



UEPB

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA GENERALISTA**

WILLIAN CHARLES DA SILVA MOURA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS SUBSTITUÍDOS**

Campina Grande – PB
2016

WILLIAN CHARLES DA SILVA MOURA

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS SUBSTITUÍDOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Bacharelado de Farmácia da Universidade
Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência
para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Química Medicinal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura

Coorientadora: Prof. Me. Zilka Nanes Lima

Campina Grande – PB

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

M929p Moura, Willian Charles da Silva.

Planejamento, síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de derivados N-acilidrazônicos substituídos [manuscrito] / Willian Charles da Silva Moura. - 2016.
64 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, Departamento de Farmácia".

"Co-Orientação: Profa. Ma. Zilka Nanes Lima, Departamento de Farmácia".

1. Planejamento de fármacos. 2. Síntese de hidrazonas. 3. Atividade antimicrobiana. I. Título.

21. ed. CDD 615.1

WILLIAN CHARLES DA SILVA MOURA

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS SUBSTITUÍDOS


Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Bacharelado de Farmácia da Universidade
Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência
para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

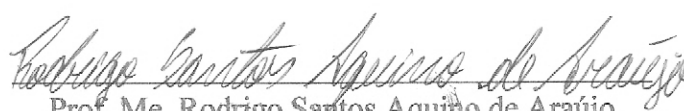
Área de concentração: Química Medicinal

Aprovado em: 06/10/16

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Harley da Silva Alves
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Me. Rodrigo Santos Aquino de Araújo
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

DEDICATÓRIA

Mãe, pai, irmão, esposa e filho, sem vocês nada disso seria possível. Obrigado pelo apoio, carinho e compreensão. Essa vitória não é só minha, é nossa!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou meu caminho durante toda esta longa caminhada;

À minha mãe Eurides Moura, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço, me encorajando, lutando e vencendo todas as barreiras que surgiam durante a minha vida acadêmica.

Ao meu pai Charles Moura, que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu e que, para mim, foi essencial seu apoio e sua perseverança.

Obrigado meu irmão Wandson Charles, que por muitos anos conviveu comigo longe de nossos pais e que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo superior, sempre fez entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente!

A minha esposa, companheira e amante, Alda Moura, a qual me levantou todas as vezes em que estive ao chão, que me fez sorrir todas as vezes em que estava aos prantos e que sempre esteve ao meu lado apoiando e me erguendo diante das dificuldades.

Ao meu filho, Heitor Charles, que veio ao mundo na minha reta final da graduação e que renovou meu espírito e meu ser me ensinando o que é ser “Pai” e que amor de filho não há igual. Certamente o seu nascimento é, e sempre será, a maior de todas as vitórias que tive nessa vida, pois hoje eu tenho uma família completa e esse sentimento é o combustível para que eu possa dar sequência, com maior convicção, na minha vida acadêmica.

Meus agradecimentos aos amigos e amigas da turma de Farmácia 2011.2, companheiros de trabalhos e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com toda certeza.

A minha coorientadora e professora Zilka Nanes Lima, pela oportunidade ao me oferecer o primeiro contato como aluno pesquisador o qual se abriram as portas para a busca pelo conhecimento e descoberta da minha verdadeira vocação.

Ao professor Ricardo Olimpio de Moura, pela orientação, apoio e confiança, assim como pela dedicação e ensinamentos que adquiri nos últimos anos através de sua pessoa, me conduzindo pelos caminhos das incertezas e descobertas que um pesquisador enfrenta diariamente, pois um homem que sabe o que quer já percorreu um longo caminho para alcançá-lo.

Por fim, Agradeço a todos os professores por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais, sem nominar, terão os meus eternos agradecimentos.

RESUMO

A resistência bacteriana aos antibióticos é atualmente um dos problemas de saúde pública mais relevantes, o que desperta a necessidade do desenvolvimento de novas moléculas bioativas. Sendo as subunidades estruturais acilidrazonas fragmentos privilegiados e com atividades biológicas bem relatadas, seu esqueleto carbônico tem sido utilizado na busca por novos *hits* promissores. Este estudo teve como objetivo o planejamento, a síntese e a avaliação *in vitro* do perfil antibacteriano de derivados *N*-acilidrazônicos substituídos, visando obter possíveis agentes terapêuticos mais eficazes, seguros e potentes. Os compostos foram obtidos através de uma reação de condensação de diferentes aldeídos aromáticos substituídos ou não, com 2-ciano-aceto-hidrazida em meio etanólico e ácido, conduzindo aos compostos finais. Os testes antibacterianos foram realizados por meio da técnica de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M7-A9 (CLSI, 2015). As cepas testadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATC 25922. Foram sintetizados onze derivados *N*-acilidrazônicos apresentando rendimentos que variaram entre 53 e 94%, sendo alguns deles caracterizados por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C DEPT-Q cujas estruturas apresentaram sinais de deslocamento químico entre 8,16 e 8 ppm sugestivos de hidrogênios de grupamento imínico caracterizando, assim, o sucesso da síntese. Além disso, foi realizados estudos de análise conformacional enfatizando a possibilidade de conformeros *syn* e *anti-periplanar*, sendo o *syn-periplanar* o que apresentou menor energia estérica. O Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) sederam os compostos *N*-acilidrazônicos acridínicos (AMAC01 e ACSAZ). Na avaliação biológica foram testadas treze mléculas, dentre as quais destacamos o composto AMAC01, que apresentou melhor atividade frente às duas cepas testadas (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o que pode ser explicado pela presença do núcleo acridínico sem substituintes. Para a série JR, os compostos nitrados substituídos nas posições *orto* e *para* apresentaram melhor atividade para ambas as cepas, sendo mais ativo para estirpe de *E. Coli* (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Baseado nos resultados se constatou que os compostos que apresentam anéis aromáticos deficientes de elétrons ligados diretamente a uma função imina como, acridínico e grupamento nitro em posição *orto* ou *para*, podem ser trabalhados posteriormente aplicando-se técnicas de modificação molecular a fim de obter um *Hit* promissor.

Palavras-chaves: Planejamento de Fármacos, Síntese de Hidrazonas, Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics is currently one of the most important public health problems, which arouses the need to develop new molecules bioactive. Since the structural subunits acylhydrazones privileged fragments, and your well-reported biological activities, their carbon skeleton has been used in the search for new *hits*. This study aimed the planning, synthesis and *in vitro* evaluation of antibacterial profile of substituted *N*-acylhydrazones derivatives, as possible more effective therapeutic agents, safe and powerful. The compounds were obtained by a condensation reaction of different aromatic aldehydes substituted or unsubstituted, with 2-cyano-acetohydrazide in ethanol and acid médium, leading to final compounds. The antibacterial tests were performed using the broth microdilution technique according to the M7-A9 (CLSI, 2012). The strains were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. Were synthesized eleven *N*-acylhydrazones derivatives, presenting yields between 53 and 94%, some of them were characterized by ¹H and ¹³C NMR DEPT-Q whose structures presented chemical shifts signals between 8,16 and 8 ppm suggesting hydrogens imino grouping characterizing thus the success of the synthesis. Moreover, conformational analysis studies were performed, emphasizing the possibility of *syn* and *anti-periplanar* conformers, being *syn-periplanar* the conformer of smaller steric energy. In biological evaluation were tested thirteen molecules, among which we highlight the AMAC01 compound, which showed better activity against the two strains tested (256 µg/mL), which can be explained by the presence of the acridínico moiety without substituents. For JR series, the nitrated compounds substituted in the ortho and para positions showed better activity for both strains being more active for E. coli strain (256 µg/mL). Based on the results it was found that compounds which have attached electron deficient aromatic rings directly into an imine function as acridínico and grouping nitro in *ortho* or *para* position, can be further worked out by applying techniques of molecular modification to obtain a hit promising.

