicidade. Bartel *et al.* (2007) investigaram a açao do antichagásico do nifurtimox, este demonstrou alteracões estruturais em tecido cardíaco de ratos alertando melhor atencao quanto a dosagem para pacientes com pré-disposicao a doencas cardíacas. Bartel *et al.* (2010) relataram que a administracao de nifurtimox foi prejudicial para o tecido mamário de ratos e, assim, podendo se relacionar com a toxicidade.

Ao se tratar da introducao do grupamento nitro para elucidacao de novos compostos bioativos, a partir de modificacões moleculares, baseadas nas propriedades físico-químicas destes, é importante destacar que estas sejam fundamentadas em estruturas com bioatividades comprovadas (PAULA *et al.* 2009).

Trabalhos que envolvem a modificacao estrutural de compostos que contém o grupamento nitro são amplamente empregados em estudos para o planejamento e desenvolvimento de possíveis agentes terapêuticos. De La Fuente *et al.* (2006) verificaram que moléculas que continham o grupo nitro demonstraram potentes atividades contra as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa* com valores de EC₅₀ de 0,42 µM.

Paraskevopoulos *et al.* (2015) relataram, em estudos *in vitro*, atividades em *Mycobacterium tuberculosis* de derivados de salicilanilidas, que apresentavam grupos nitro na sua parte salicilica, concentracões inibitórias (MIC) que variam de 2 a 32 µM, demonstrando significativa açao contra a bactéria em questao. Tumer *et al.* (2017) apresentaram, em estudos *in vitro*, derivados nitrobenzamidas com potenciais atividades anti-inflamatórias e não apresentando citotoxicidade dependente de dose de EC₅₀ de 3,7 e 5,3 µM.

O Núcleo de Estudo e Selecao de Moléculas Bioativas (NESBio) da Universidade Federal do Pará (UFPA) utilizando métodos de Química Medicinal, planejamento, síntese e avaliacao de moléculas bioativas candidatas a fármacos, investiga moléculas a partir dos métodos de modelagem molecular. Entre estes estudos há trabalhos envolvendo nitrocompostos, dos quais obtiveram-se correlacões dos cálculos teóricos com análise biológicas, investigando possíveis mecanismos de açao de moléculas bioativas e seus derivados.

Estudos biológicos indicaram atividade anti-inflamatória do 1-nitro-2-feniletano (NPE), e para tanto, um estudo sistemático comparou propriedades eletrônicas desta molécula com

aspirina e paracetamol (anti-inflamatórios não-esteroides). A análise teórica confirma relação do NPE com a aspirina e paracetamol, por possível interação com inibidores seletivos de prostaglandina endoperóxido estando relacionada com interações eletrofílicas, propriedade do NPE, mostrando possível relevância do grupo nitro (VALE *et al.*, 2013).

Investigações eletrônicas da nimesulida e derivados desta foram determinados por cálculos de DFT, identificando o comportamento redox dos grupamentos nitros e dos derivados com grupamentos amino sendo especulada a relação com o mecanismo anti-inflamatório da nimesulida, e identificando que a porção nitro é essencial no metabolismo biológico e no mecanismo da nimesulida (BORGES *et al.* 2015).

Nesta perspectiva, a utilização de nitrocompostos na terapêutica é presente e relevante, sendo eficazes em doenças negligenciadas com limitadas alternativas de tratamentos, em especial a resistência de micro-organismos aos fármacos. Para as questões de toxicidades de fármacos que apresentam grupamentos nitros, têm-se como alternativa a utilização de métodos da modelagem molecular, tal como a modificação da estrutura molecular para que possibilitem melhores perfis e se apresentem novos fármacos promissores (PAULA *et al.* 2009; BOSQUESI *et al.* 2008).

3.3 NITAZOXANIDA

3.3.1 Aspectos químicos

A Nitazoxanida (**NTZ**) é um composto nitrotiazol benzamida, [2-acetiloxi-N-(5-nitro-2-tiazolil) benzamida], sintetizado em 1974, de fórmula molecular $C_{12}H_9N_3O_5S$, com massa molecular 307,28 g/mol e ponto de fusão de 202°C. O composto é insolúvel em água e pouco solúvel em etanol (THE MERCK INDEX, 2013). A **NTZ** é rapidamente hidrolisada em sua forma farmacologicamente ativa, a tizoxanida (**TZX**) e, posteriormente, em glicuronídeo de tizoxanida (**GTZX**) (Figura 5) (BROEKHUYSEN *et al.* 2000; GARGALA *et al.*, 2000).

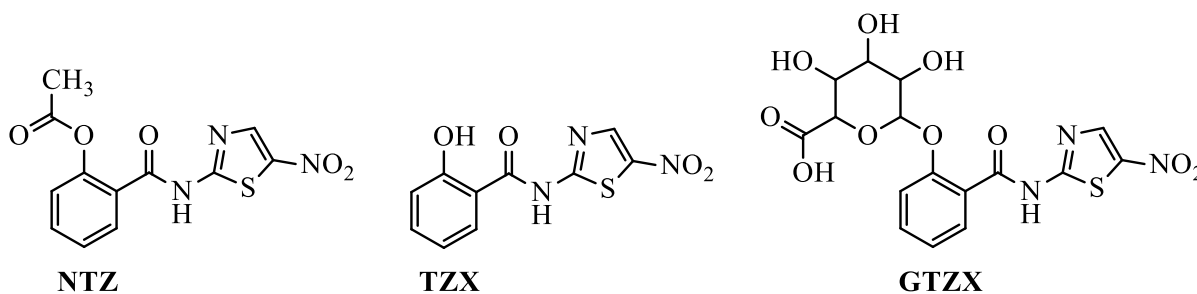


Figura 5. Fórmulas estruturais da nitazoxanida e seus principais metabólitos: a tizoxanida e glicuronídeo de tizoxanida.

Os fármacos são incluídos em classes de estruturas privilegiadas havendo eficiência ao interagir e modificar moléculas responsáveis pela vida, nesse contexto, a propriedade estrutural das moléculas é essencial para o planejamento e desenvolvimento de análogos bioativos (BORGES, 2017). Estudar a presença de grupos funcionais é altamente relevante, uma vez que estes determinam propriedades químicas e físicas das moléculas, sendo relacionado com a reatividade destas (NOGRADY & WEAVER, 2005).

Na estrutura química da molécula **NTZ** se destacam o anel heterocíclico, o grupo nitro e o grupo éster (Figura 6).

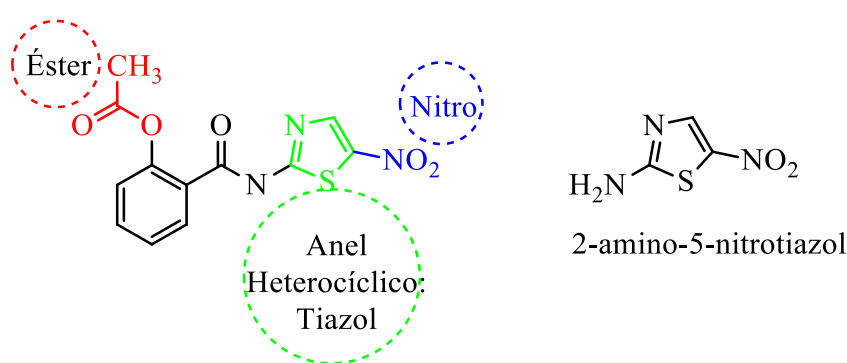


Figura 6. Fórmula estrutural da **NTZ** com destaque para grupamentos importantes para ação biológica da molécula.

O grupo éster altamente reativo sofre hidrólise produzindo o principal metabólito ativo, a **TZX**, tal como em outros fármacos representativos: procaína e aspirina (TANIGUCHI & GUENGERICH, 2009). Em planejamento de medicamentos, principalmente de administração oral que entrarão em contato uma variedade de possíveis ataques a integridade de suas estruturas químicas, o grupamento éster chama atenção por ser vulnerável, sob condições ácidas, às reações de hidrólises (NOGRADY & WEAVER, 2005).

O composto heterocíclico de cinco membros é marcado pela presença do anel tiazol, contendo átomo de enxofre e nitrogênio, sendo relevante para a química medicinal, presente em medicamentos sintéticos importantes, pois são amplamente destacados por suas atividades biológicas significantes, geralmente sendo o grupo farmacofórico (ROUF & TANYELI, 2015). Estudos de sistemas que possuem anel tiazol relatam baixa toxicidade e relevância para a síntese de fatores biológicos importantes (SAMADHIYA *et al.* 2013).

O anel tiazol compõe a cadeia do grupamento 2-amino-5-nitrotiazol, o qual tem sido alvo de estudos por estarem presente em outras moléculas que demonstram moderadas e boas

atividades antibacteriana, antifúngica, antituberculares e antitripanossomida (SAMADHIYA *et al.* 2013; SAMADHIYA *et al.* 2013; PAPADOPOULOU *et al.* 2016).

A presença do grupo reativo nitro é basicamente essencial para reação redox, frequentemente encontrado ligado a anéis heterocíclicos, incluindo o tiazol, fazendo parte de fármacos parasitóforos (KOROLKOVAS, 1977; ESPOSITO *et al.* 2005). Estes, geralmente, estão envolvidos em formações de compostos reativos de elevada toxicidade, sendo esta dependente da proporção e da posição de grupos nitros ligados a anéis aromáticos, no entanto, não se encontram relatos de toxicidade da **NTZ** (XU *et al.* 2002; CARVALHO *et al.* 2003).

Dentre os efeitos do grupo nitro destaca-se um estudo da relação quantitativa entre estrutura química e atividade mutagênica evidenciando a existência de correlações entre valores altos de afinidade eletrônica, juntamente com o número de núcleos heterocíclicos presente na estrutura dos nitrocompostos e sua atividade mutagênica (DEBNATH, 1991).

3.3.2 Farmacocinética

Após a administração oral de **NTZ**, a droga é eficientemente absorvida pelo trato gastrointestinal e rapidamente hidrolisada por esterases plasmáticas no metabolito desacetilado **TZX** com níveis de pico dentro 1 a 4 h. Mais de 99% de **TZX** está ligado às proteínas plasmáticas, e o composto é então adicionalmente glucuronizado (STOCKIS *et al.* 2002; HEMPHILL *et al.* 2006).

O processo metabólico da **NTZ** foi investigado por Broekhuysse *et al.* (2000) os quais determinaram os metabólitos, a partir da droga radiomarcada, em voluntários saudáveis com a absorção oral sendo que, aproximadamente um terço (31,5%), foi excretada na urina. Na radioatividade urinária **TZX** e **GTZX** estavam presentes em 15% do total; metabólitos sulfoconjugados foram identificados, mas não quantificados. O principal metabólito identificado no plasma, urina e bile foi **GTZX**; outras espécies que não detectado nas fezes, sugere que a desconjugação da parte de carboidratos ocorre por intermédio de enzimas intestinais, e, isso pode ser altamente benéfico para a eficácia da droga no trato intestinal.

Huang *et al.* (2015) através de urina, plasma e amostras fecais de ratos, suínos e frangos identificaram os metabólitos: fase I: tizoxanida (**TZX**); fase II: glicose de tizoxanida (**GSTZX**), glicuronídeo de tizoxanida (**GTZX**), sulfato de tizoxanida (**STZX**) e sulfato de tizoxanida hidrolizada (**STXZH**) (Figura 7).

Com este estudo e **GSTZX** foram relatados pela primeira vez, sendo que **TZX** e **GTZX** foram os principais metabólitos em ratos e suínos, enquanto **TZX** e **STZX** foram predominantes em frangos. A partir dos metabólitos identificados vias metabólicas foram propostas.

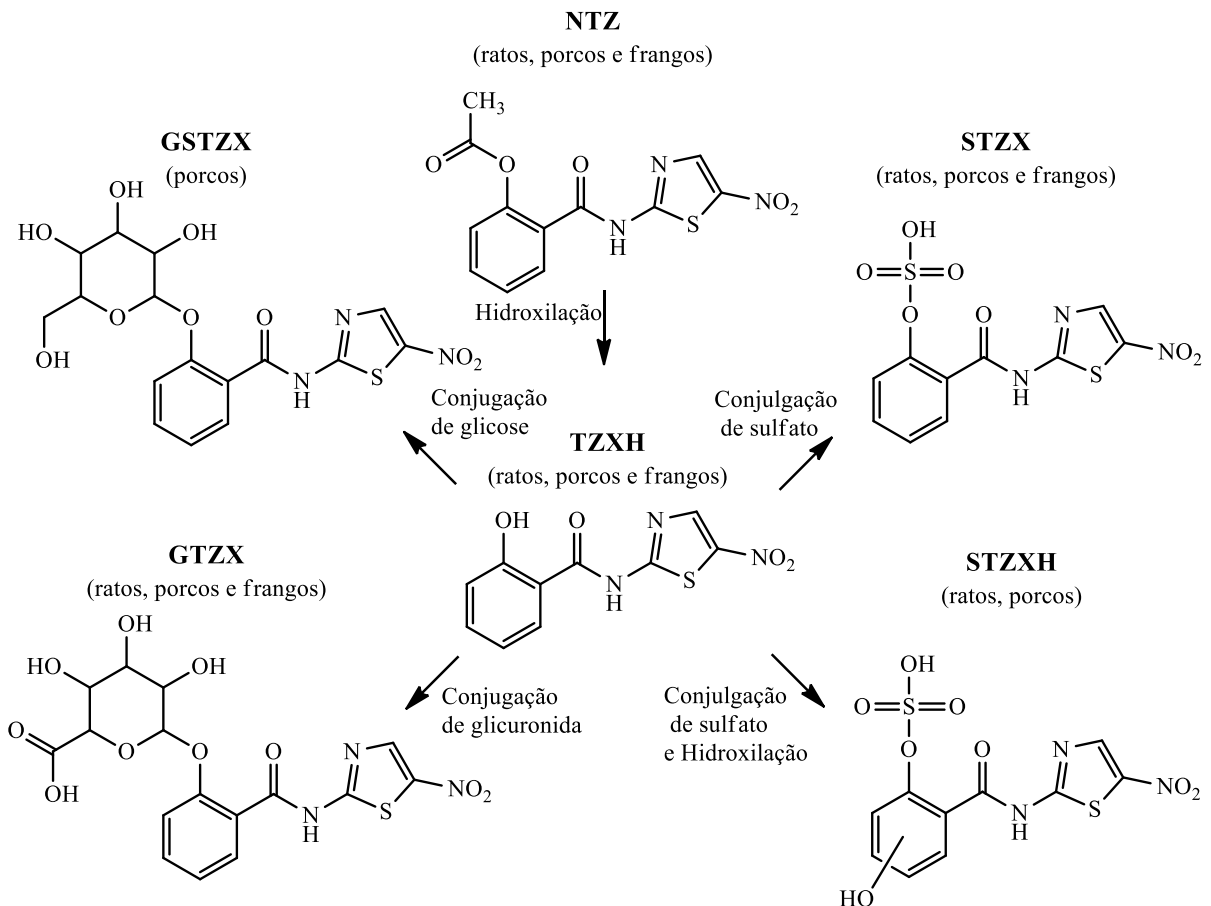


Figura 7. Proposta de via metabólica da **NTZ** (HUANG *et al.* 2015).