Keywords: Drugs Planning, Synthesis Hydrazones, Antimicrobial Activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esqueleto hidrazônico.....	16
Figura 2.	Planejamento estrutural usando homologação.....	24
Figura 3.	Energias que influenciam na conformação das moléculas.....	25
Figura 4.	Perfis de bioatividade de derivados <i>N</i> -acilidrazônicos.....	27
Figura 5.	Estrutura do núcleo acridínico.....	28
Figura 6.	Microplaca com 96 poços.....	35
Figura 7.	Reação de oxirredução da resazurina.....	37
Figura 8.	Placa de microdiluição após a adição do reagente resazurina com os compostos AMAC01 e ACSAZ frente à cepa de <i>S. aureus</i> após 3 horas de incubação.....	37
Figura 9.	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H do composto JR-09 (500 MHz).....	42
Figura 10.	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹³ C DEPT Q do composto JR-09.....	43
Figura 11.	Configurações <i>Z</i> e <i>E</i> assumida pelos derivados <i>N</i> -acilidrazônicos.....	44
Figura 12.	Prováveis isômeros conformacionais do composto JR-09.....	46
Figura 13.	Espectro de RMN de ¹ H do composto JR09 à temperatura de 26 °C (400 MHz).....	46
Figura 14.	Espectro de RMN ¹ H do composto JR-09 à temperatura de 60°C (400 MHz).....	47
Figura 15.	Espectro de RMN de ¹ H do LASSBio-1601 [61b] em diferentes temperaturas: 25°C, 60°C e 90°C [300 MHz, DMSO-d ₆ /TMS].....	48
Figura 16.	Estrutura molecular do JR09.....	49
Figura 17.	Diferenças estruturais entre (1) JR06 e (2) JR11.....	50
Figura 18.	Diferenças estruturais entre (6) JR15 e (7) JR20 quanto ao composto <i>N</i> livre e ciclizado.....	51

Figura 19.	Diferenças estruturais entre (3) JR05, (4) JR08 e (5) JR16 quanto à posição do grupo NO ₂	51
Figura 20.	Diferenças estruturais entre (8) JR18, (9) JR19 e (10) JR21 quanto à ausência e presença de anel benzênico fusionado a um anel aromático nitrogenado.....	53
Figura 21.	Diferenças estruturais entre (11) AMAC01 e (12) ACSAZ.....	53

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Reação geral da formação de uma hidrazona.....	16
Esquema 2.	Reação geral da formação de uma <i>N</i> -acilidrazona.....	16
Esquema 3.	Otimização de estrutura através da Árvore de Decisão de Topliss.....	21
Esquema 4.	Tipos de Hibridação Molecular.....	23
Esquema 5.	Equação de Westheimer.....	25
Esquema 6.	Reações de <i>N</i> -acilidrazonas com eletrófilos.....	26
Esquema 7.	Rota sintética da série JR.....	33
Esquema 8.	Mecanismo reacional para obtenção da série JR.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Compostos sintetizados referente a série JR e suas respectivas estruturas..	38
Tabela 2.	Compostos <i>N</i> -acilidrazônicos acridínicos.....	41
Tabela 3.	Características físico-químicas dos derivados <i>N</i> -acilidrazônicos.....	41
Tabela 4.	Energia mínima global estérica de cada composto na conformação <i>Z</i> e <i>E</i>	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Confôrmeros <i>anti</i> (A) e <i>syn-periplanar</i> (B), respectivamente, do composto JR09.....	45
Gráfico 2.	Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL de derivados <i>N</i> -acilidrazônicos frente às cepas <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e <i>Escherichia coli</i> ATC 25922.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CAAD	Computer-Assisted Drug Design
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMH	Caldo Mueller Hinton
DEPT-Q	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer with tention of Quaternaries
F.F.	Faixa de Fusão
HM	Hibridação Molecular
Log P	Coeficiente de Partição
NAH	Sub-unidade <i>N</i> -acilidrazônica
REA	Relação Estrutura-Atividade
Rend.	Rendimento
Rf	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SHV	Sulfhydryl Variable
TEM	β -lactamases de Serina Temoniera

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos.....	18
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1	Planejamento de Fármacos na Química Medicinal.....	19
3.1.1	Processos de Modificação Molecular de Fármacos.....	19
3.1.1.1	Simplificação Molecular.....	19
3.1.1.2	Bioisosterismo.....	22
3.1.1.3	Hibridação Molecular.....	22
3.1.1.4	Restrição Conformacional.....	23
3.1.1.5	Homologação.....	23
3.1.2	Modelagem Molecular.....	24
3.2	Derivados Acilidrazônicos.....	25
3.2.1	Derivados acilidrazônicos acridínicos como potenciais antibióticos.....	27
3.2.2	Atividade Biológica dos Acilidrazônicos.....	28
3.3	Resistência Bacteriana.....	29
3.3.1	Resistência Bacteriana a Gram-positivos.....	29
3.3.2	Resistência Bacteriana a Gram-negativos.....	29
3.4	Método de Diluição em Caldo.....	30
3.4.1	Microdiluição.....	30
4.	METODOLOGIA	32
4.1	Materiais.....	32
4.2	Reagentes e solventes.....	32
4.3	Obtenção da Série JR.....	32

4.4	Obtenção dos Compostos <i>N</i> -acilidrazônicos Acridínicos Substituído.....	34
4.5	Características Físico-químicas e Elucidação Estrutural.....	34
4.5.4.1	Modelagem Molecular.....	34
4.6	Atividade Antibacteriana.....	35
4.6.1	Microrganismos.....	35
4.6.2	Teste por Microdiluição.....	35
4.6.3	Padronização da Suspensão Bacteriana.....	35
4.6.4	Realização dos Testes.....	35
4.6.5	Leitura com revelador.....	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	Compostos Sintetizados e Caracterização Físico-Química.....	38
5.2	Possível mecanismos de reação para a série JR.....	40
5.3	Elucidação Estrutural e Análise Conformacional.....	42
5.3.1	Identificação Estrutural do JR-09.....	42
5.3.2	Energia Mínima Global Estérica.....	44
5.3.3	Análise Conformacional.....	45
5.4	Avaliação Biológica.....	48
5.4.1	Atividade Antibacteriana.....	48
6.	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXOS.....	61

1. INTRODUÇÃO

A Química Medicinal é a disciplina que trata dos aspectos relacionados ao planejamento, invenção, descoberta, identificação e obtenção de compostos de interesse terapêutico, *i.e.* fármacos, bem como as razões moleculares de seu modo de ação, incluindo a compreensão da relação entre a estrutura química e a atividade terapêutica, absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (WERMUTH et al., 2008).

No tocante à busca de novos candidatos a fármacos, as estratégias de modificação molecular de agentes antimicrobianos tem sido, há muitos anos, uma das principais técnicas abordadas, consistindo na realização de pequenas modificações químicas em um composto protótipo matriz, possuidor de estrutura química e atividades biológicas bem conhecidas (mantendo constante seu grupo farmacofórico) obtendo-se novos compostos análogos ou homólogos, sem perda das principais propriedades do composto matriz (MONTANARI, 1995). Além disso, como a resistência consiste no reconhecimento da estrutura do fármaco pelos microorganismos, realizar substituições em fármacos já existentes pode garantir um maior potencial, superando os mecanismos de resistência, como também, diminuindo seus efeitos tóxicos (MADIGAN et al., 2016).

Dentre esses compostos, destacam-se os heterocíclicos, os quais correspondem por cerca de 65% dos fármacos atualmente empregados na terapêutica, sendo que 95% desses apresentam-se nitrogenados e outros 25% apresentam átomos de enxofre em sua composição química (BARREIRO & FRAGA, 2008). Além disso, estes compostos são possuidores de ampla atividade biológica e possuem vantagem de não terem sido extensivamente estudados.

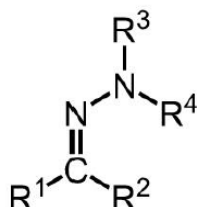
As subunidades estruturais hidrazona e acilidrazona estão presentes em diversas substâncias com atividades biológicas bem relatadas e que podem ser utilizadas como modelos para o planejamento de candidatos a novos fármacos. Já foram descritas, para os compostos desta natureza, diversas atividades farmacológicas como ação antiviral, antiparasitária, antimicrobiana, anticonvulsivante, analgésica e anti-inflamatória, e antiproliferativa de células tumorais.

Os compostos acridínicos possuem uma ampla variedade de efeitos biológicos, atuando como antibacteriano, antimalárico, antileishmanial, antitripanossomal e

anticancerígeno. A maioria desses efeitos pode ser explicada pela interação do cromóforo acridina com os pares de bases da dupla hélice do DNA. (SILVA, 2003)

A figura 1 mostra a estrutura da hidrazona, precursora de diversos compostos amplamente sintetizados e de grande interesse farmacêutico, devido às suas diversas atividades biológicas (SANTOS, 2012).

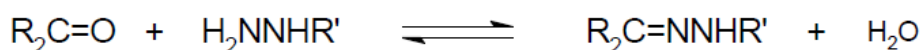
Figura 1. Esqueleto hidrazônico



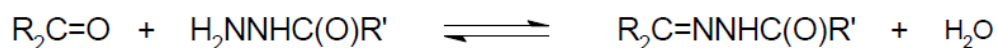
Fonte: (SANTOS, 2012)

A obtenção das hidrazonas ocorre a partir da condensação entre um aldeído ou cetona com uma hidrazina (Esquema 1). Quando essa hidrazina é uma *N*-acilidrazina (ou hidrazida), o produto é uma *N*-acilidrazona (Esquema 2), um composto azometino.

Esquema 1. Reação geral da formação de uma hidrazona



Esquema 2. Reação geral da formação de uma *N*-acilidrazona



Para a avaliação da atividade microbiológica dos compostos, existe uma série de testes que podem ser realizados *in vitro* ou *in vivo*. Para os testes *in vitro* destacam-se os de Concentração Inibitória Mínima (CIM), que permite investigar o crescimento microbiano em resposta à submissão dos microrganismos a determinadas drogas. De acordo com Alves *et. al.* (2008), métodos de diluição são comumente utilizados para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um microrganismo.

Dentre as inúmeras bactérias patogênicas, podemos ressaltar o *Staphylococcus aureus* considerado um patógeno humano oportunista que frequentemente está associado a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar, e a *Escherichia coli*, bactéria que habita o

intestino humano e de alguns animais podendo ser benéfica ou prejudicial à saúde dependendo da espécie e quantidade no organismo (ANVISA, 2016).

Apesar do grande arsenal terapêutico de fármacos com atividade antibacteriana, vem crescendo gradualmente a resistência microbiana a estes fármacos ocorrendo normalmente, através de mutações que proporcionam a síntese de enzimas capazes de conferir a inativação de tais substâncias. Diante desse quadro, foram realizadas etapas de síntese, purificação e elucidação estrutural de compostos acilidrazônicos substituídos, acompanhados por ensaios *in vitro* visando a avaliação de seus potenciais antibacterianos. Assim, visualiza-se a possibilidade de desenvolvimento de novas moléculas sintéticas, terapêuticamente úteis, que possam servir como novos agentes antibacterianos mais eficazes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Planejar e desenvolver novos derivados *N*-acilidrazônicos substituídos, através da síntese e elucidação estrutural, e avaliar suas atividades antibacterianas *in vitro* visando obter potenciais agentes terapêuticos mais eficazes, seguros e potentes.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e purificar novos derivados *N*-acilidrazônicos substituídos;
- Verificar as características físico-químicas dos novos compostos sintetizados;
- Caracterizar e elucidar a estrutura das moléculas a partir de diferentes técnicas espectroscópicas;
- Estudo da Conformação Molecular através de programa computacional;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos novos compostos através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente à cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Planejamento de Fármacos na Química Medicinal

O planejamento e desenvolvimento de novos fármacos é uma área da química farmacêutica medicinal, ciência que engloba inovação, descoberta, síntese ou modificação molecular, extração, isolamento, identificação de substâncias bioativas, bem como suas respectivas relações entre estrutura química e atividade biológica (REA) (PANCOTE, 2009).

Estratégias modernas de planejamento de fármacos se fundamentam no conhecimento da fisiopatologia das doenças, no estudo de vias bioquímicas e na seleção de alvos moleculares. O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, tendo suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas (GUIDO, 2008).

A fase da descoberta caracteriza-se pela eleição do alvo biológico, identificação de um protótipo, utilização de estratégias de modificação molecular tais como; bioisosterismo, hibridação molecular e homologação, e ainda determinação da atividade farmacológica (LIMA, 2007).

3.1.1 Processos de Modificação Molecular de Fármacos

3.1.1.1 Simplificação Molecular

Dentre os processos de modificação molecular destaca-se a simplificação molecular que consiste em estratégia de modificação ou otimização de fármacos e/ou protótipos, permitindo a obtenção de novos análogos ativos de estruturas mais simples em relação ao protótipo (KOROLKOVAS, 1988; BARREIRO E FRAGA, 2015; WERMUTH, 2008).

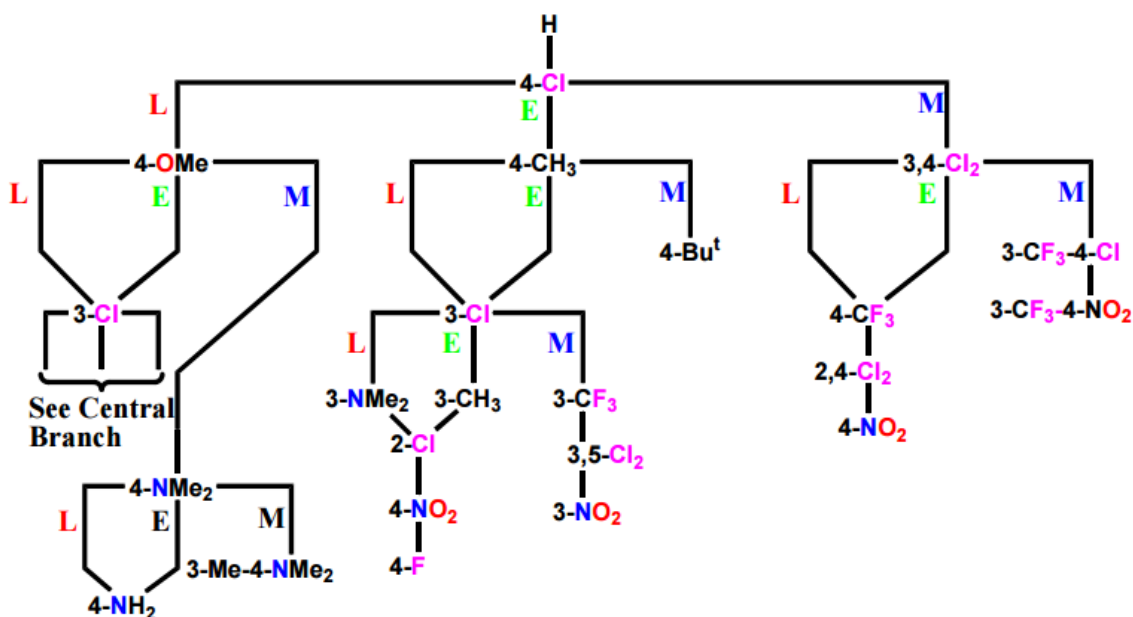
A etapa de otimização compreende o melhoramento da estrutura do protótipo, através de modificações planejadas com auxílio de técnicas definidas, que podem identificar os diferentes níveis de contribuição farmacofórica, fornecer informações sobre a conformação bioativa e antecipar o índice de reconhecimento molecular pelo alvo selecionado, visando o aumento da potência, seletividade, diminuição da toxicidade, adequação do perfil farmacocinético e estabelecimento da relação estrutura-atividade, a partir da síntese e avaliação farmacológica, *in vitro* e *in vivo*, de séries congêneres ao protótipo identificado originalmente (LIMA, 2007; BARREIRO & FRAGA 2015).

Quando moléculas ativas contêm sistemas cíclicos, eles podem ser abertos, expandidos, contraídos, retirados ou modificados de diversas maneiras. A disjunção de anéis tem como principal objetivo a simplificação progressiva em relação ao fármaco original. O objetivo é extrair informações sobre a estrutura mínima requerida para desenvolver atividade farmacológica (grupo farmacofórico) (WERMUTH, 2008).

Partindo desse contexto, uma das metodologias mais utilizadas para a otimização de um composto bioativo é através da aplicação do esquema de Topliss, conhecido por ser um esquema operacional para o planejamento de análogos (SANT'ANNA, 2002). A árvore de Topliss pode ser empregada como substituinte de um carbono aromático ou alifático usando grupos substituintes fixos.