Estudos mostram que a **NTZ** e **TZX** exibem atividades cisticidas e a combinação de **TZX** com sulfóxido de albendazol produz um efeito aditivo. No entanto, verificações farmacocinéticas indicaram que a **TZX** não permeia no líquido cérebro-espinhal e que a **NTZ** não melhorou significativamente a farmacocinética do albendazol no plasma ou no líquido cefalorraquidiano, demonstrando ineficiência diante tratamento da neurocisticercose (RUIZ-OLMEDO *et al.* 2017).

3.3.3 Mecanismo de ação

Apesar da atividade contra helmintos ainda não estar totalmente elucidada, se especula que o potencial esteja ligado ao transporte de elétron nas enzimas desses anaeróbios (GILLES & HOFFMAN, 2002).

Para tanto a **NTZ** age inibindo a enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase – PFOR (Figura 8), a qual é essencial para o metabolismo energético anaeróbico em protozoários e em bactérias anaeróbias (CHABRIÈRE *et al.* 1999; MURRAY *et al.* 2014).

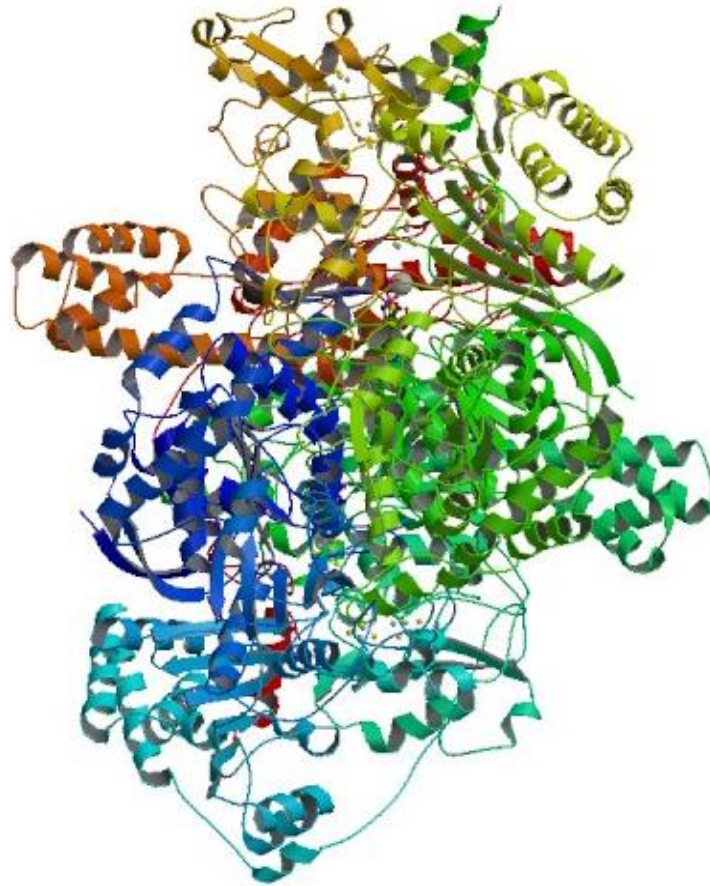


Figura 8. Representação da estrutura PFOR determinada por Cristalografia de Raios-x (PDB: 1B0P).

Assim, neste mecanismo, o grupo nitro teria um papel essencial, semelhante ao que se postulou para o medicamento relacionado, o metronidazol (MTZ). Em testes *in vitro* com *H. pylori*, que possui a enzima PFOR de forma essencial, o fármaco foi mais ativo que o MTZ e não sendo mutagênica para as estirpes de *H. pylori*, a inibição de PFOR se deu através da nitrorredução do 5-nitro presente no anel tiazol (SISSON *et al.* 2002). No entanto, em estudos posteriores deduziram que a **NTZ** inibiu a enzima PFOR interferindo com atividade de C2- α -lactil-tiamina pirofosfato resultando no rearranjo do anel nitrotiazol causando dissociação do complexo (Figura 9) (HOFFMAN *et al.* 2007).

Em contraste com o **MTZ**, sendo a **NTZ** não-mutagênica, colabora para que a resistência contra esse fármaco seja insignificante, demonstrando eficácia antibacteriana, desempenhando um papel fundamental na obtenção de avanços para a introdução de drogas na

terapêutica, podendo atuar no reposicionamento farmacêutico (HEMPHILL *et al.* 2006; VENTOLA, 2015). A ação da **TZX** na replicação do vírus da hepatite C (VHC) em cultura de células induziram seletivamente a fosforilação da proteína quinase R (PKR), o que elevou a concentração em nível intracelular do fator de iniciação eucariótico 2-fosforilado (eIF-2 α - P), um mediador natural conhecido por bloquear a replicação viral (ELAZAR *et al.* 2009).

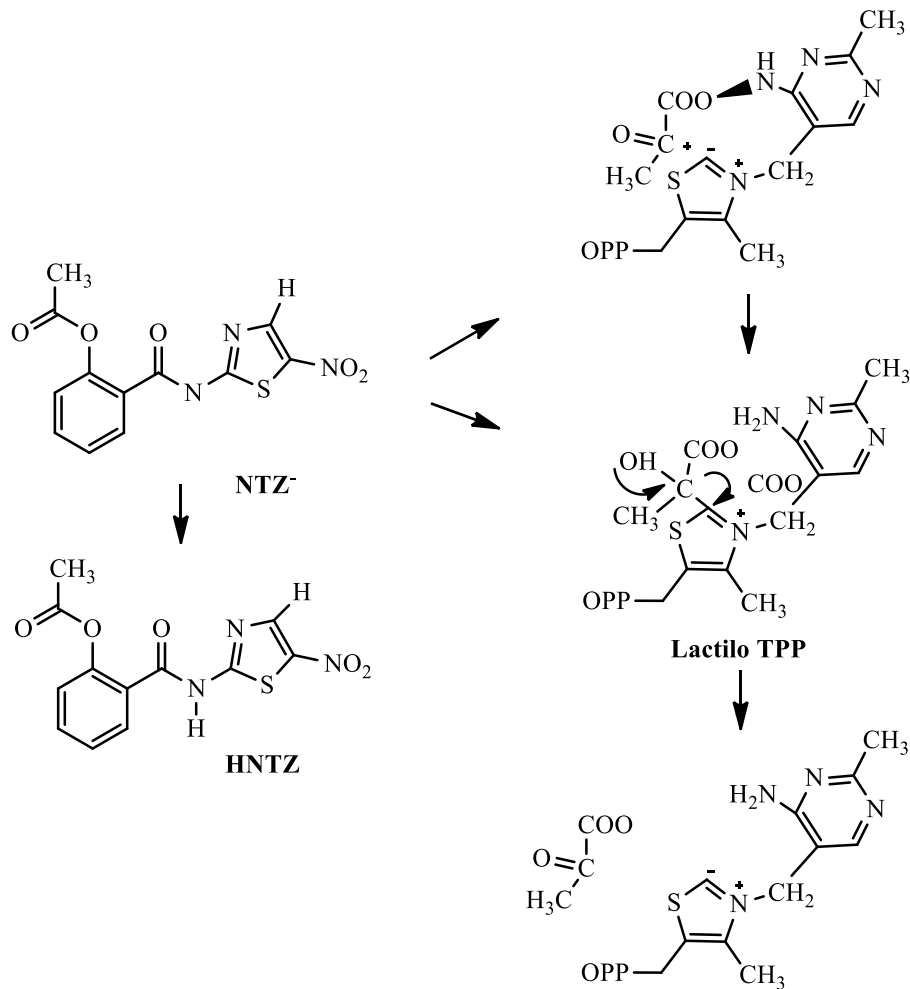


Figura 9. Mecanismo de ação da nitazoxanida em bactérias (HOFFMAN *et al.* 2007).

Este mecanismo fornece uma possível explicação para a baixa taxa de toxicidade da **NTZ**, uma vez que este é desencadeado apenas em células infectadas com o VHC (KHATTAB *et al.* 2009).

3.3.4 Atividades biológicas

Ao ser sintetizada, a **NTZ** apresentou atividades antiparasitas contra *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba dysenteriae*, *Syphacia obvelata*, *Hymenolepis nana*, além de agente fungistático e moluscicida (dosagem, em mg/kg, para testes biológicos de 25, 50, 100 e 200),

assim, inicialmente descrita como anti-helmíntico veterinário (ROSSIGNOL & CAVIER, 1976).

A ação antibacteriana da **NTZ** e seu metabólito **TZX** em bactérias anaeróbicas gram-positivas e gram-negativas foi avaliada, onde a **NTZ** mostrou-se altamente eficaz contra cepas sensíveis e resistentes ao metronidazol (MTZ), com valores de concentração mínima inibitória de 90% (MIC₉₀) para *Bacteroides fragilis* (0,5 mg/L para **NTZ** versus 1 mg/L para MTZ); *Bifidobacterium* spp. (4 mg/L para **NTZ** versus 64 mg/L para MTZ); *Propionibacterium* spp. (16 mg/L para **NTZ** versus 64 mg/L para MTZ); *Eubacterium* spp. (1 mg/L ambos compostos). Os testes com **TZX** não foram tão eficientes quanto a **NTZ**, no entanto não apresentou nenhum tipo de antagonismo (DUBREUIL *et al.*, 1996).

O tratamento da infecção causada por *Helicobacter pylori* é comprometido pela resistência desta bactéria ao MTZ, no entanto, a **NTZ** e seu metabólito **TZX** indicaram capacidade para o tratamento desta infecção, por clinicamente não apresentar resistência e a falta de mutagenicidade deste agente, sendo ideal em terapias combinadas (MÉGRAUD *et al.* 1998; YAMAMOTO *et al.* 1999, SISSON *et al.* 2002). Ainda com atividade antibacteriana a **NTZ** possui ação contra *C. difficile* em estudos *in vivo* (MIC: 3,0 mg/peso corporal) e clínicos (comprimidos de 500 mg) demonstrando resultado que poderia ser usada no tratamento de diarreias e colite, ambas causadas por *C. difficile* (McVAY & ROLFE, 2000; MUSHER *et al.* 2006).

Rossignol *et al.* (2001) demonstraram potencialidade da **NTZ** no tratamento de diarreia causada por *Cryptosporidium parvum* através de estudos clínicos randomizados duplo-cego. Com doses de 500 mg duas vezes ao dia durante 3 dias em adultos e adolescentes, doses de 200 mg duas vezes ao dia durante 3 dias em crianças de 4 a 11 anos e em doses de 100 mg duas vezes ao dia durante 3 dias em crianças 1 a 3 anos. Desse modo, o tratamento foi eficaz, tal como a segurança e tolerância que foram favoráveis, uma vez que eventos relatados por pacientes no grupo de tratamento com **NTZ** eram idênticos aos relatados por pacientes que receberam placebo.

Em diarreia causada por *G. intestinalis* e *E. histolytica* a **NTZ** também demonstrou aplicabilidade no tratamento. Sendo utilizado um comprimido de 500 mg duas vezes ao dia durante 3 dias. Desse modo, a **NTZ** é amplamente capaz de tratar infecções causadas por

protozoários entéricos a qual reduz a morbidade e custos associados a estas doenças diarreicas (ROSSIGNOL *et al.* 2001).

Além de atividades contra helmintos, bactérias e protozoários, estudos apontam a NTZ como um potente antiviral. Nessa perspectiva, Haffizulla *et al.* (2014) realizaram um ensaio clínico de fase 2b/3 para avaliar o efeito da NTZ no tratamento de influenza aguda não complicada, relatando eficácia com NTZ 600 mg duas vezes ao dia por cinco dias, procedimento que foi associado a redução dos sintomas. Investigações *in vitro* da ação de NTZ para síndrome respiratória do Oriente Médio coronavírus (MERS-CoV), demonstraram inibir MERS-CoV com IC₅₀ de 0,92 mg/mL, semelhante aos níveis observados para a gripe e outros vírus (ROSSIGNOL, 2014). Este IC₅₀ é realizável em humanos após administração duas vezes por dia de comprimidos de liberação prolongada de nitazoxanida: pico e calha as concentrações plasmáticas foram de 4,6 e 0,8 mg/mL, respectivamente. No entanto, se recomenda maior aprofundamento acerca da atividade contra coronavírus (ROSSIGNOL, 2016).

Dentre as atividades antivirais da NTZ, Wang *et al.* (2016) relataram eficiência diante do vírus Chikungunya (CHIKV), estabeleceram um sistema de triagem de rendimento (HTS) baseado em CHIKV 26S mediando o ensaio de inibição de fusão de células do mosquito. Na investigação, células BHK-21 foram infectadas com CHIKV em um MOL de 0,01 e co-tratado com NTZ (50, 25, 12,5 ou 6,25 mM) a 37 ° C, durante uma incubação de 1h. O inóculo foi então removido e as células tratadas foram lavadas e cobertas com 1% de agarose sem drogas para determinar os efeitos da nitazoxanida na entrada do vírus. Verificou-se que compostos inibe significativamente a entrada de CHIKV de forma dependente da dose. A NTZ foi capaz de inibir a replicação do vírus da hepatite C (VHC), sem induzir resistência viral, sugerindo que a barreira genética para o desenvolvimento da resistência a NTZ é alta (KORBA *et al.* 2009).

Estudo realizado no Egito com 96 pacientes infectados pelo genótipo 4 do VHC, concluiu que a combinação da NTZ (500 mg duas vezes ao dia) com peginterferon α -2a (180 μ g uma vez por semana e com base em peso) e ribavirina (1000-1200 mg por dia) elevou a porcentagem de pacientes com respostas virológicas rápidas, sustentadas e sem aumento de reações adversas, em comparação aos pacientes tratados apenas com peginterferon e ribavina (ROSSIGNOL *et al.* 2009b). De modo generalizado, tiazolidos, como a NTZ, demonstram possuir atividades antivirais contra: hepatite B, hepatite C e rotavírus (ROSSIGNOL *et al.* 2006; ROSSIGNOL & KEEFFE, 2008; ROSSIGNOL *et al.* 2009b).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MODELAGEM MOLECULAR

Para otimização da geometria e obtenção de parâmetros teóricos fez-se o uso do método semi-impírico PM3 (*Parametric Method 3* – Terceira Parametrização) (STEWART, 1989). Assim, as geometrias obtidas por este foram otimizadas pelo método DFT (*Density Functional Theory* – Teoria do Funcional de Densidade) (PARR & YANG, 1989), usando o funcional híbrido B3LYP (LEE *et al.* 1998), com a função de base 6-31g (d,p) para derivados amino-nitrozólicos e 6-31+(d,p) (BECKE, 1988) para análogos da nitazoxanida.