Essa abordagem é subdividida em dois métodos para correlacionar quantitativamente à estrutura química com a atividade biológica: o primeiro chamado de Método da Árvore de Decisão (Esquema 3) consiste em um modelo realizado em etapas, em que mudanças nas propriedades físico-químicas interferem na atividade biológica; o segundo chamado de “Método Manual” que é um modelo não estatístico, permite predizer quais grupos substituintes podem aumentar significativamente sua atividade biológica (TOPLISS, 1977).

Esquema 3. Otimização de estrutura através da Árvore de Decisão de Topliss.



*L: Menor; E: Igual; M: Maior

O método manual de Topliss manifesta-se de forma contínua em que se avalia o efeito do composto original (líder) frente aos substituintes orientados pelo esquema. A eficácia da

ação de cada derivado pode ser classificada em: igual (E), maior (M) ou menor (L) ao substituinte antecessor (Esquema 3). Esta comparação possibilita ao químico medicinal melhor entendimento de forma simples dos efeitos eletrônicos e lipofílicos, maximizando as chances de obtenção de compostos mais ativos (JORGE et al., 2011) tornando essa metodologia bastante atraente para sua utilização.

A árvore de decisão de Topliss considera a mudança na atividade biológica por sugerir o próximo grupo substituinte a ser explorado. O planejamento de um fármaco, seguindo essa metodologia, inicia-se com a verificação da atividade de um composto não-substituído (-H). O próximo grupo a ser explorado é a introdução de um átomo de cloro (4-Cl). Caso o composto com 4-Cl apresente atividade superior ao não-substituído, deverá então ser sintetizado o análogo 3,4-Cl₂ dissustituído. Se o composto dissustituído apresenta a melhor atividade, em seguida, o diagrama sugere que o composto mais ativo seria o 3-CF₃ e o 4-NO₂ dissustituído, considerando um aumento nos efeitos eletrônicos ($+\sigma$) e hidrofóbicos ($+\pi$). Caso o contrário, se os valores de atividade são iguais a do composto monosustituído (4-Cl), o diagrama sugere seguir até o composto 4-NO₂, indicando que a atividade depende principalmente do efeito eletrônico (σ). Voltando ao derivado de 4-Cl, quando a introdução de um átomo de cloro levou a um análogo equipotente em comparação com o composto precursor (-H), esse pode ser interpretado como efeito $+\pi$ e $-\sigma$. Em seguida, o esquema de Topliss sugere a síntese de um análogo de 4-CH₃, que apresenta os valores de $+\pi$ e $-\sigma$. Começando no derivado 4-CH₃, novos rumos são sugeridos para encontrar os compostos mais ativos. Finalmente, quando o análogo 4-Cl é menos ativo do que o composto não-substituído, pode implicar em presença de impedimento estereoquímico, ou a atividade seria influenciada por efeitos $-\pi$ e $-\sigma$. Neste caso, um análogo 4-OCH₃ substituído deve ser explorado (TOPLISS, 1977).

Por fim a etapa de desenvolvimento, cuja finalidade é a continuação da melhoria das propriedades farmacocinéticas, consiste no ajuste das propriedades farmacêuticas de substâncias ativas para torná-los adequados para o uso clínico podendo ser realizada a preparação para melhor absorção dos compostos, liberação contínua do fármaco, formulações de derivados solúveis em água ou técnicas que permitam a aderência do paciente (irritação, injeção dolorosa, indesejáveis propriedades organolépticas) (WERMUTH, 2008).

3.1.1.2 Bioisosterismo

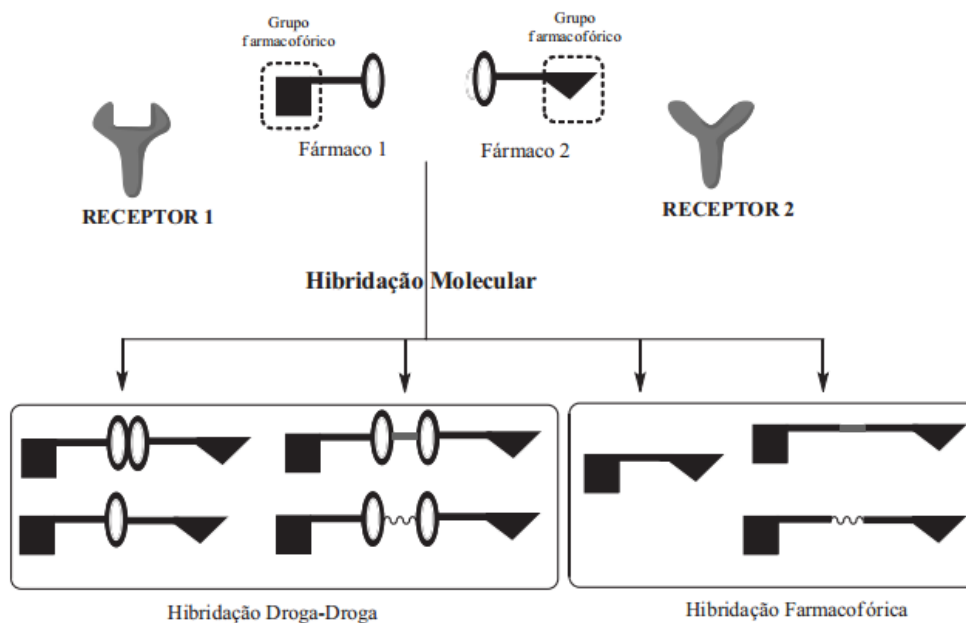
Outro processo de modificação molecular de fármacos é o bioisosterismo cujo conceito refere-se a compostos ou subunidades estruturais de compostos bioativos que apresentam volume molecular, formas, distribuição eletrônica e propriedades físico-químicas semelhantes, assim como suas características biológicas (BARREIRO e FRAGA, 2015).

Ainda de acordo com os autores, o bioisosterismo pode ser subdividido em bioisósteros clássicos e não-clássicos. Os bioisósteros clássicos se utilizam de grupos ou átomo monovalentes, divalentes e trivalentes; valência dos átomos; grupamentos, radicais e equivalência dos anéis aromáticos. As demais possibilidades e estruturas equivalentes tais como estruturas cíclicas, não cíclicas e grupos funcionais se encaixam na não clássica (LIMA e BARREIRO, 2005), sendo esta a mais utilizada em estratégias de bioisosterismo.

3.1.1.3 Hibridação Molecular

A hibridação molecular (HM) é uma estratégia clássica de conjugação de estruturas de compostos bioativos distintos em uma única molécula, sendo uma alternativa eficaz de arquitetar racionalmente estruturas moleculares de novos compostos protótipos (BARREIRO & FRAGA, 2015). Segundo Nepali e colaboradores (2014), a HM pode estar baseada na junção de fármacos distintos (HM do tipo droga-droga) ou de grupos farmacofóricos de fármacos distintos (HM do tipo farmacofórica). Em ambos os casos, a nova molécula produzida por HM passa a se chamar de híbrido, o qual frequentemente apresenta maior afinidade e eficácia que os compostos que lhe deram origem (NEPALI et al., 2014). O esquema 4 resume os tipos de HM.

Esquema 4. Tipos de Hibridação Molecular



3.1.1.4 Restrição Conformacional

Dentre as estratégias de modificação molecular de um composto-protótipo visando a sua otimização, a restrição conformacional tem sido empregada com sucesso no aumento da afinidade e seletividade de um ligante pelo biorreceptor alvo, sendo, por esta razão, muito explorada na busca de ligantes antagonistas/agonistas de um determinado subtipo de receptor ou isoforma enzimática. Em alguns casos o protótipo com alto grau de flexibilidade conformacional possui como conformação bioativa uma conformação de elevada energia. A restrição conformacional possibilita planejar compostos que apresentem esta conformação desejada, porém com menor energia, favorecendo a interação ligante-receptor (MAIA, 2008).

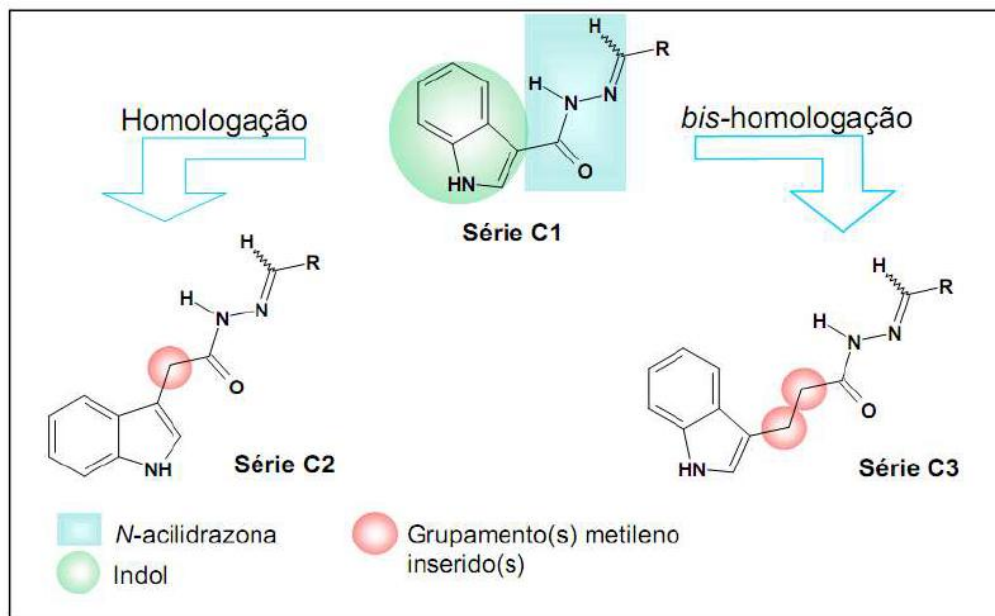
3.1.1.5 Homologação

O processo de homologação molecular consiste em uma importante estratégia de modificação estrutural resultante da inserção de determinados grupos funcionais, como: um benzeno, uma ligação vinílica ou grupo(s) metileno(s) (WERMUTH, 2008).

As variações em séries homólogas podem resultar em compostos com elementos de simetria, com melhor lipofilicidade. No caso de homólogos polimetilênicos ou polivinílicos, o aumento de uma cadeia lateral pode favorecer interações como resíduos de aminoácidos de receptores ou enzimas que antes não eram acessíveis ao composto não-homólogo, resultando

em eventual aumento da potência relativa (WERMUTH, 2008). Pode-se observar na Figura 2 um exemplo da utilização da homologação molecular como estratégia de modificação estrutural.

Figura 2. Planejamento estrutural usando homologação



Fonte: (SANTOS, 2011).

3.1.2 Modelagem Molecular

Modelagem molecular, segundo a IUPAC, é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (SANT’T ANNA, 2002). Desta forma, o planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD – “Computer-Assisted Drug Design”) é descrito em diversos estudos auxiliando na investigação das interações químicas de um ligante com seu receptor e exploração dos fatores estruturais relacionados ao efeito biológico (CARVALHO et al., 2003).

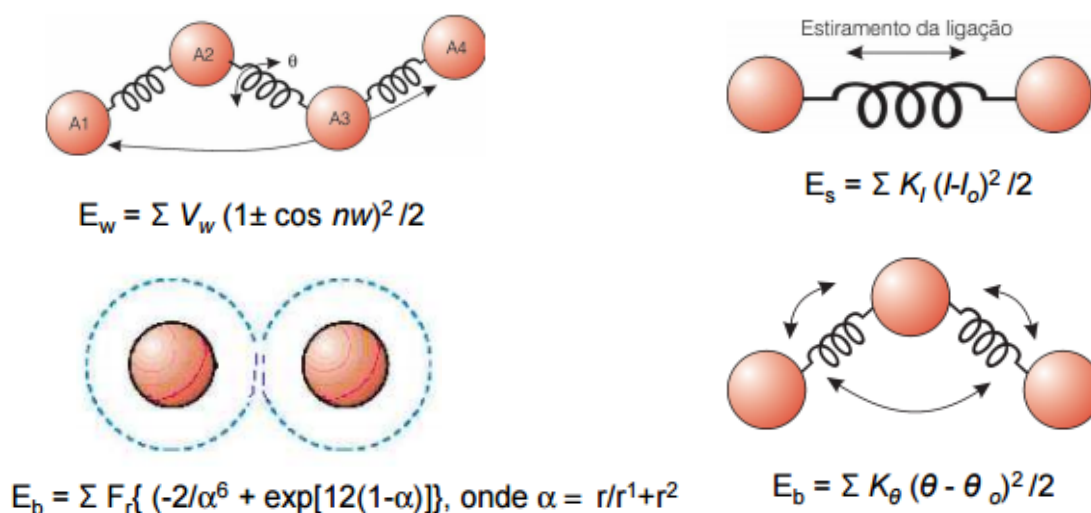
Um método de se investigar a conformação mais estável de uma molécula é através dos cálculos da mecânica molecular. Para esse estudo alguns parâmetros são calculados através da Equação de Westheimer (Esquema 5), o qual avalia as propriedades específicas da

molécula, tais como: Energia de estiramento (ou compressão) (E_s), Energia de deformação angular (E_b), Energia de torção em torno de ligações (E_w) e Energia de interação não-ligante (E_{nb}), como descrito na Figura 3 (OLIVEIRA, 2010)

Esquema 5. Equação de Westheimer

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_s + \mathbf{E}_b + \mathbf{E}_w + \mathbf{E}_{nb}$$

Figura 3. Energias que influenciam na conformação das moléculas.



Energia de estiramento (ou compressão) (E_s), Energia de deformação angular (E_b), Energia de torção em torno de ligações (E_w) e Energia de interação não-ligante (E_{nb})

Fonte: (OLIVEIRA, 2010)

3.2 Derivados Acilidrazônicos

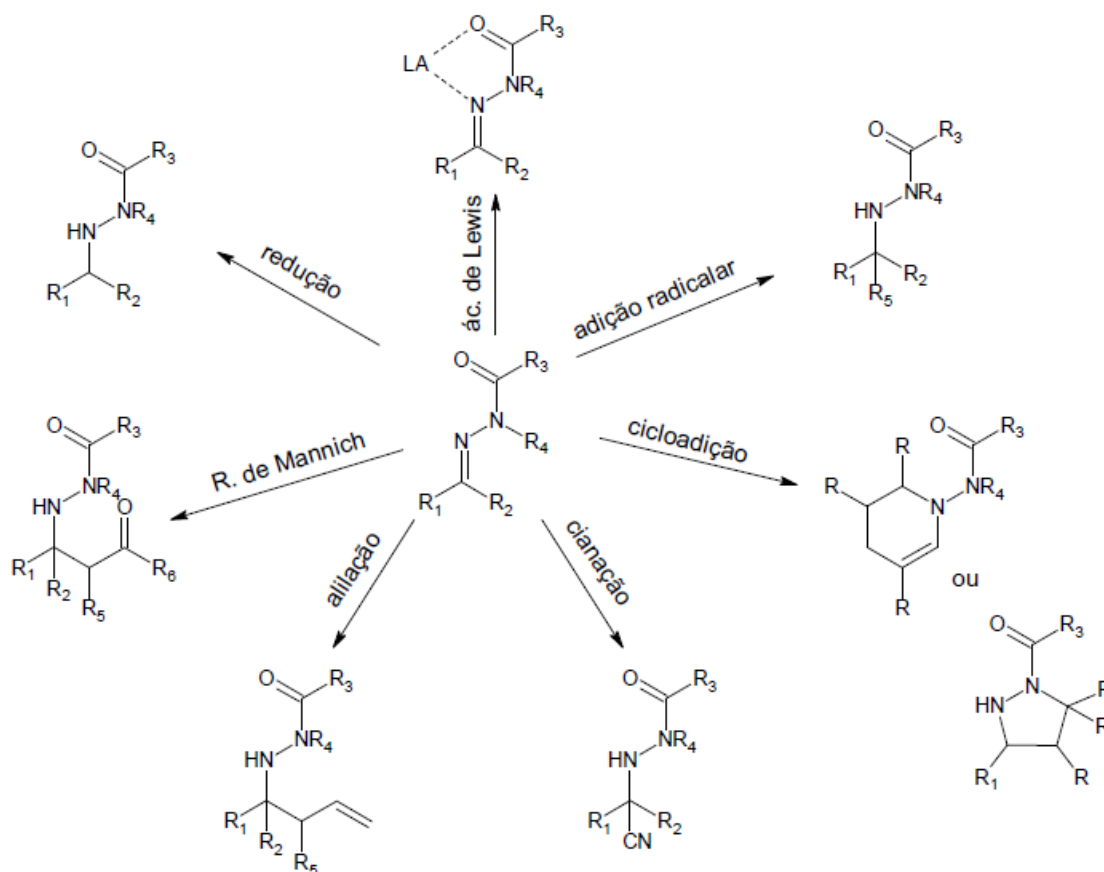
As finalidades na utilização das hidrazonas são bastante diversificadas, sendo empregadas desde a agricultura, passando pelo ramo industrial e, principalmente, no setor farmacêutico. Segundo Zampirolli (2009), compostos hidrazônicos têm se destacado nas últimas décadas por apresentarem ação contra diferentes tipos de patologias, chamando atenção, passando a serem sintetizados em larga escala.