Apenas conformações mais estáveis para as moléculas estudadas foram utilizadas. Os descritores moleculares calculados foram: Potencial de ionização (PI) e Afinidade Eletrônica (AE) das moléculas neutras e ionizadas, energia dos orbitais de fronteira (HOMO, LUMO) e GAP. Nesta etapa, os cálculos foram realizados utilizando os programas computacionais Gaussview e Guassian 09 (FRISCH *et al.* 2009).

4.1.1 Potencial de Ionização (PI) e Afinidade eletrônica (AE)

O potencial de ionização (PI) foi calculado a partir das energias de retirada de um elétron, realizado pela diferença entre a molécula neutra e o respectivo cátion radical (Eq. 1). A afinidade eletrônica (AE) foi calculada como a diferença da energia da molécula neutra e o respectivo ânion radical (Eq. 2).

$$PI = [EMH^{*+}] - [EMH] \quad (\text{Eq. 1})$$

$$AE = [EMH^{*-}] - [EMH] \quad (\text{Eq. 2})$$

4.1.2 Energia dos Orbitais de Fronteira (HOMO e LUMO) e GAP

HOMO (*highest occupied molecular orbital*) é o orbital molecular ocupado de maior energia e mede o caráter elétron-doador de um composto, está relacionado com o potencial de ionização e caracteriza o composto como nucleofílico de uma molécula, assim, a maior ou menor nucleofilicidade está relacionada com o menor ou maior valor em módulo, respectivamente (SANTOS *et al.* 2014). LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) é o orbital molecular desocupado de menor energia e indica o caráter elétron-aceptor do composto, relacionando-se com o potencial de ionização e a capacidade de reagir como um eletrófilo

(SANT'ANNA, 2002; ARROIO, 2010). Os valores de HOMO e LUMO são expressos em elétron-volt (eV).

O GAP é um relevante indicador de estabilidade molecular e reatividade química e pode ser obtido pela diferença de energia dos orbitais HOMO e LUMO, sendo que quanto menor o intervalo entre HOMO e LUMO mais reativa é a molécula, enquanto moléculas com alto valor de GAP indicam alta estabilidade, no sentido de baixa reatividade (ZANG & MUSGRAVE, 2007). Os parâmetros de orbitais de fronteira podem transmitir informações úteis sobre a reatividade de fármacos com suas enzimas-alvo, fato que está relacionado a uma variedade de reações químicas que ocorrem em uma posição e direção, onde a sobreposição do HOMO e do LUMO dos respectivos reagentes é máxima. (SANT'ANNA, 2002; BARREIRO & FRAGA, 2014).

4.1.3 Mapa do potencial eletrostático

Os mapas dos potenciais eletrostáticos (MPE's) permitem a visualização da distribuição de carga em uma molécula, sendo o esquema de cores representação da escala de carga. As cores tendendo ao vermelho indicam uma forte atração entre a superfície de densidade eletrônica naquela posição, desse modo aumento da concentração da carga negativa. As regiões com cores que tendem ao azul indicam uma atração fraca entre a superfície e a carga de prova positiva. Em síntese, a distribuição global da carga é indicada pela tendência ao azul (mais positiva) para o verde e amarelo (neutra) para o vermelho (mais negativa) (CAREY & GIULIANO, 2014).

Os MPE's são úteis por demonstrarem de modo rápido as regiões ricas ou pobres em elétrons na molécula e permitindo correlacionar a estrutura eletrônica com a reatividade química (McMURRY, 2016). As moléculas estudadas foram otimizadas; e as superfícies dos MPE's foram executadas e visualizadas através do programa Gaussian (2009).

4.2 COMPOSTOS ESTUDADOS

Derivados simplificados da parte amino-nitro-azólicos da molécula **NTZ**, denominadas de **NTZ-D1** até **NTZ-D9** (Figura 10). As mudanças ocorreram na estrutura farmacofórica da **NTZ** nos anéis heterocíclicos mantendo o grupamento nitro para observar a influência na reatividade da molécula com mudanças na anéis heterocíclicos.

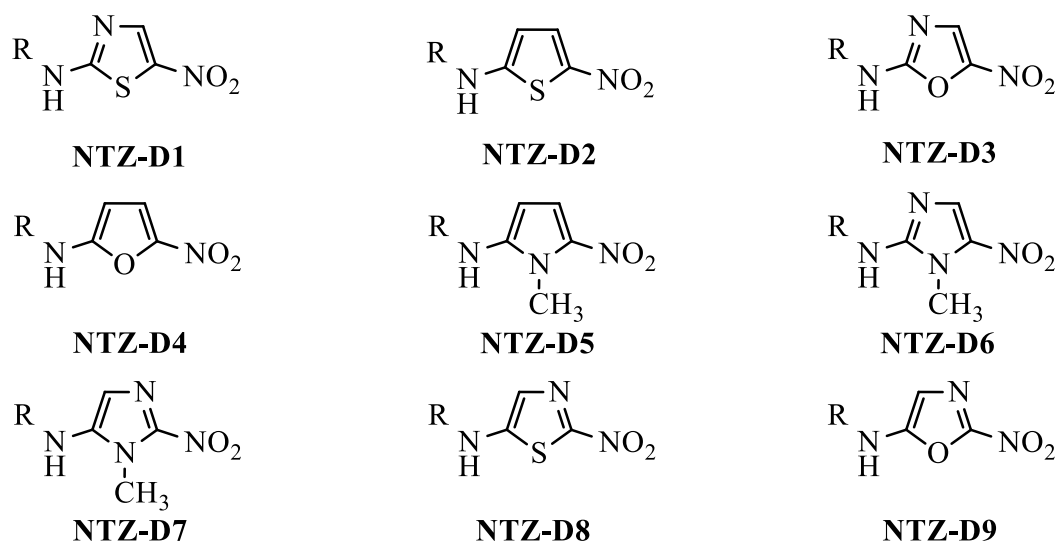


Figura 10. Derivados simplificados amino-nitro-azólicos da nitazoxanida.

A estrutura farmacofórica da nitazoxanida (**NTZ**) foi mantida nos derivados, sendo a tizoxanida (**TZX**) o metabólito ativo da molécula; nitro-tizoxanida (**N-TZX**) com a presença de um grupo nitro na porção benzamida; nitazoxamida (**NTM**) um derivado em que ocorreu a troca do grupo acetil por um grupamento amida, visando melhorar a estabilidade química da molécula; e nitro-nitazoxamida (**N-NTM**) com a presença de mais um grupo nitro na molécula nitazoxamida. Estruturas representadas na figura 11.

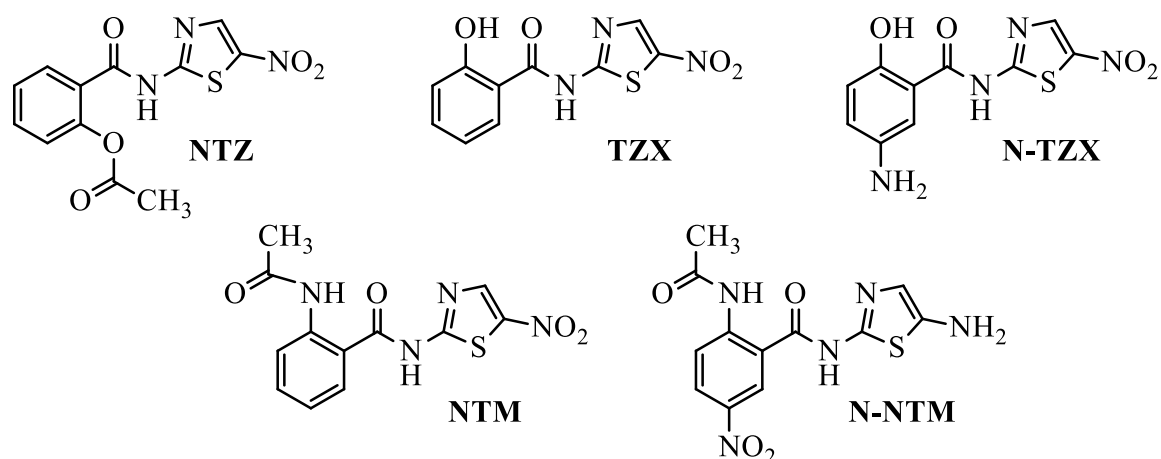
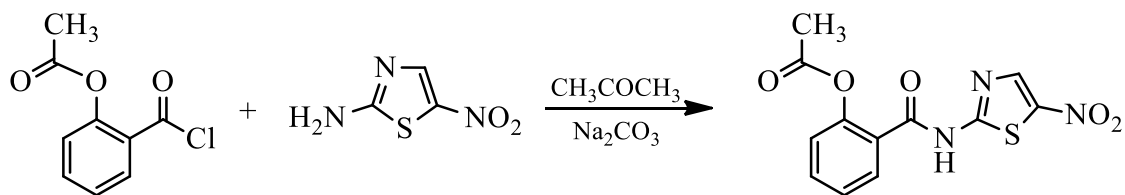


Figura 11. Nitazoxanida e análogos.

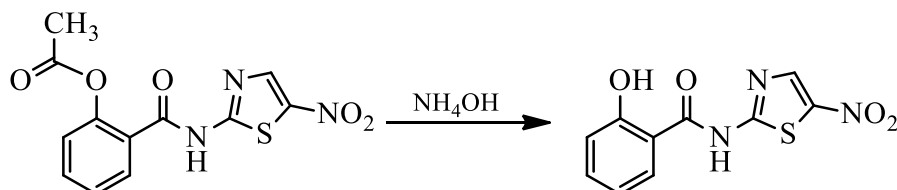
4.3 PROPOSTAS DE METODOLOGIA SINTÉTICA

A síntese da **NTZ** foi realizada a partir do reagente *O*-cloreto de acetilsacililoilo com o 2-amino-5-nitrotiazol na presença de uma cetona (CH_3COCH_3) proporcionando uma reação fria (ou endotérmica) para que a amina não ataque o éster, o qual é muito reativo e carbonato de sódio (Na_2CO_3) para neutralizar a solução (Esquema 1).



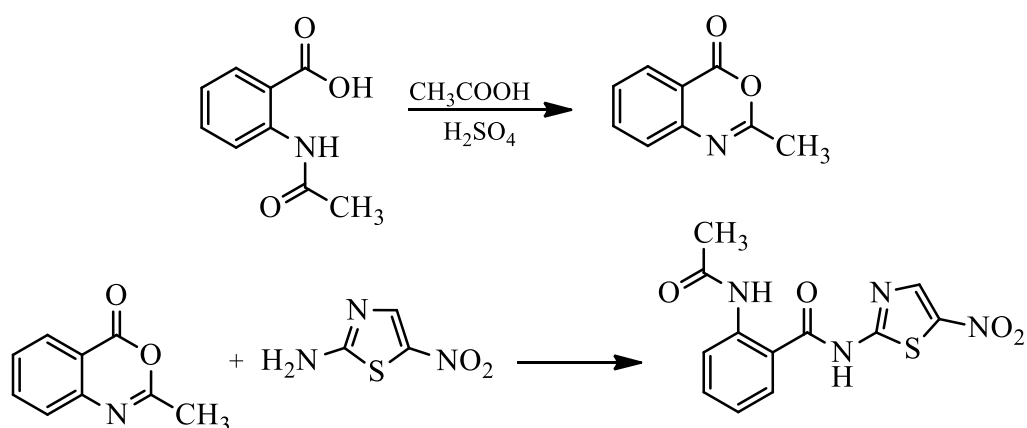
Esquema 1: Metodologia sintética para a preparação da nitazoxanida

Uma reação de hidrólise foi realizada para obtenção da **TZX**, partindo da molécula **NTZ** na presença de hidróxido de amônio (NH_4OH), sob agitação e aquecimento ($100\text{ }^\circ\text{C}$).



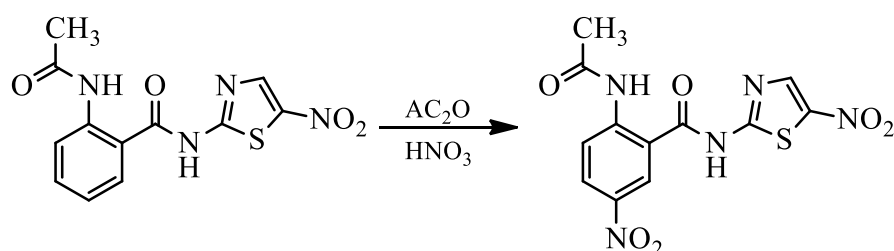
Esquema 2: Metodologia sintética para obtenção da tizoxanida

A síntese da **NTM** foi realizada utilizando como reagente de partida o ácido acetilantranílico com ácido acético (CH_3COOH) e ácido sulfúrico (H_2SO_4), sob aquecimento ($150\text{-}180\text{ }^\circ\text{C}$) e agitação, sendo, posteriormente, adicionado o reagente 2-amino-5-nitrotiazol (Esquema 3).



Esquema 3: Metodologia sintética para a preparação da nitazoxamida.

Uma reação de nitração foi realizada para a obtenção do derivado **N-NTM**. Utilizando o derivado **NTM** solubilizado em anidrido acético (Ac_2O) e, posteriormente, a adição de ácido nítrico (HNO_3).



Esquema 4: Metodologia sintética para a preparação do derivado **N-TZM**.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MODELAGEM MOLECULAR

5.1.1 Estudo teórico de derivados amino-nitro-azólicos

As moléculas foram derivadas da parte amino-nitro-azólica, sendo elemento estrutural farmacóforo da molécula da **NTZ** (COLÍN-LOZANO *et al.* 2017). Estudos relatam que este grupamento exibe baixa toxicidade sendo relevante para a síntese de fatores biológicos importantes, expressando boas atividades antituberculares e antitripanossomida (SAMADHIYA *et al.* 2013; PAPADOPOULOU *et al.* 2016).

Estrutura de menor energia do composto 2-amino-nitro-tiazol (**NTZ-D1**) foram calculadas pelo método opt B3LYP/6-31g(d,p) e, assim, foram planejados os derivados amino-nitro-azólicos, os quais são apresentados da Figura 12. Este método tem mostrado boa correlação com dados cristalográficos (STRENALYUK *et al.* 2008). Essas estruturas são relativamente simples e apresentam mudanças diretamente no anel heterocíclico.

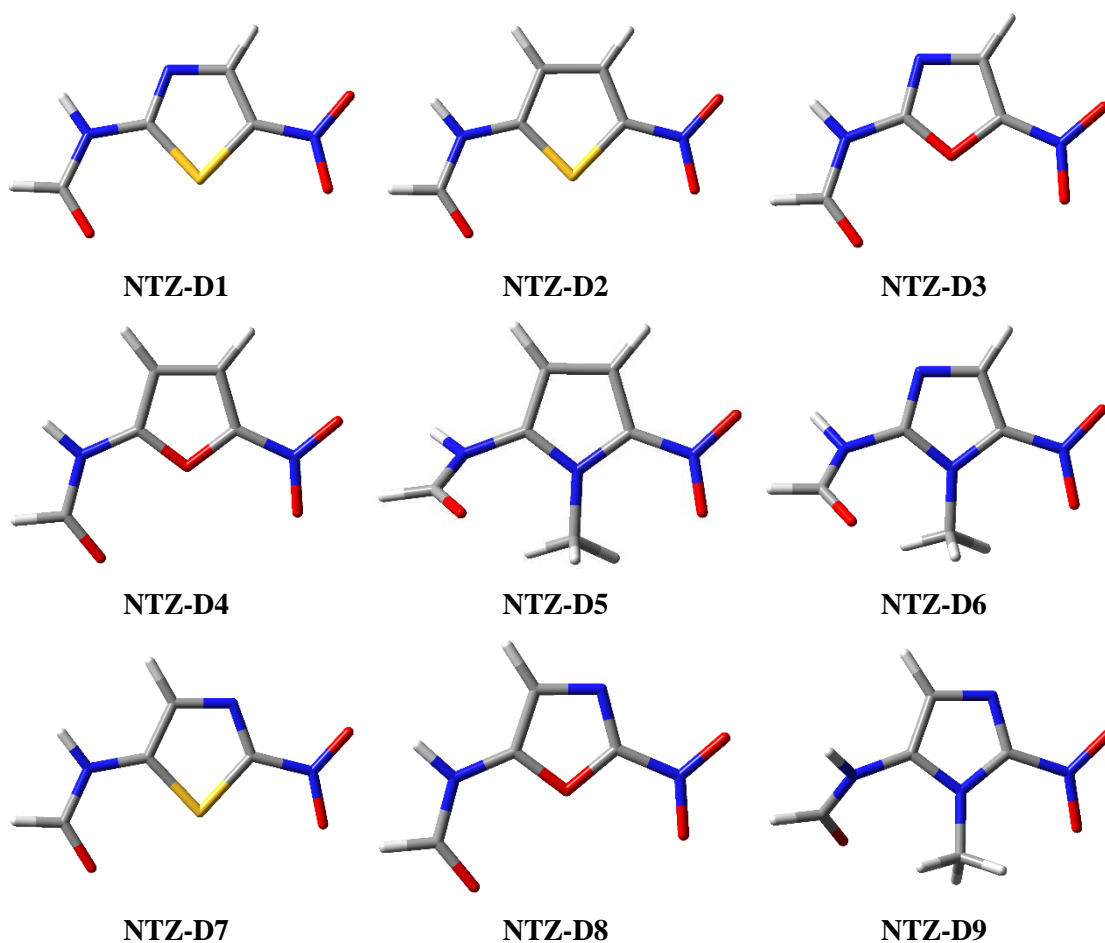


Figura 12. Estruturas otimizadas pelo método B3LYP/6-31G (d,p) de análogos da nitazoxanida.

Os valores de energia foram relacionados com a reatividade e a capacidade redox usando os orbitais moleculares: HOMO, LUMO e os valores de GAP. Estes parâmetros foram correlacionados com outros índices: potencial de ionização (PI) e afinidade eletrônica (AE) (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades teóricas dos derivados amino-nitro-azólicos.

Compostos	HOMO (eV)	LUMO (eV)	GAP (eV)	PI (Kcal/mol)	AE (Kcal/mol)
NTZ-D1	-7,16	-2,77	4,39	211,18	-17,75
NTZ-D2	-6,64	-2,49	4,14	197,90	-12,05
NTZ-D3	-7,27	-2,72	4,56	215,63	-13,34
NTZ-D4	-6,62	-2,37	4,25	199,19	-6,46
NTZ-D5	-6,50	-2,08	4,41	195,22	+0,73
NTZ-D6	-6,89	-2,38	4,51	205,33	-5,42
NTZ-D7	-7,00	-2,83	4,16	207,18	-18,45
NTZ-D8	-7,05	-2,78	4,28	210,61	-13,70
NTZ-D9	-6,91	-2,38	4,53	205,81	-4,18

Nossos resultados demonstraram que a molécula 2-amino-5-nitrotiazol (**NTZ-D1**) apresentou o segundo menor valor de HOMO (- 7,16 eV) podendo ser classificado como um nucleófilo fraco em relação aos outros derivados, uma vez que maiores valores de HOMO estão relacionados com maior nucleofilicidade da molécula. Em oposição, o valor de LUMO (-2,77 eV), tal como os valores dos demais derivados, demonstram a relevância da presença do grupo nitro, o qual se caracteriza como acceptor de elétrons. Assim, não apenas o **NTZ-D1**, como os demais derivados tendem a ser melhores eletrófilos. Este parâmetro indica a facilidade em receber elétrons e o potencial de redução do grupo nitro, um dos mecanismos para os nitroderivados, o qual também possui uma importante atividade terapêutica (PAULA *et al.* 2009).

Nas representações dos orbitais de fronteira, HOMO e LUMO (Figura 13), analisamos os glóbulos formados, sendo: em HOMO há a contribuição dos anéis heterocíclicos em todos os derivados o que ocasionalmente demonstra facilidade para possíveis ataques nucleofílicos com quantidade mínima de energia necessária para reações. Em LUMO percebemos a contribuição do grupamento nitro mais representativa que em HOMO, sendo o esperado uma vez que este grupo é um forte acceptor de elétrons (HADIGHEH-REZVAN & PILEVAR-MALEKI, 2018) . Representando a afinidade eletrônica ou a reatividade da molécula como eletrófilo.

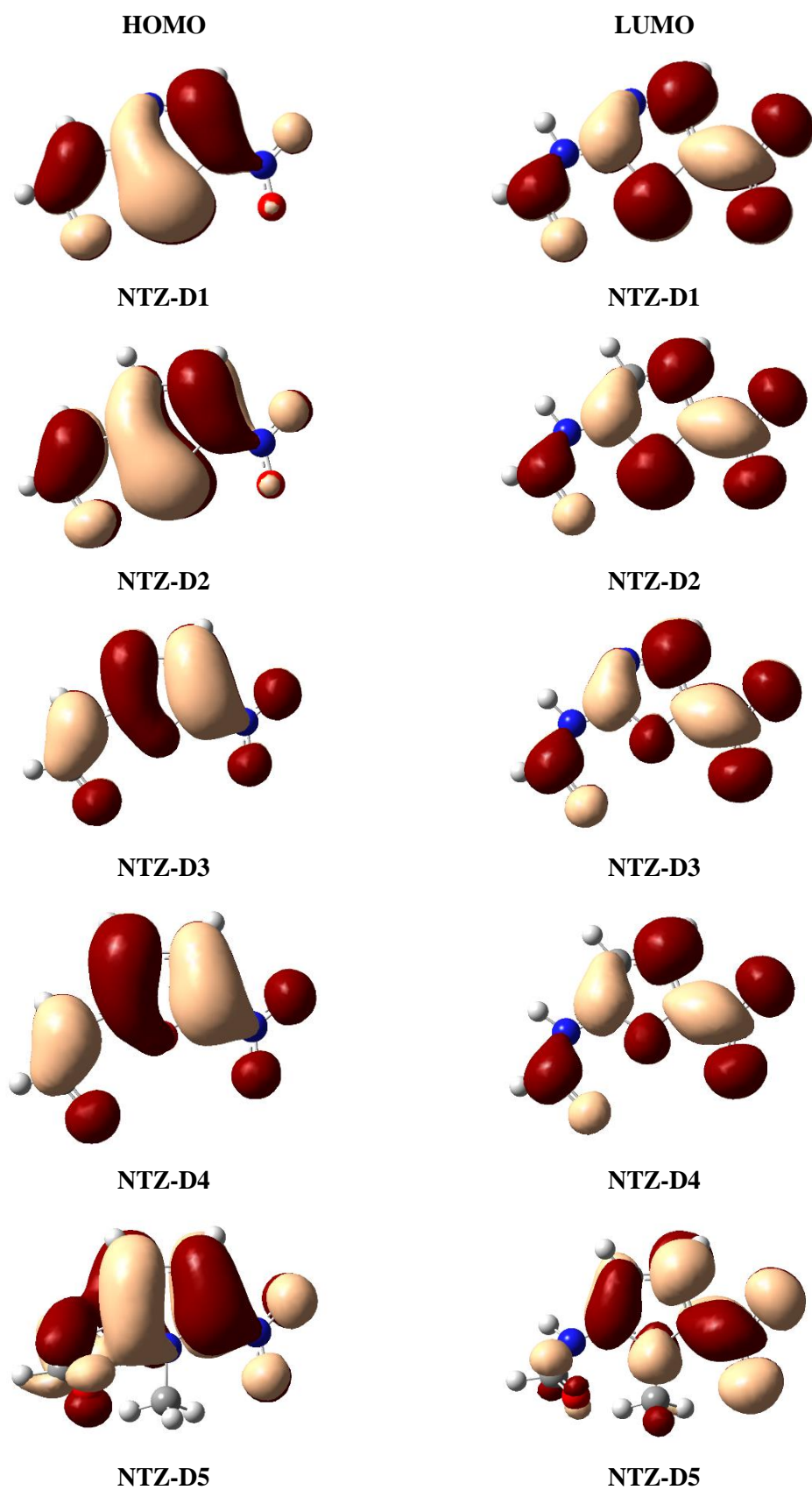


Figura 13. Orbitais de fronteira dos derivados amino-nitro-azólicos.

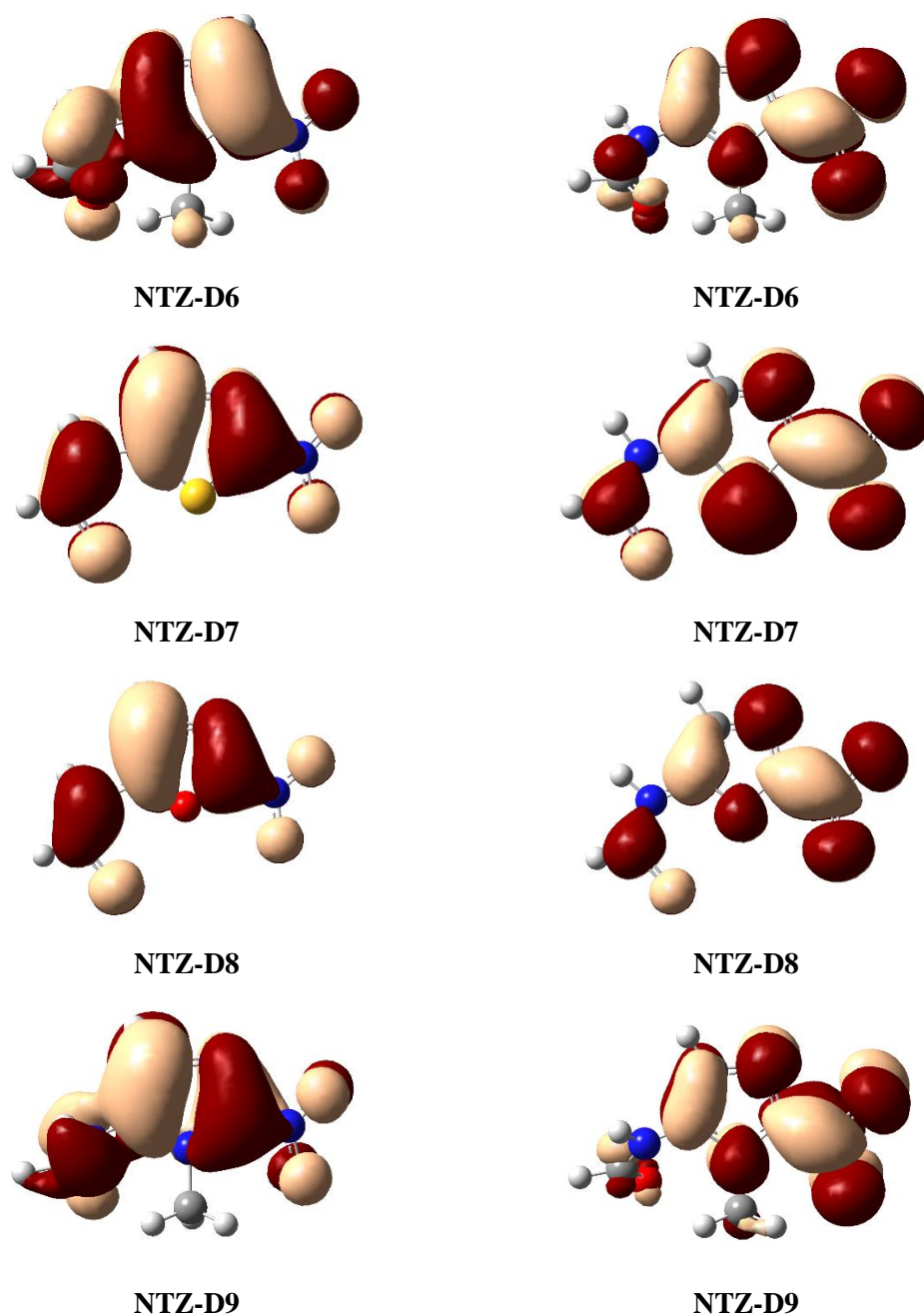


Figura 13. Orbitais de fronteira dos derivados amino-nitro-azólicos (continuação)

A molécula **NTZ-D5** apresentou menor valor PI (195,22 eV) e maior valor de AE (+0,73 eV), assim, teoricamente, o derivado pode apresentar toxicidade mais baixa que o normal, provavelmente pela presença do grupo metila no composto, o qual seu potencial doador de elétrons relaciona com a capacidade de diminuir a toxicidade (KOROKOLVAS, 1977).

Diante dos resultados de GAP os composto **NTZ-D2** (4,14 eV) e **NTZ-D7** (4,16 eV) derivado tiofeno e tiazol, respectivamente, obtiveram os menores valores, este que é um importante indicador de reatividade do composto, quanto menor é o GAP, mais reativa é a

molécula (CARVALHO *et al.* 2003). Modificações no anel tiofeno podem reduzir o potencial redox do composto alterando a reatividade e a toxicidade. Assim, os valores de HOMO e LUMO sugerem que quanto maior o potencial doador de elétrons, maior a toxicidade e atividade.

Os MPE's auxiliam o entendimento das interações que destas moléculas, a influência dos efeitos eletrônicos no comportamento molecular dos compostos (BHATTACHARJEE *et al.* 2002). O potencial negativo localizado na posição ocupada pelo grupo nitro representado pela cor amarela tendendo ao vermelho, tal como no oxigênio ligado a parte amino da molécula. Ambas regiões indicam prováveis ataques eletrofílicos (PAULA *et al.* 2009). Na região em que as cores tendendo ao azul, cargas menos negativas, estão localizados o átomo de nitrogênio e a introdução das metilas ligadas ao nitrogênio do anel heterocíclico (Figura 14).