De acordo com Caixeiro (2007), as hidrazonas foram descobertas por Emil Fischer em 1883, quando o mesmo estava sintetizando um derivado indólico a partir da reação fenil hidrazina com propanona.

As hidrazonas são versáteis em síntese orgânica. O par de elétrons não-ligantes do nitrogênio do tipo amídico é conjugado à ligação dupla em C-N, deixando esse carbono com caráter mais positivo e, conseqüentemente, menos suscetível a ataques nucleofílicos em comparação com as iminas, conferindo, portanto, maior estabilidade que estas, portanto. Ambos os nitrogênios podem reagir com eletrófilos, assim como o próprio carbono. (RAITZ, 2012)

Entretanto, as *N*-acilidrazonas, que possuem ainda um grupo carbonila ligado ao nitrogênio do tipo amídico, têm o carbono imínico mais eletrofílico na presença de ácidos de Lewis. Estes compostos participam principalmente de reações de adição radicalar, cicloadição, cianação, alilação, reação de Mannich e redução (Esquema 6) (RAITZ, 2012).

Esquema 6. Reações de *N*-acilidrazonas com eletrófilos.

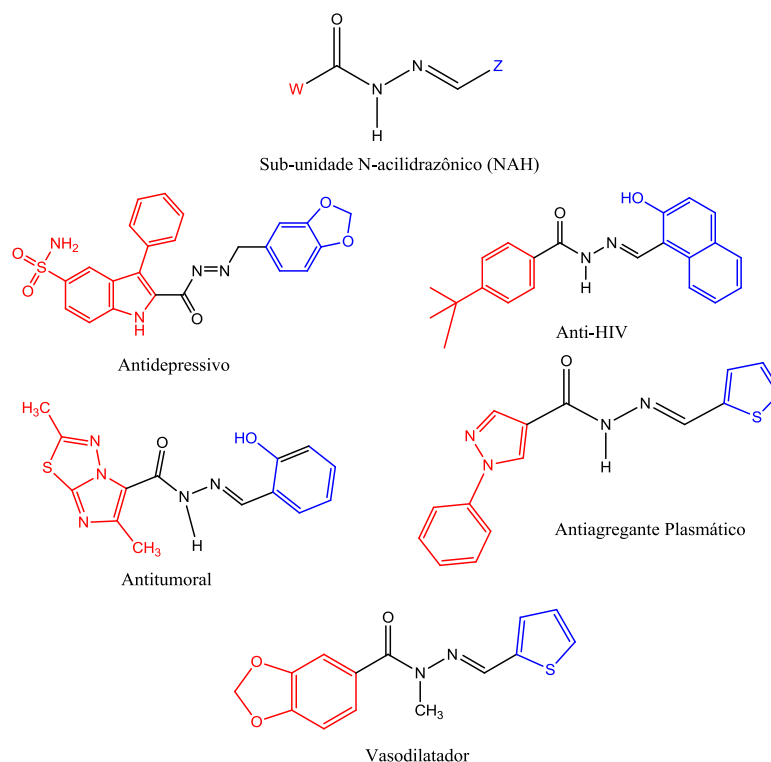


A sub-unidade *N*-acilidrazona (NAH) caracteriza-se por possuir diferentes pontos de possível diversidade estrutural, importantes na construção de distintas famílias de compostos-protótipos, candidatos a fármacos (DUARTE, 2006). Neste contexto o padrão NAH consiste em uma vertente promissora como ponto de partida para o planejamento racional de fármacos (MORPHY et al, 2004).

3.2.1 Atividade Biológica dos Acilidrazônicos

Vários padrões de atividade farmacológica podem ser observados para os derivados *N*-acilidrazônicos, tais como antimicrobiana, anticonvulsivante, analgésica, antiagregante plaquetária, anti-inflamatória, antidepressiva, vasodilatadora, dentre outras. Esses padrões são devidos à variação racional das subunidades estruturais da região amídica (W) e imínica (Z) destes compostos, como pode-se observar na Figura 4 (BARREIRO & FRAGA, 2015; ROLLAS & KÜÇÜKGÜZEL, 2007) utilizando-se de estratégias da Química Medicinal de modificação molecular, como: a hibridação molecular, o bioisosterismo, a simplificação molecular, a homologação e a restrição conformacional, já descritos anteriormente (WERMUTH, 2008; LIMA & BARREIRO, 2005; RODRIGUES, 2008).

Figura 4. Perfis de bioatividade de derivados *N*-acilidrazônicos



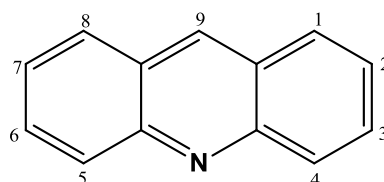
Fonte: (BARREIRO & FRAGA, 2015)

3.2.2 Derivados acilidrazônicos acridínicos como potenciais antibióticos

Utilizado desde a Primeira Guerra Mundial como bactericida, o núcleo acridínico vêm atraindo as atenções de diversas áreas como a química medicinal. Contido em várias fontes naturais, tais como plantas da família *Rutaceae*, e vários organismos marinhos (CAO et al., 2013; CHOLEWIŃSKIET et al., 2011).

Esse cromóforo (figura 5) caracterizado por possuir um sistema policíclico planar com dois anéis aromáticos ligados a um anel piridínico central e um ou dois grupos substituintes flexíveis, possui como ponto mais nucleofílico o nitrogênio do seu átomo central. Essa peculiaridade pode ser o responsável pela alta reatividade e capacidade de ionização desse composto (SANCHEZ et al., 2006).

Figura 5. Estrutura do núcleo acridínico



Fonte: (SANCHEZ et al., 2006)

Os núcleos acridínicos são conhecidos por apresentarem um amplo espectro de atividades biológicas, como atividades antimicrobianas, antimalárica, antitripanossômica (BONSE et al., 1999), leishmanicida (GIRAULT et al., 2000) e, sobretudo, por suas propriedades antineoplásica. Alguns compostos acridínicos já estão em uso clínico e outros estão em intenso desenvolvimento por grupos de pesquisas no mundo inteiro (BRANÃ et al., 2002).

Os compostos acridínicos são agentes terapêuticos bem conhecidos cujas propriedades mutagênicas dependem de sua habilidade para interagir com os ácidos nucléicos. Além disso, a atividade farmacológica dessas drogas intercalantes é devida ao seu poder de inibir a síntese de ácidos nucléicos pelo bloqueio da ação das enzimas que metabolizam o DNA (SOURDON et al., 2001).

3.3 Resistência Bacteriana

A resistência bacteriana aos antibióticos é atualmente um dos problemas de saúde pública mais relevantes, uma vez que muitas bactérias anteriormente suscetíveis aos antibióticos usualmente utilizados deixaram de responder a esses mesmos agentes. O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno natural resultante da pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos, mas que tem sofrido uma expansão muito acelerada devido à utilização inadequada destes fármacos, existindo uma correlação muito clara entre um maior consumo de antibióticos e níveis mais elevados de resistência microbiana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

3.3.1 Resistência Bacteriana a Gram-positivos

Considerando a evolução da resistência aos antibióticos nas bactérias Gram-positivas, verifica-se que a espécie *Staphylococcus aureus* (HAWKEY, 2008; HAWKEY e JONES, 2009) e o gênero *Enterococcus spp.* são as bactérias Gram-positivas que apresentam maiores problemas de resistência aos antibióticos (HAWKEY, 2008).