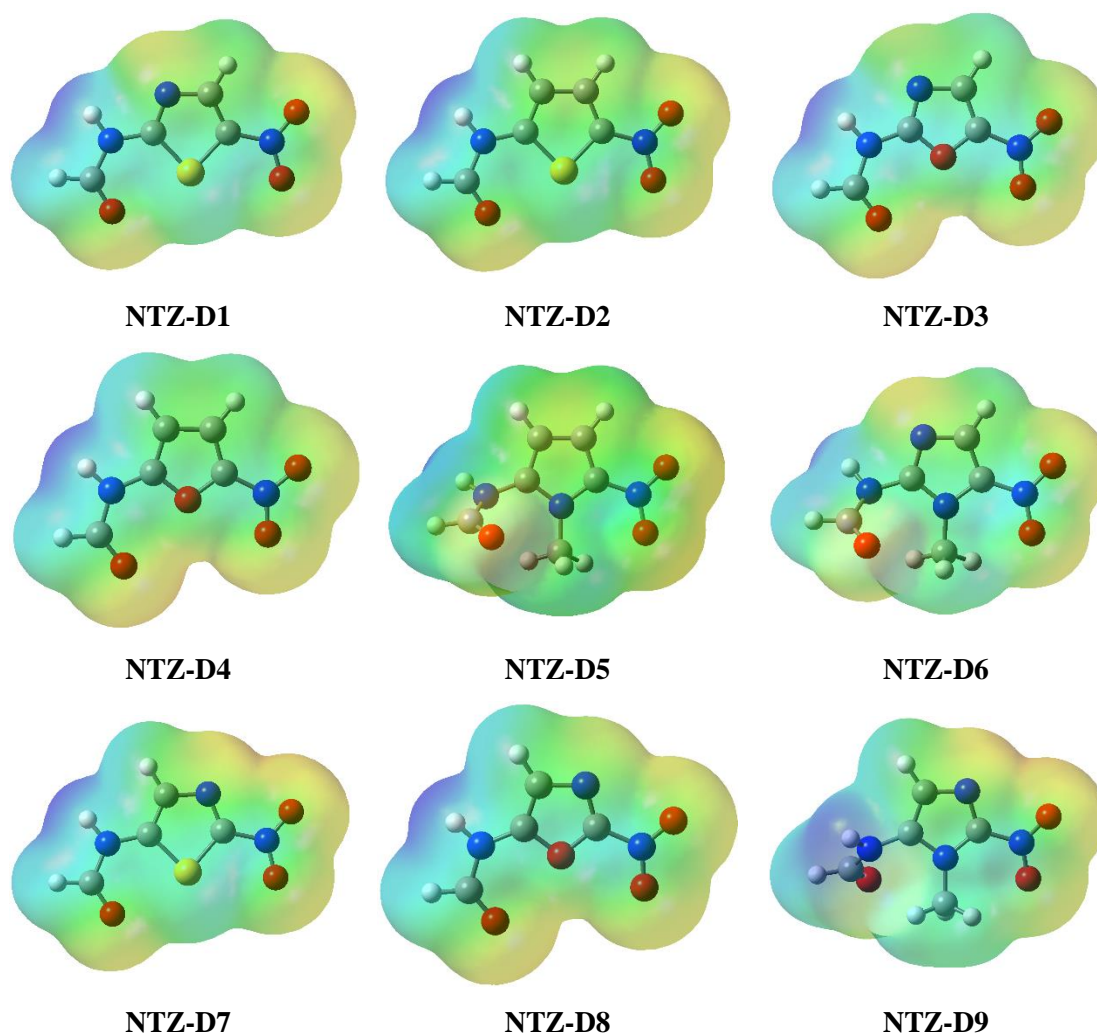


Figura 14. Mapa do potencial eletrostático dos derivados amino-nitro-azólicos.

5.1.2 Estudo teórico dos análogos da nitazoxanida

As estruturas de menor energia dos análogos investigados foram calculadas pelo método opt B3LYP/6-31+g (d,p) apresentadas da Figura 15. Os valores das propriedades físico-químicas destes análogos obtidos a partir dos parâmetros HOMO, LUMO, GAP, potencial de ionização (PI) e afinidade eletrônica (AE) estão descritos na tabela 2, utilizados para prever a reatividade destas moléculas.

Os resultados mostram a formação de pontes de hidrogênios intramoleculares da posição *orto* e o grupo carbonila (NTZ, TZX e N-TZX), concordando com dados cristalográficos da molécula NTZ (BRUNO *et al.* 2010); tal como o hidrogênio da amida da posição *orto* com o grupo carbonila.

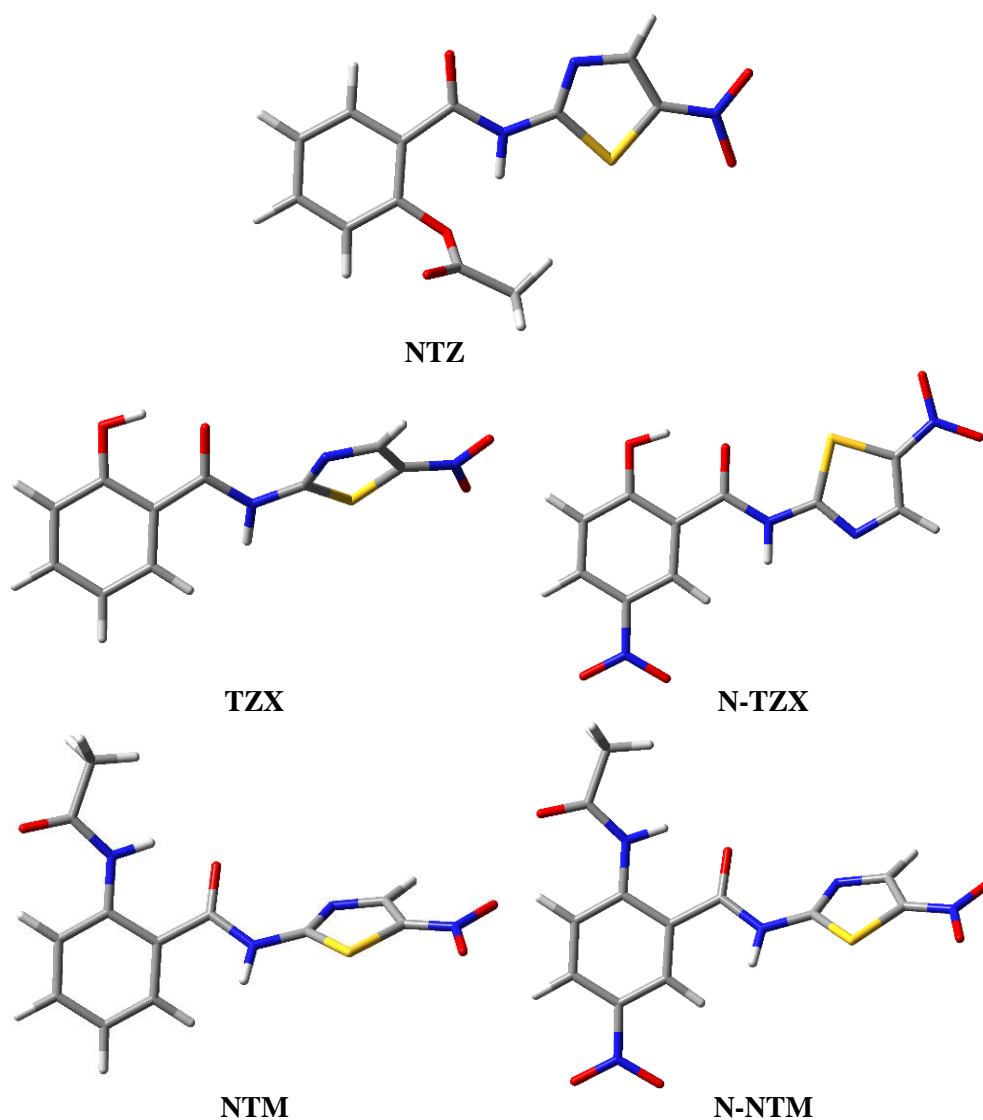
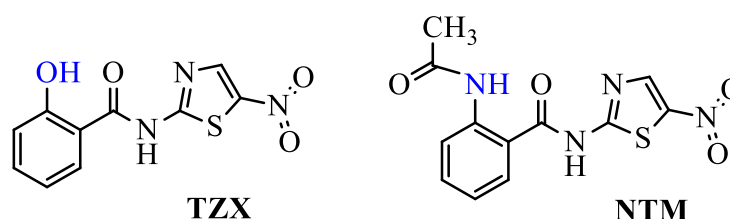


Figura 15. Estruturas otimizadas pelo método B3LYP/6-31+G(d,p) de análogos da nitazoxanida.

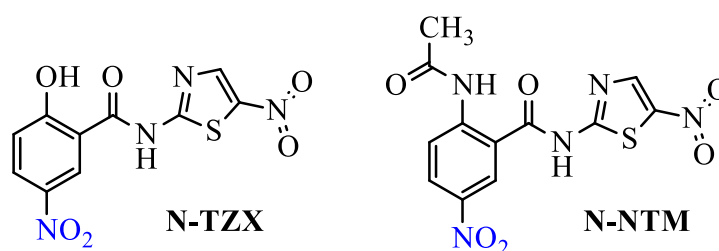
Tabela 2. Propriedades teóricas dos análogos da nitazoxanida (NTZ).

Análogos	HOMO (eV)	LUMO (eV)	GAP (eV)	PI (Kcal/mol)	AE (Kcal/mol)
NTZ	-7.22	-3,21	4.00	197.42	-42.02
TZX	-6.94	-3,35	3.59	194.09	-44.69
N-TZX	-7.60	-3.51	4.09	205.92	-51.25
NTM	-6.86	-3,36	3.50	189.20	-45.80
N-NTM	-7.49	-3,58	3.91	201.13	-53.98

Os valores de HOMO, LUMO e GAP indicam um aumento significativo na capacidade doadora de elétrons. Os valores de HOMO indicam que as moléculas TZX e NTM, por adição de grupos doadores de elétrons demonstram maior nucleofilicidade que a NTZ (Figura 16).

**Figura 16.** Fórmulas estruturais das moléculas **TZN** e **NTM**.

A adição do grupamento nitro nas moléculas **N-TZX** e **N-NTM** (Figura 17) diminuiram a nucleofilicidade uma vez que os compostos obtiveram menores valores HOMO e maiores valores de GAP, indicando maior estabilidade, em relação a uma baixa reatividade em reações químicas. As moléculas que resultaram em baixos valores de LUMO, tendem a ser melhores eletrófilos, assim, com melhor capacidade de aceção de elétrons se relacionando ao potencial de redução do grupo nitro, o qual é essencial para atividade biológica de nitrocompostos (PAULA et al. 2009).

**Figura 17.** Fórmulas estruturais das moléculas **N-TZN** e **N-NTM**.

A análise da formação dos glóbulos dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO (Figura 18) indicam regiões nucleofílicas e eletrofílicas, respectivamente. Para HOMO, houve contribuição mais representativa do grupo amino-nitro-azólico. Em LUMO, observa-se a contribuição dos grupamentos benzamida, e amino-nitro-azólico.

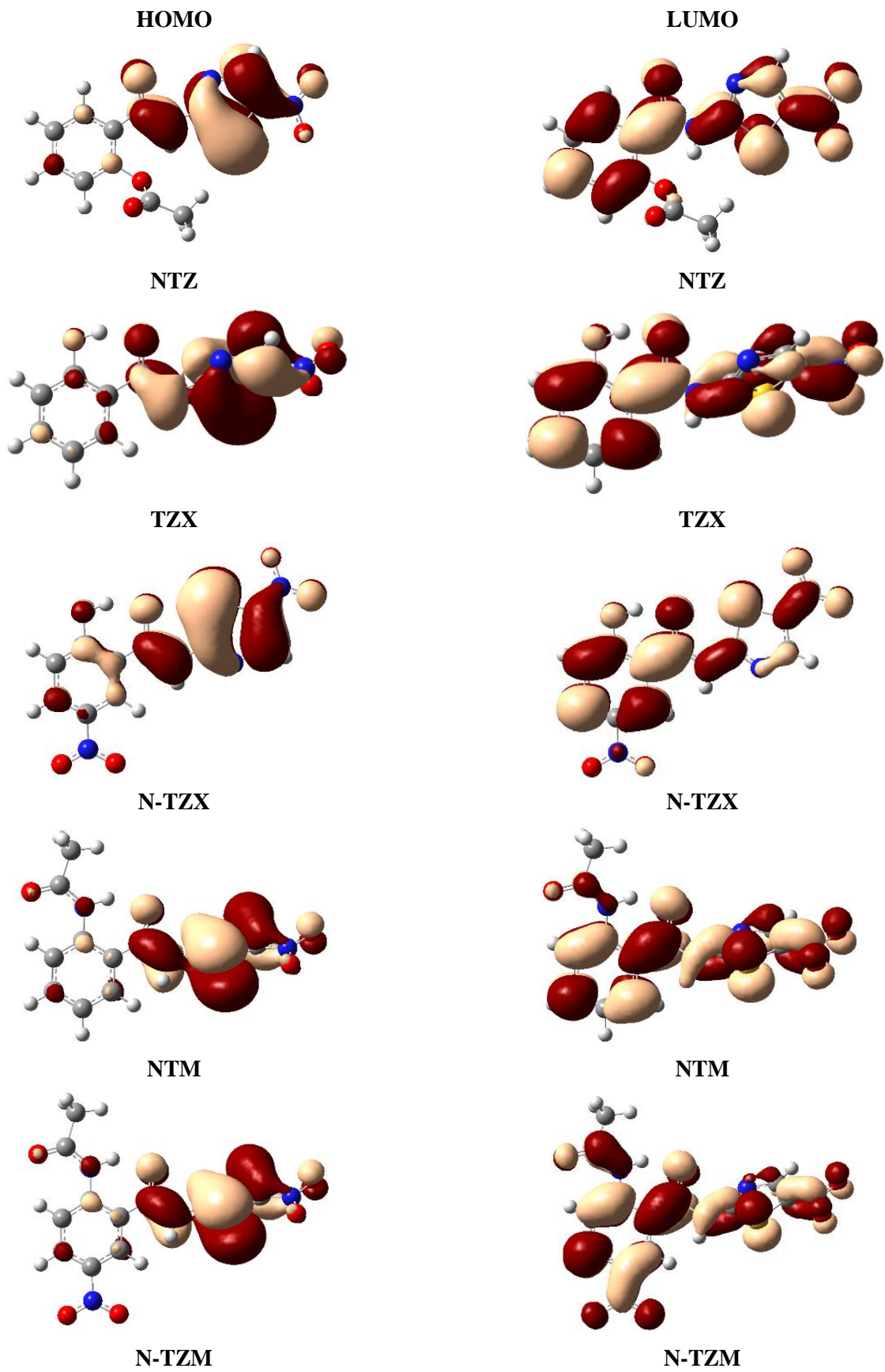


Figura 18. Orbitais de fronteira dos análogos da nitazoxanida.

A presença do grupamento nitro nas moléculas **N-TZX** e **N-NTM** diminuíram valores da afinidade eletrônica, parâmetro relacionado com a capacidade de a molécula aceitar um elétron tornando-as uma espécie iônica (LEWARS, 2011). Nessas condições as moléculas **TZX** e **NTM** também apresentaram valores de afinidade eletrônica menores que da **NTZ**. Estudos mecanísticos apontam que a forma iônica da **NTZ** é biologicamente ativa (BALLARD et al. 2010).

Pesquisas com análogos da **NTZ**, visando atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (*in vitro*), relataram que a presença do grupo nitro é um pré-requisito para eficiente atividade contra a bactéria em questão, assim, a retirada deste grupamento inativa a molécula (ODINGO et al. 2017).

Os MPE's das moléculas em questão foram obtidos a partir das conformações de menores energias (Figura 19). Estes resultados demonstraram certas uniformidades indicando menores diferenças de eletronegatividade. Os MPE's da **NTZ** e seus análogos a densidade de carga negativa sobre a região que apresenta o grupo nitro é significativa e se relaciona com as moléculas derivadas do amino-nitro-azólicos. Estudos relatam que a presença do grupamento nitro na molécula **NTZ** pode exercer estresse nitrosativo ou poderia ser convertido em um radical livre, demonstrando efeito contra parasitas extracelulares (NAGULESWARAN et al. 2005). Atualmente é considerado que a atividade da **NTZ** é dependente da redução intracelular do seu grupo nitro pelas nitro-redutases de maneira similar à da **MTZ** (SISSON et al. 2002).

Na molécula da **NTZ** a região mais negativa é localizada no grupo carbonila. Nas moléculas **NTM** e **N-NTM**, a carga negativa se localiza no oxigênio do grupamento amida ligado ao anel aromático, sendo esta mais intensa que nos grupamentos nitro presente nestas moléculas. Atividades da **NTZ** contra parasitas intracelulares foram relatadas sem envolvimento da presença do grupamento nitro associado ao anel tiazol, e especula-se que modificações no anel benzeno podem revogar a eficácia desta droga (ESPOSITO et al. 2005). Os análogos que apresentam mesmo grau de similaridade a **NTZ** poderiam apresentar atividades biológicas semelhante ou melhores.

Enquanto que valores menos negativos, caracterizados por uma relativa ausência de elétrons, estão localizados próximos ao átomo de nitrogênio do grupamento amino ligado ao anel heterocíclico, e mais representativo na molécula **NTZ** próxima as metilas do grupamento éster.

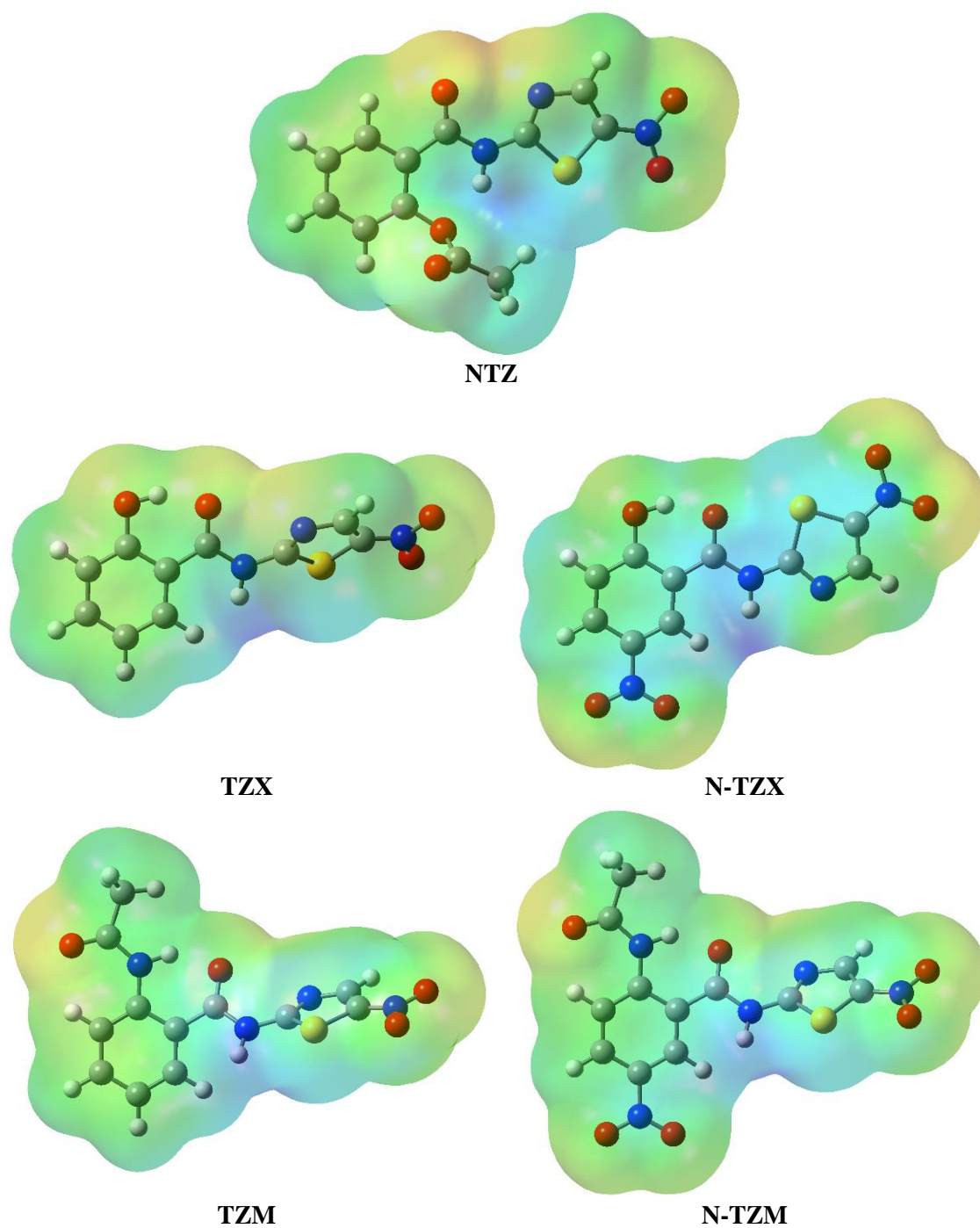


Figura 19. Mapa do potencial eletrostático da NTZ e análogos.

5.1.2 Análise conformacional da nitazoxanida e análogos

As menores conformações de energia em Kcal/mol para cada composto foram obtidas por DFT/B3LYP/6-31G(d,p) e são mostradas na Figura 20. Primeiramente apenas das moléculas **NTZ**, **TZX** e **NTM**.

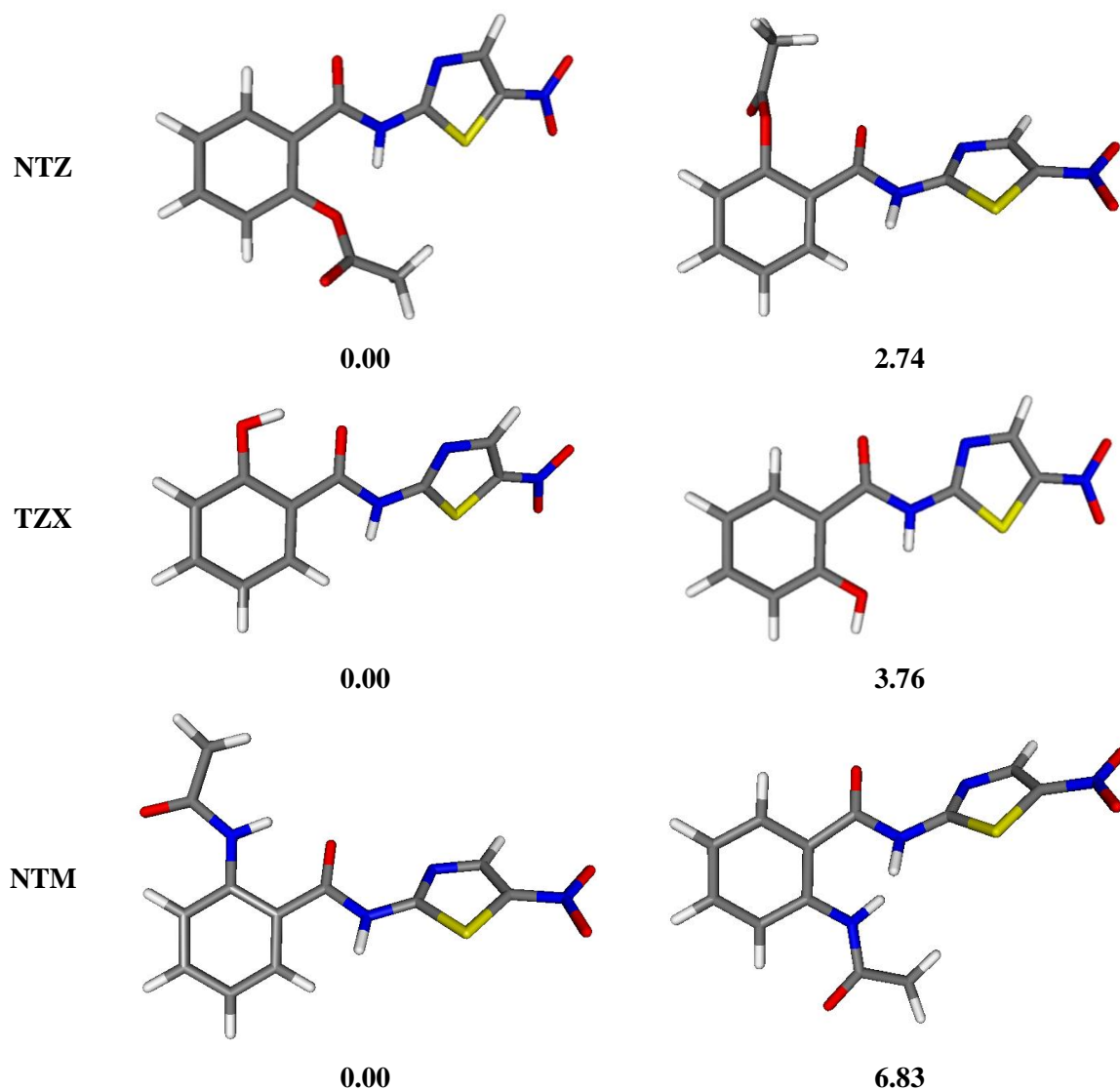


Figura 20. Estruturas utilizadas no estudo de análise conformacional.

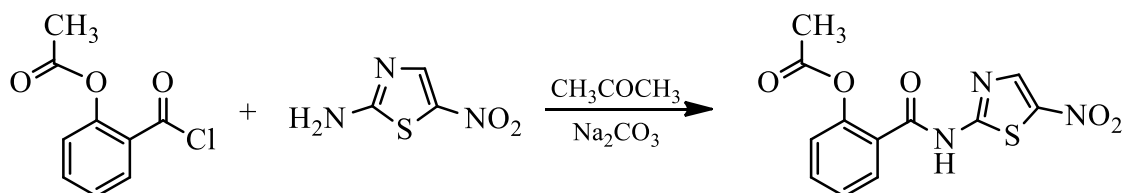
A estrutura de menor energia da molécula **NTZ** destaca-se pela interação através da ligação de hidrogênio N-H ... O (1,92Å). A estrutura de cristalina relatada Bruno *et al.* (2010) relata formação de ligação de hidrogênio intramoleculares N-H ... O (2,01 Å), sendo estas responsáveis por proporcionar estabilidade ao cristal. Análises energéticas podem prever quais processos moleculares são prováveis e/ou capazes de ocorrer (YONG, 2001).

A estrutura de menor energia da **TZX** é compatível com a do derivado **NTM**, indicando uma relação entre este derivado com o principal metabólito ativo da **NTZ**. O estudo de modelagem destas moléculas identificaram a similaridade conformacional existente, tal como a similaridade química, na qual mesmo com diferença na estruturas, mas com estruturas eletrônicas semelhantes indicam possíveis efeitos biológicos similares (BORGES, 2017).

As conformações calculadas e obtidas com menores valores de energia são consideradas aquelas de maior estabilidade, indicando que menor energia é necessária para a transição entre as duas formas, dificultando a interação dos grupos funcionais com um possível receptor no processo de interação (RODRIGUES, 2001). Além da conformação em concordância com a **TZX**, o derivado **NTM** poderá apresentar maior estabilidade devido a mudança do grupo éster por amida, bem como uma alteração na solubilidade da molécula. De fato, estas mudanças podem ter impacto significativo nas propriedades físico-químicas e farmacêuticas destas moléculas. Resultados biológicos do **NTM** indicam atividade diante da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (HOFFMAN *et al.* 2010; HOFFMAN *et al.* 2014).

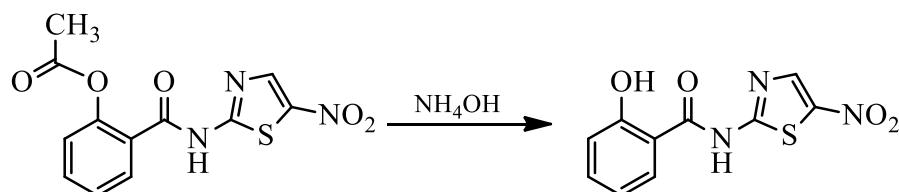
5.2 PROPOSTAS DE SÍNTESES DA NITAZOXANIDA E ANÁLOGOS

A reação da **NTZ** ocorreu com rendimento inferior a 50,0%, sendo considerado baixo, no entanto favorável de forma qualitativa (Esquema 5). O composto se apresenta como cristais amarelos e ponto de fusão que varia entre 199-201,5 °C. Este resultado concorda com outros estudos que seguem na faixa de 200 a 202 °C (THE MERCK INDEX, 2013; SURECH *et al.* 2016). Gupta e Kumar (2016) relataram síntese semelhante a partir do *O*- cloreto de acetilsaliciloilo em uma condição de acoplamento anidro com 2-amino-5-nitrotiazol na presença de trietilamina (Et₃N) em tetrahydrofurano (TFH).



Esquema 5: Síntese da nitazoxanida.