Relativamente à espécie *S. aureus*, é de salientar que as primeiras cepas produtoras de penicilinas e que, também eram resistentes aos outros antibióticos, usualmente disponíveis causaram problemas clínicos consideráveis na década de 50, o que levou à introdução da meticilina e de outras penicilinas semissintéticas, resultando numa redução acentuada dessas cepas (HAWKEY, 2008). No entanto, pouco tempo depois da introdução da meticilina em 1960, foram isoladas amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) no Reino Unido, marcando o aparecimento das cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina, que posteriormente se disseminaram a nível mundial (HAWKEY, 2008; HAWKEY e JONES, 2009; GRUNDMANN et. al., 2006; GOULD, 2008).

3.3.2 Resistência Bacteriana a Gram-negativos

Considerando a evolução da resistência aos antibióticos nas bactérias Gram-negativas, verifica-se que o mais importante mecanismo de resistência aos antibióticos nestas bactérias é a produção de enzimas β -lactamases. Relativamente à família das enterobacteriáceas, é de referir que, após a introdução da ampicilina na década de 1960, a resistência aos agentes β -lactâmicos tornou-se um importante problema clínico, devido à transferência, por plasmídeos,

de genes de resistência codificando β -lactamases de Serina Temoniera (TEM) e Sulfidrilas Variáveis (SHV) (HAWKEY, 2008).

Nos anos 80, após a introdução das cefalosporinas de terceira geração, foram reportados genes TEM e SHV mutados, que se disseminaram ,principalmente, entre o gênero *Klebsiellas pp* e a espécie *Escherichia coli* (*E. coli*), o que marcou a emergência das cepas produtoras de β -lactamases de largo espectro (ESBL – extended spectrum β -lactamases), que se definem por serem capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração e monobactamos (HAWKEY, 2008; HAWKEY e JONES, 2009).

3.4 Método de Diluição em Caldo

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (Pinto et al., 2003).

O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. Sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos. Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada do microrganismo em teste, e como controle negativo o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana (SAHM & WASHINGTON II, 1991).

3.4.1. Microdiluição

Nos Estados Unidos, o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), conhecido antigamente por National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), é o comitê responsável pela padronização de todos os métodos utilizados em laboratórios clínicos, principalmente na área de microbiologia.

Há diversos métodos laboratoriais que podem ser usados para medir a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos. Em 2015, o CLSI aprovou a norma M7-A10 que descreve técnicas padrão de diluição em caldo (macrodiluição e microdiluição) e diluição em ágar, além de incluir uma série de procedimentos para padronizar a execução dos testes.

Além disso, descreve o desempenho, as aplicações e as limitações dos métodos atualmente recomendados pelo CLSI. (CLSI, 2015)

Dentre os métodos descritos no documento M7-A10 destaca-se um método em que, por ser realizado em uma escala micro, vem sendo amplamente utilizado como teste de *screening* para novos candidatos a drogas com atividade antimicrobiana. Além disso, essa metodologia é simples, rápida e barata, principalmente pela utilização reduzida de solventes e materiais (CLSI, 2015)

Este método é denominado “microdiluição” porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de plástico estéreis, próprias para microdiluição, que possuem 96 poços de fundo redondo ou cônico (CLSI, 2015).

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

- Placa Agitadora (IKA RH basic 1)
- Balança analítica (BEL Engineering Mark M214A)
- Fusiômetro (Quimis 340)
- Espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear (Varian 400 vnmrs 400 MHz (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) e Bruker Avance Spectrometer (AC-400 ou AC-500))
- Condensador
- Becker de 100 mL
- Balão de fundo redondo de 150 mL
- Placa de Kline
- Placa de CCDA
- Pipeta graduada de 2, 5 e 10 mL
- Funil de vidro
- Vidro de relógio
- Papel de filtro
- Espátula

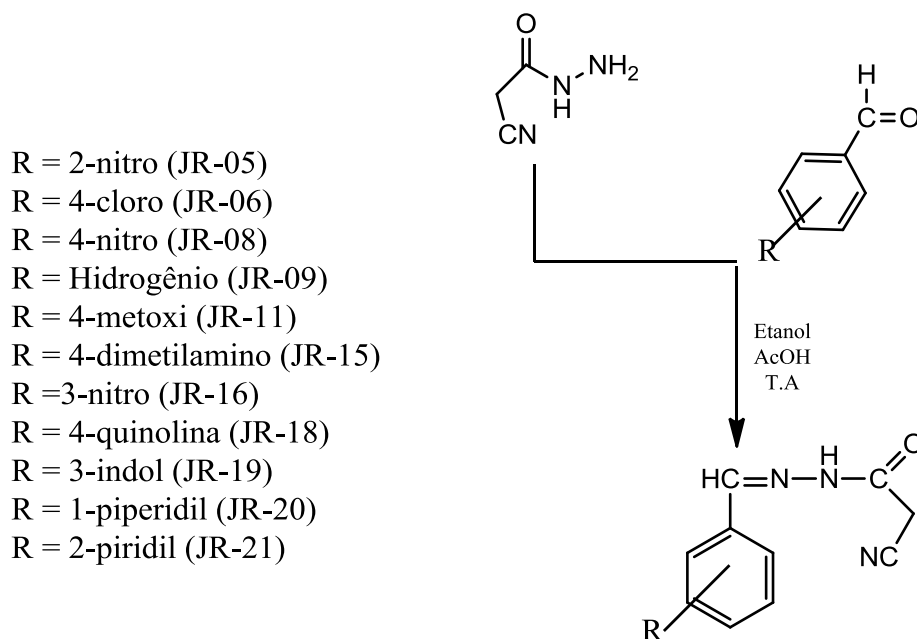
4.2 Reagentes e Solventes

- Álcool Etilico (Vetec)
- Álcool Metanólico (Vetec)
- Ácido Acético (Vetec)
- Acetato de Etila (Vetec)
- Clorofórmio (Vetec)
- Diclorometano (Vetec)
- Hexano (Vetec)

4.3 Obtenção da Série JR

Os compostos referentes à série *N*-benzilideno-2-cianoacetohidrazida (JR) foram obtidos a partir da reação de condensação de 2-cianoacetohidrazida com diferentes aldeídos aromáticos substituídos, em equivalência molar de 1:1. O solvente utilizado na reação foi o etanol. Além disso, utilizou-se para catálise da reação o ácido acético (Esquema 7). As reações foram submetidas à agitação sendo acompanhadas por CCDA. A precipitação do produto ocorria em meio reacional e as reações duravam poucas horas. Depois de finalizadas as reações, observou-se a formação de um produto único e os produtos de partida eram completamente consumidos.

Esquema 7. Rota sintética da série JR



A separação do produto final e da solução mãe foi realizada pelo processo de filtração através de papel filtro. Por seguinte, os produtos eram mantidos na capela de exaustão à temperatura ambiente para secagem e quando totalmente secos eram pesados em balança de precisão (BEL Engineering Mark M214A) para que fossem calculados os rendimentos.

4.4 Obtenção dos Compostos *N*-acilidrazônicos Acrídnicos Substituídos

Os compostos *N*-acilidrazônicos acridínicos foram cedidos pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) ligado a UEPB campus V. As metodologias referentes à obtenção dos compostos AMAC01 e ACSAZ encontram-se descritos nos Trabalhos de Conclusão de Curso de SERAFIM (2014) e PEREIRA (2016), respectivamente.

4.5 Características Físico-químicas e Elucidação Estrutural

Após a síntese dos compostos foi realizado a caracterização físico-química dos mesmos sendo avaliado: solubilidade (por meio de solventes como clorofórmio e acetato de etila destilado), aparência, cálculo de fator de retenção (R_f) - por meio de cromatografia de camada delgada analítica (CCDA)-, faixa de fusão (F.F)- através do aparelho Quimis Modelo Q-340M-, rendimento (%), peso molecular (P.M), fórmula molecular e coeficiente de partição

teórico (log P) através do programa ChemDraw Ultra 12.0. E por último, alguns dos compostos tiveram suas estruturas elucidadas através de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C DEPT-Q) Varian 400 vnmrs 400 MHz (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) e Bruker Avance Spectrometer (AC-400 ou AC-500).

4.5.1 Modelagem Molecular

Os cálculos de energia potencial total, configuração *Z* e *E* e conformação *syn* e *anti-periplanar* foram obtidos através do programa ChemdrawUltra-Chem3D versão 12.0, onde foram utilizados os seguintes parâmetros para o cálculo: estiramento de uma ligação, energia de deformação angular, energia de torção em torno das ligações, energia de interação não-ligante e ligação dipolo-dipolo.