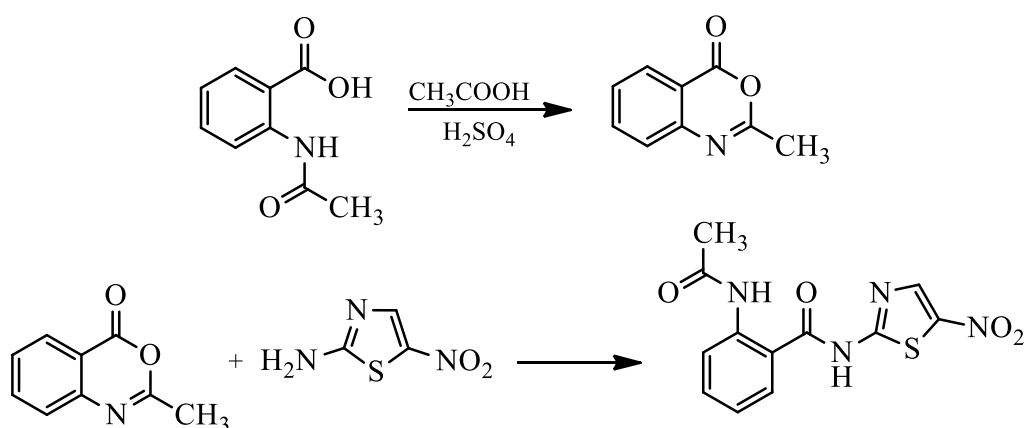
A partir da molécula **NTZ** foi realizada uma proposta de síntese do análogo **TZX**, o qual apresentou ser uma molécula escura, que ainda precisa de melhor purificação (Esquema 6).



Esquema 6: Síntese da tizoxanida.

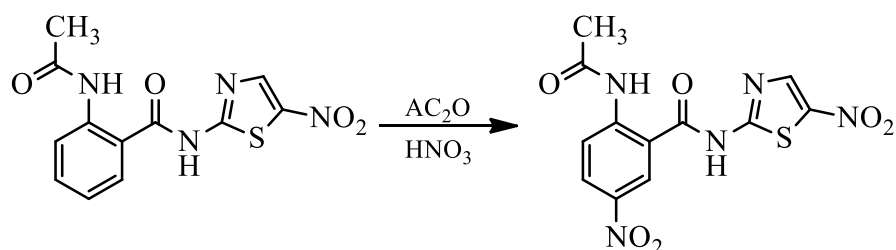
Estudos biológicos com esta molécula são realizados demonstrando interesse, a qual apresenta atividade igualada ou melhor que seu composto de origem (DUBREUIL *et al.* 1996; NAVARRETE-VAZQUEZ *et al.* 2011). No entanto, não há determinação do ponto de fusão para comparação com nosso estudo.

A síntese da **NTM** ocorreu com rendimento superior a 80,0% (Esquema 7). O composto apresentou cor alaranjada e ponto de fusão variando entre 203,1-205,0 °C. a partir de uma metodologia semelhante esta molécula foi sintetizada e demonstrou atividade antituberculosa (HOFFMAN *et al.* 2010; HOFFMAN *et al.* 2014). A partir de um conjunto de análogos avaliados em estudos de estrutura-atividade identificou-se que a molécula **NTM** demonstrou baixa atividade micromolar contra *Mycobacterium tuberculosis* (ODINGO *et al.* 2017). No entanto, a elucidação do composto sintetizado para este estudo não foi variável, fazendo-se necessário repetir com outras metodologias.



Esquema 7: Síntese da nitazoxamida.

O composto **NTM** foi nitrado para a obtenção do análogo **N-NTM**. O composto está em fase de purificação (Esquema 8).



Esquema 8: Metodologia sintética para a preparação do derivado **N-TZM**.

Os compostos estão em fase de purificação e caracterização usando o método ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono. Os estudos prosseguirão com trabalhos complementados com testes farmacológicos.

6. CONCLUSÃO

Com nossos resultados obtidos, podemos concluir que:

Os derivados amino-nitro-azólicos indicaram que modificações no anel tiofeno podem reduzir o potencial redox do composto alterando reatividade e a toxicidade.

Todos os análogos da nitazoxanida propostos se comportam como melhores eletrófilos, destacando a presença do grupo nitro, demonstrando possível influência em atividades biológicas.

A adição de mais um grupo nitro nos análogos da nitazoxanida indicaram maiores estabilidades e maior capacidade de aceção de elétrons, o que é essencial para atividade biológica de nitrocompostos.

A geometria de energia mínima da nitazoxanida obtida pelo método DFT/B3LYP/6-31G(d,p) é similar a estrutura experimental cristalográfica.

As estruturas mais estáveis dos análogos tizoxanida e nitazoxamida são compatíveis em termos de similaridade conformacional.

Uma rota sintética para a nitazoxanida a partir de um derivado do ácido acetil-salicílico foi realizada com sucesso e altos rendimentos.

Os compostos foram sintetizados e após a elucidação estrutural por métodos de ressonância magnética nuclear estarão disponíveis para avaliação biológica em futuros trabalhos.

REFERÊNCIAS

- ADEDEJI, W. A. The treasure called antibiotics. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*. 14(2): 56–57, 2016.
- ANDERSON, V.; CURRAN, M. Nitazoxanide a review of its use in the treatment of gastrointestinal infections. *Drugs*. 67(13): 1947-1967, 2007.
- ARROIO, A.; HONORIO, K. M.; SILVA, A. B. F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. *Química Nova*. 33(3): 694-699, 2010.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 3(8): 673-83, 2004.
- BALLARD, T. E.; WANG, X.; OLEKHNOVICH, I.; KOERNER, T.; SEYMOUR, C.; HOFFMAN, P. S.; MACDONALD, T. L. Biological activity of modified and exchanged 2-amino-5-nitrothiazole amide analogues of nitazoxanide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20: 3537–3539, 2010.
- BARREIRO, E. J. A química medicinal e o paradigma do composto-protótipo. *Revista Virtual de Química*. 1(1): 26-34, 2009.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**, 2ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BARTEL, L.; MECCA, M.; FANELLI, S.; CASTRO, C.; DIAZ, E.; CASTRO, J. Early nifurtimox-induced biochemical and ultrastructural alterations in rat heart. *Human e Experimental Toxicology*. 26: 781-788, 2007.
- BARTEL, L.; MECCA, M.; CASTRO, C.; BIETTO, F.; CASTRO, J. Metabolization of nifurtimox and benznidazole in cellular fractions of rat mammary tissue. *Human e Experimental Toxicology*. 29: 813-822, 2010.
- BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A*. 38: 3098, 1988.
- BHATTACHARJEE, A. K.; SKANCHY, D. J.; JENNINGS, B.; HUDSON, T. H.; RENDLE, J. J.; WERBOVETZ, K. A. Analysis of Stereoelectronic Properties, Mechanism of Action and Pharmacophore of Synthetic Indolo[2,1-b]quinazoline-6,12-dione Derivatives in Relation to Antileishmanial Activity Using Quantum Chemical, Cyclic Voltammetry and 3-D-QSAR CATALYST Procedures. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 10: 1979–1989, 2002.
- BOLICK, D. T.; ROCHE, J. K.; HONTECILLAS, R.; BASSAGANYA-RIERA, J.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* strain in a novel weaned mouse model: exacerbation by malnutrition, biofilm as a virulence factor and treatment by nitazoxanide. *Journal of Medical Microbiology*. 62(6): 896-905, 2013.
- BORGES, R. S.; OLIVEIRA, J. P.; MATOS, R. F.; CHAVES NETO, A. M. J.; CARNEIRO, A.; MONTEIRO, M. Involvement of electron and hydrogen transfers through redox metabolism on activity and toxicity of the nimesulide. *Journal of Molecular Modeling*. 21: 166, 2015.

- BORGES, R. S. Química farmacêutica fundamental. 1ª ed. Belém: [s.n.], 2017.
- BOSQUESI, P.; ALMEIDA, A.; BLAU, L.; MENEGON, R.; SANTOS, J.; CHUNG, M. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 29(3): 231-238, 2008.
- BROEKHUYSEN, J.; STOCKIS, A.; LINS, R.; DE GRAEVE, J.; ROSSIGNOL, J. F. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**. 38(8): 387-394, 2000.
- BRUNO, F. P.; CAIRA, M. R.; MONTI, G. A.; KASSUHA, D. E.; SPERANDEO, N. R. Spectroscopic, thermal and X-ray structural study of the antiparasitic and antiviral drug nitazoxanide. **Journal of Molecular Structure**. 984: 51-57, 2010.
- BURKE, K. Perspective on density functional theory. **The Journal of Chemical Physics**. 136(15): 150901, 2012.
- CAREY, F. A.; GIULIANO, R. M. **Organic Chemistry**. 9th. New York: The McGraw-Hill. 2014.
- CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES A. D. L.; BERNARDES, L. S. C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**. 26(3): 428-438, 2003.
- CHABRIÈRE, E.; CHARON, M. H.; VOLBEDA, A.; PIEULLE, L.; HATCHIKIAN, E. C.; FONTECILLA-CAMPS, J. C. Crystal structures of the key anaerobic enzyme pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, free and in complex with pyruvate. **Nature Structural Biology**. 6(2): 182-190, 1999.
- COHEN, N. C. **Guidebook on molecular modeling in drug design**. San Diego: Academic Press, 1996.
- COLÍN-LOZANO, B.; LEÓN-RIVERA, I.; CHAN-BACAB, M. J.; ORTEGA-MORALES, B. O.; MOO-PUC, R.; LÓPEZ-GUERRERO, F.; HERNÁNDEZ-NÚÑEZ, E.; ARGÜELLO-GARCIA, R.; SCIOR, T.; BARBOSA-CABRERA, E.; NAVARRETE-VÁZQUEZ, G. Synthesis, in vitro and in vivo giardicidal activity of nitrothiazole-NSAID chimeras displaying broad antiprotozoal spectrum. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 27: 3490-3494, 2017.
- DEBNATH, A. K.; LOPEZ DE COMPADRE, R.L.; DEBNATH, G.; SHUSTERMAN, A. J.; HANSCH, C. Structure-activity relationship of mutagenic aromatic and heteroaromatic nitro compounds. Correlation with molecular orbital energies and hydrophobicity. **Journal Medicinal Chemistry**. 34(2): 786-97, 1991.
- DE LA FUENTE, R.; SONAWANE, N.; ARAMAINAYAGAM, D.; VERKMAN, A. Small molecules with antimicrobial activity against *E. coli* and *P. aeruginosa* identified by high-throughput screening. **British Journal of Pharmacology**. 149: 551-599, 2006.
- DUBREUIL, L.; HOUCKE, I.; MOUNTON, Y.; ROSSIGNOL, J. F. *In vitro* evaluation of activities of nitazoxanide and tizoxanide against anaerobes and aerobic organisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 40: 2266-2270, 1996.

ELAZAR, M.; LIU, M.; MCKENNA, S. A.; LIU, P.; GEHRIG, E. A.; PUGLISI, J.D.; ROSSIGNOL, J. F.; GLENN, J. S. The anti-hepatitis c agent nitazoxanide induces phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 alpha via protein kinase activated by double-stranded RNA activation. **Gastroenterology**. 137(5): 1827-1835, 2009.

ESPOSITO, M.; STETTLER, R.; MOORES, S. L.; PIDATHALA, C.; MÜLLER, N.; STACHULSKI, A.; BERRY, N.; ROSSIGNOL, J.F.; HEMPHILL, A. *In vitro* efficacies of nitazoxanida and other thiazolides against *Neospora caninum* tachyzoites reveal antiparasitic activity independent of the nitro group. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 49(9): 3715-3723, 2005.

FLEMING, A. Nobel Prize Lecture. 1945.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A. JR.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, Ö.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J.; 2004. Gaussian 03 Revision C.02. Gaussian 03 Revision C.02; Gaussian Inc., Wallingford CT.

FUJIWARA, M.; KAWASAKI, M.; HARIGUCHIA, N.; LIU, Y.; MATSUMOTO, M. Mechanisms of resistance to delamanid, a drug for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 108: 186–194, 2018.

GARGALA, G.; DELAUNAY, A.; LI, X.; BRASSEUR, P.; FAVENNEC, L.; BALLEST, J. J.; Efficacy of nitazoxanida, tizoxanide and tizoxanide glucuronide against *Cryptosporidium parvum* development in sporozoite-infected HCT-8 enterocytic cells. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 46: 57-60, 2000.

GILLES, H. M.; HOFFMAN, P. S. Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanida. **Trends in Parasitology**. 18(3): 95-97, 2002.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry**. 15(1): 37-46, 2008.

GUPTA, G. K.; KUMAR, V. **Chemical Drug Design**. Haryana: De Gruyter, 2016.

HADIGHEH-REZVAN, V.; PILEVAR-MALEKI, B. Structural and optical properties of some 5, 8-diaminoquinoxaline schiff bases: quantum chemical calculations. **Pelagia Research Library Der Chemica Sinica**. 9(1): 544-554, 2018.

HAFFIZULLA, J.; HARTMAN, A.; HOPPERS, M.; RESNICK, H.; SAMUDRALA, S.; GINOCCHIO, C.; BARDIN, M.; ROSSIGNOL, J. Effect of nitazoxanide in adults and adolescents with acute uncomplicated influenza: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. **The Lancet Infectious Diseases**. 14: 609-618, 2014.

HEMPHILL, A.; MUELLER, J.; ESPOSITO, M. Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. 7(7): 953-964, 2006.

HOFFMAN, P.; SISSON, G.; CROXEN, M.; WELCH, K.; HARMAN, W.; CREMADES, N.; MORASH, M. Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 51(3): 868-876, 2007.

HOFFMAN, P. S.; MACDONALD, T. L.; HOUP, E. P. BALLARD Jr., T. E.; Compositions and methods for treating tuberculosis. Int. App. No. PCT / US2010027397 23 set. 2010.

HOFFMAN, P. S.; GUERRANT, R. L.; MACDONALD, T. L.; BALLARD Jr., T. E.; Broad spectrum benzothioephene-nitrothiazolide and other antimicrobials Int. App. No. PCT / US00883564.4B2 16 set. 2014.

HUANG, X.; GUO, G.; CHEN, Z.; LIU, Y.; HE, L.; ZENG, Z.; YAN, C.; PAN, G.; LI, S. Metabolism of nitazoxanide in rats, pigs, and chickens: application of liquid chromatography coupled to hybrid linear ion trap/Orbitrap mass spectrometer. **Journal of Chromatography B**, 1000: 147–154, 2015.

KHATTAB, M. A. Targeting host factors: A novel rationale for the management of hepatitis C virus. **World Journal of Gastroenterology**. 15(28): 3472-3479, 2009.

KORBA, B. E.; ELAZAR, M.; LUI, P.; ROSSIGNOL, J.; GLENN, J. S. Potential for hepatitis C virus resistance to nitazoxanide or tizoxanide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 52(11): 4069–4071, 2008.

KOROLKOVAS, A. **Fundamentos da Farmacologia Molecular**. EDART, São Paulo: 1977.

KUMAR, R. M.; BASKAR, P.; BALAMURUGAN, K.; DAS, S.; SUBRAMANIAN, V. On the perturbation of the H-bonding interaction in ethylene glycol clusters upon hydration. **The Journal of Physical Chemistry A**. 116(17): 4239–4247, 2012.

LEWARS, E. G. Computational chemistry: introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics. 2nd ed. ed. New York: Springer, 2011.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G.; Development of the colle salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Journal of Physics B**. 37, 785-789, 1998

MAYA, J.; CASSELS, B.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 146: 601-620, 2007.

McMURRY, J. **Organic Chemistry**. 9th. Boston: Cengage Learning. 2016.

McVAY, C. S.; ROLFE, R. D. *In vitro* and *in vivo* activities of nitazoxanida against *Clostridium difficile*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 44: 2254-2258, 2000.

MÉGRAUD, F.; OCCHIALINI, A.; ROSSIGNOL, J. F. Nitazoxanide, a potential drug to eradicate *Helicobacter pylori* with no cross resistance to metronidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 42: 2836-2840, 1998.

Ministério da Saúde. Consultoria Jurídica/Advocacia Geral da União. Nota Técnica Nº 167/2012

MONTANARI, C. A. A química medicinal na próxima década. **Química Nova**. 23(1): 134-137, 2000.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. 4(2): 1-37, 2016.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2014.

MUSHER, D. M.; LOGAN, N.; HAMILL, R. J.; DUPONT, H. L.; LENTNEK, A.; GUPTA, A.; ROSSIGNOL, J. F. Nitazoxanide for the treatment of *Clostridium difficile* colitis. **Clinical Infectious Diseases**. 43:421-427, 2006.

NAGULESWARAN, A.; SPICHER, M.; ROSSIGNOL, J. F.; HEMPHILL, A. Investigations on the use of thiazolides for treatment of *Echinococcus granulosus* infections. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. 73(6): 58-58, 2005.

NAVARRETE-VAZQUEZ, G.; CHÁVEZ-SILVA, F.; ARGOTTE-RAMOS, R.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, M. C.; CHAN-BACAB, M. J.; CEDILLO-RIVERA, R.; MOOPUC, R.; HERNÁNDEZ-NUÑEZ, E. Synthesis of benzologues of nitazoxanide and tizoxanide: a comparative study of their *in vitro* broad-spectrum antiprotozoal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 21: 3168–3171, 2011.

NOGRADY, T.; WEAVER, D. F. Medicinal chemistry: a molecular and biochemical approach. **Oxford University Press**, 2005.

OSAKWE, O. The significance of discovery screening and structure optimization studies. In: *Social Aspects of Drug Discovery, Development and Commercialization*, Odilia Osakwe Syed Rizvi. p.109-128, 2016. 1st edition Academic Press:

ODINGO, J.; BAILEY, M. A.; FILES, M.; EARLY, J. V.; ALLING, T.; DENNISON, D.; BOWMAN, J.; DALAI, S.; KUMAR, S.; CRAMER, J.; MASQUELIN, T.; HIPSKIND, P.A.; PARISH, T. *In vitro* evaluation of novel nitazoxanide derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. **ACS Omega**, 2: 5873–5890, 2017.

PADHY, B. M.; GUPTA, Y. K. Drug repositioning: Re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. **Journal of Postgraduate Medicine**. 57(2) 153-160, 2011.

PAPADOPOULOU, M. V.; BLOOMER, W. D.; ROSENZWEIG, H. S.; WILKINSON, S. R.; SZULAR, J.; KAISER, M. Antitrypanosomal activity of 5-nitro-2-aminothiazole- based **European Journal of Medicinal Chemistry**. 117: 179-186, 2016.

PARR, R. G.; YANG, W.; **Density Functional Theory of Atoms and Molecules**. Oxford University Press: New York. 1, 47, 1989.

PARASKEVOPOULOS, G.; KRÁTKY, M.; MANDÍKOVÁ, J.; TREJTAR, F.; STOLARÍKOVÁ, J.; PÁVEK, P.; BESRA, G.; VINŠOVÁ, J. Novel derivatives of nitro-substituted salicylic acids: synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**. 23: 7292-7301, 2015.

PAULA, F.; SERRANO, S.; TAVARES, L. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**. 32(4), 1013-1020, 2009.

PAWLOWSKI, A. C.; JOHNSON, J. W.; WRIGHT, G. D. Evolving medicinal chemistry strategies in antibiotic discovery. **Current Opinion in Biotechnology**. 42: 108-117, 2016.

RAETHER, W.; HÂNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology Research**. 90: 19-39, 2003.

RODRIGUES, C. R. Processos modernos no desenvolvimento de fármacos: modelagem molecular. **Química Nova**. 3: 43-49, 2001.

ROSSIGNOL, J. F. Nitazoxanide: a first-in-class broad-spectrum antiviral agent. **Antiviral Research**. 110: 94-103, 2014.

ROSSIGNOL, J. F. Nitazoxanide, a new drug candidate for the treatment of middle east respiratory syndrome coronavirus. **Journal of Infection and Public Health**. 9: 227-230, 2016.

ROSSIGNOL, J. F.; ABU-ZEKRY, M.; HUSSEIN, A.; SANTORO, M. Effect of nitazoxanide for treatment of severe rotavirus diarrhea: randomized double-blind placebo-controlled trial. **The Lancet**. 368: 124-129, 2006.

ROSSIGNOL J. F.; AYOUB, A.; AYERS, M. S. Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*: a double-blind, placebocontrolled study of nitazoxanide. **The Journal Infectioust Diseases**. 184, 381-384, 2001.

ROSSIGNOL, J. F.; CAVIER, R. New derivatives of 2-benzamido 5-nitrothiazoles. **United States patent** n 3.950.351. 13, 1976.

ROSSIGNOL, J. F.; ELFERT, A. S.; EL-GOHARY, Y. KEEFFE, E. B. Improved virologic response in chronic hepatitis C genotype 4 treated with nitazoxanide, peginterferon and ribavirin . **Gastroenterology**. 136: 856-862, 2009. b

ROSSIGNOL, J. F.; KEEFFE, E. Thiazolides: a new class of drugs for the treatment of chronic hepatitis B and C. **Future Microbiology**. 3(5): 539-545, 2008.

ROSSIGNOL, J. F.; LA FRAZIA, S.; CHIAPPA, L.; CIUCCI, L.; SANTORO M. G. Thiazolides, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational leve. **The Journal of Biological Chemistry**. 284(43): 29798–29808, 2009. a

ROUF, A.; TANYELI, C. Bioactive thiazole and benzothiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 97: 911-927, 2015.

RUIZ-OLMEDO, M. I.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, I.; PALOMARES-ALONSO, F.; FRANCO-PÉREZ, J.; GONZÁLEZ F. M. L.; JUNG-COOK, H. Effect of nitazoxanide on albendazole pharmacokinetics in cerebrospinal fluid and plasma in rats. **Saudi Pharmaceutical Journal**. 25(3): 413-418, 2017.

SAMADHIYA, P.; SHARMA, R.; SRIVASTAVA, S. K. Synthesis and antitubercular activity of 4-oxo-thiazolidine derivatives of 2-amino-5-nitrothiazole. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, 27(2): 249-263, 2013.

SAMADHIYA, P.; SHARMA, R.; SRIVASTAVA, S. K.; SRIVASTAVA, S. D. Synthesis and biological evaluations of 4-thiazolidinone derivatives as antitubercular and antimicrobial agentes. **Arabian Journal of Chemistry**. 7: 657-665, 2014.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Química Nova**. 1(1): 49-57, 2009.

SANT'ANNA, C. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**. 25(3): 505-512, 2002.

SANTOS, C.; LOBATO, C.; SOUSA, M.; MACÊDO, W.; CARVALHO, J. Molecular modeling: origin, fundamental concepts and applications using structure-activity relationship and quantitative structure-activity relationship. **Reviews in Theoretical Science**. 2: 1-25, 2014

SATYANARAYANAJOIS, S. D.; HILL, R. A. Medicinal chemistry for 2020. *Future Medicinal Chemistry*. 3(14): 1765-86, 2011.

SCIOR, T.; LOZANO-APONTE, J.; AJMANI, S.; HERNANDEZ-MONTERO, E.; CHAVEZ-SILVA, F.; HERNANDEZ-NUNEZ, E; MOO-PUC, R.; FRAGUELA-COLLAR, A.; NAVARRETE-VAZQUEZ, G. Antiprotozoal Nitazoxanide Derivatives: Synthesis, Bioassays and QSAR Study Combined with Docking for Mechanistic Insight. **Current Computer-Aided Drug Design**. 11(1): 21-31, 2015.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; VELASCO, M. V. R.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso de cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 43(2): 153-166, 2007.

SCHILLACI, D.; SPANÒ, V.; PARRINO, B.; CARBONE, A.; MONTALBANO, A.; BARRAJA, P.; DIANA, P.; CIRRINCIONE, G.; CASCIOFERRO, S. Pharmaceutical approaches to target antibiotic resistance mechanisms. **Journal of Medicinal Chemistry**. 60(20): 8268-8297, 2017.

SHAMIR, E. R.; WARTHAN, M.; BROWN, S. P.; NATARO, J. P.; GUERRANT, R. L.; HOFFMAN, P. S. Nitazoxanide inhibits biofilm production and hemagglutination by enteroaggregative *Escherichia coli* strains by blocking assembly of AafA fimbriae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 54(4): 1526-33, 2010.

SISSON, G.; GOODWIN, A.; RAUDONIKIENE, A.; HUGHES, N.; MUKHOPADHYAY, A.; BERG, D.; HOFFMAN, P. Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanida, nitrofurans, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 46(7): 2116-2123, 2002.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semi-empirical methods I. Method. **J. Comput. Chem.** 10: 209-220, 1989.

STOCKIS, A.; DEROUBAIX, X.; LINS, R.; JEANBAPTISTE, B.; CALDERON, P.; ROSSIGNOL, J. F. Pharmacokinetics of nitazoxanide after single oral dose administration in 6 healthy volunteers. **International journal of clinical pharmacology and therapeutics.** 34(8): 349-51, 1996.

STRENALYUK, T.; SAMDAL, S.; VOLDEN, H. V. Molecular structures of chloro(phthalocyaninato)-aluminum(iii) and -gallium(iii) as determined by gas electron diffraction and quantum chemical calculations: quantum chemical calculations on fluoro(phthalocyaninato)-aluminum(iii) and -gallium(iii), chloro. **The Journal of Physical Chemistry A.** 112(38): 9075-9082, 2008.

SURECH, K.; MANNAVA, C.; NANGIA, A. Cocrystals and alloys of nitazoxanide: enhanced pharmacokinetics. **Chemical Communications.** 52: 4223-4226, 2016.

TACCONELLI, E.; CARRARA, E.; SAVOLDI, A.; HARBARTH, S.; MENDELSON, M.; MONNET, D. L.; PULCINI, C.; KAHLMETER, G.; KLUYTMANS, J.; CARMELI, Y.; OUELLETTE, M.; OUTTERSON, K.; PATEL, J.; CAVALERI, M.; COX, E. M.; HOUCHEMS, C. R.; GRAYSON, M. L.; HANSEN, P.; SINGH, N.; THEURETZBACHER, U.; MAGRINI, N.; WHO PATHOGENS PRIORITY LIST WORKING GROUP. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **Lancet Infect Dis.** 18(3): 318-327, 2018.

TAMULIENE, J.; SARLAUSKAS, J.; BEKESIENE, S. Influence of nitro group substitutes to the stability and energetic properties of N-(2,4,6-trinitrophenyl)-1H-1,2,4-triazol-3-amine. **American Journal of Analytical Chemistry.** 8: 125-141, 2017.

TANIGUCHI, C., GUENGERICH, F. P. **Metabolismo dos fármacos.** In Princípios de farmacologia - A base fisiopatológica da farmacoterapia. (Koogan, G., Ed.), Guanabara. Koogan: Rio de Janeiro, Brasil: 46-57, 2009.

THE MERCK INDEX, 15th edition, 2013.

TCHOUAFFI-NANA, F.; BALLARD, T. E.; CHRISTINE H. CARY, MACDONALD, T. L.; SIFRI, C. D.; HOFFMAN, P. S. Nitazoxanide inhibits biofilm formation by staphylococcus epidermidis by blocking accumulation on surfaces. **Antimicrob Agents Chemother.** 54(7): 2767-2774, 2010.

TUMER, T.; ONDER, F.; IPEK, H.; GUNGOR, T.; SAVRANOGLU, S.; TOK, T.; CELIK, A.; AY, M. Biological evaluation and molecular docking studies of nitro benzamide derivatives with respect to in vitro anti-inflammatory activity. **International Immunopharmacology.** 43: 129-139, 2017.

VALE, J.; LIMA, A.; PINHEIRO, B.; CARDOSO, A.; SILVA, J.; MAIA, J.; BORGES, R. Evaluation and theoretical study on the anti-inflammatory mechanism of 1-nitro-2-phenylethane. **Planta Medica.** 79(08): 628-633, 2013.

VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E.; ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nat Rev Drug Discov.** 2(3): 192-204, 2003.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis. *Pharmacy and Therapeutics*. 40(4): 277-283, 2015.

VIODÉ, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, L.; CHAUVIÈRE, G.; BAKALARA, N.; PÉRIÉ., J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. **Biochemical Pharmacology**. 57: 549-557, 1999.

WANG, Y.; LU, J.; LIN, C.; CHIN, Y.; WU, T.; LIN, L.; LAI, Z.; KUO HO, Y. Antiviral activities of niclosamide and nitazoxanida against chikungunya virus entry and transmission. **Antiviral Research**. 135: 81-90, 2016.

WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. London: Academic Press. 2003.

WERMUTH, C. G., GANELLIN, C. R. LINDBERG, O. MITSCHER, L. A. **Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations, 1997)**. In Annual Reports In Medicinal Chemistry (Adam, J., Ed.). Academic Press: San Diego, CA: 385-395, 1998.

XU, M.; ZHANG, A.; HAN, S.; WANG, L. Studies of 3D-quantitative structure-activity relationships on a set of nitroaromatic compounds: COMFA, advanced Comfa and CoMSIA. **Chemosphere**. 48: 707-715, 2002.

YAMAMOTO, Y.; HAKKIA, A.; FRIEDMANA, H.; OKUBO, S.; SHIMAMURA, T.; HOFFMAN, P. S.; ROSSIGNOL, J. F. Nitazoxanide, a nitrothiazolide antiparasitic drug, is an anti-*Helicobacter pylori* agent with anti-vacuolating toxin activity. **Chemotherapy**. 45: 303-3012, 1999.

YAN, X.; XIÃO, H.; GONG, X.; JU, X. Quantitative structure-activity relationships of nitroaromatics toxicity to the algae (*Scenedesmus obliquus*). **Chemosphere**. 59: 467-471, 2005.

YONG, D. C. **Computational chemistry a practical guide for applying techniques to real-world problems**. New York: Wiley Interscience, 2001.

ZHANG, G.; MUSGRAVE, C. B. Comparison of DFT methods for molecular orbital eigenvalue calculations. **J. Phys. Chem. A**, 111: 1554-1561, 2007.