4.6 Atividade Antibacteriana

4.6.1 Microrganismos

Foram utilizados as seguintes cepas padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

4.6.2 Teste por Microdiluição

Os testes referentes à atividade antibacteriana dos compostos sintetizados foram realizados através da técnica de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M7-A10 pelo CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI, 2015), para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das bactérias aeróbicas por microdiluição em caldo, microdiluição em caldo e diluição em ágar.

4.6.3 Padronização da Suspensão Bacteriana

A suspensão bacteriana foi padronizada a partir de uma cultura de 24 horas em solução salina à 0,9% estéril até atingir turvação igual a suspensão do tubo de McFarland. Em seguida, foi verificada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm, que resulta em uma concentração de 1 a 2×10^8 UFC/mL (corresponde a 0,5 na escala de

McFarland). Em seguida, o inóculo foi diluído em Caldo Mueller Hinton (CMH) até uma concentração final de 10^4 UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

4.6.4 Realização dos Testes

As concentrações finais dos derivados acilidrazônicos variaram entre 1024 a $1\mu\text{g/mL}$. Os testes foram realizados em triplicatas. O meio de cultura utilizado nos testes foi o Caldo MH. A droga controle utilizada foi a gentamicina e alguns poços foram reservados para os testes de esterilidade do meio e controle do crescimento bacteriano.

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com $100\ \mu\text{L}$ de CMH, com exceção dos poços referentes a coluna 1 da microplaca. Em seguida, foi adicionado na coluna 1 e coluna 2 $100\ \mu\text{L}$ da solução teste dos compostos e a partir da coluna 2 foi realizada a diluição seriada até a coluna 11, como mostra a figura 6.

Figura 6. Microplaca com 96 poços



Fonte: <http://www.splabor.com.br/acessorio/microplacas-96-poos-para-diversas-aplicacoes/microplaca-microtitulacao-em-poliestireno-fundo-quotcha.html>

Em seguida, foram distribuídos $10\ \mu\text{L}$ das suspensões dos microrganismos em cada orifício das microplacas, exceto a coluna 12, pois apresenta somente meio de cultura para verificação da esterilidade do mesmo. A linha G foi destinada para a droga controle e a linha H para o controle de crescimento bacteriano. Também foi realizado o controle negativo referente aos solventes.

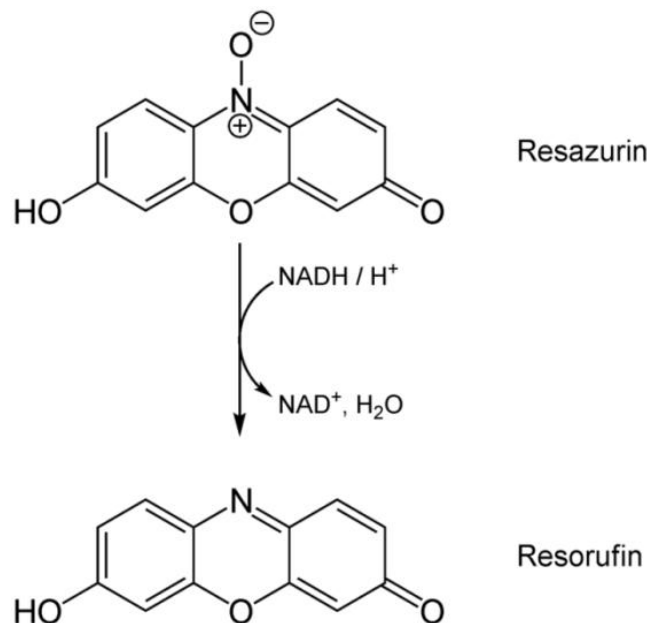
Após a realização do experimento as microplacas foram incubadas por 24 horas em estufa à 36°C. Passado as 24 horas, foi adicionado o corante resazurina à 0,025% e incubado as placas por mais 4 horas.

4.6.5 Leitura com revelador

As leituras foram realizadas com o revelador resazurina a 0,025% do qual foi adicionado em cada orifício 20 µL e incubados por 4 horas. Após decorrido esse tempo, verificou-se a presença de cor azul ou rosa, no qual a cor azul representa ausência de crescimento e a cor rosa indica o crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

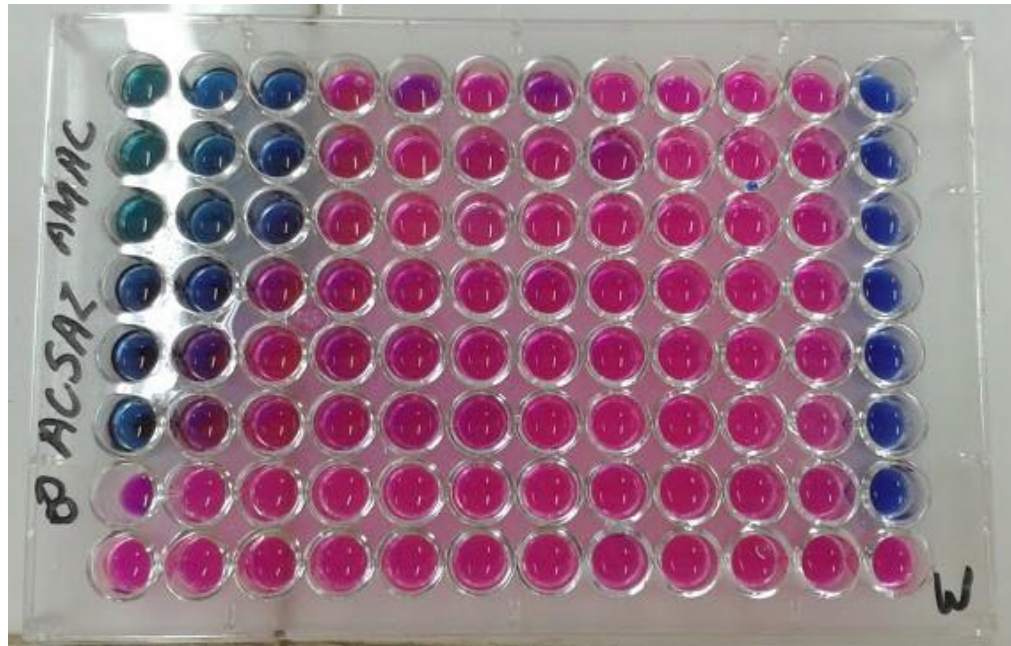
A resazurina (7-hidroxi-3*H*-fenoazin-3-ona-10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resorufina (cor rósea), mostrado na Figura 7. A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000).

Figura 7. Reação de oxirredução da resazurina



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Resazurina>

Figura 8. Placa de microdiluição após a adição do reagente resazurina com os compostos AMAC01 e ACSAZ frente à cepa de *S. aureus* após 3 horas de incubação

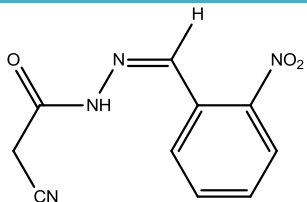
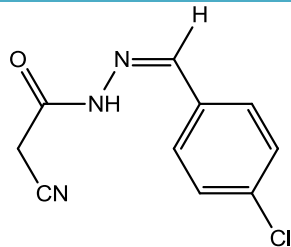
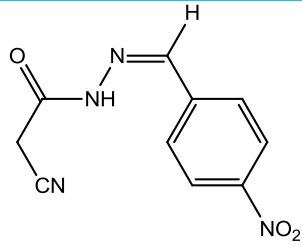
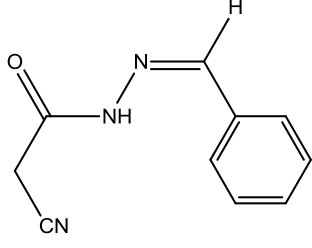
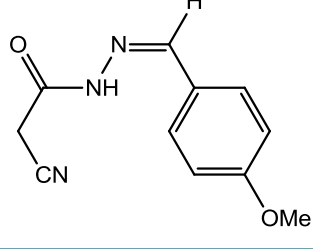


5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Compostos Sintetizados e Caracterização Físico-Química

Foram sintetizados 11 novos compostos codificados por JR os quais se encontram descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Compostos sintetizados referente a série JR e suas respectivas estruturas

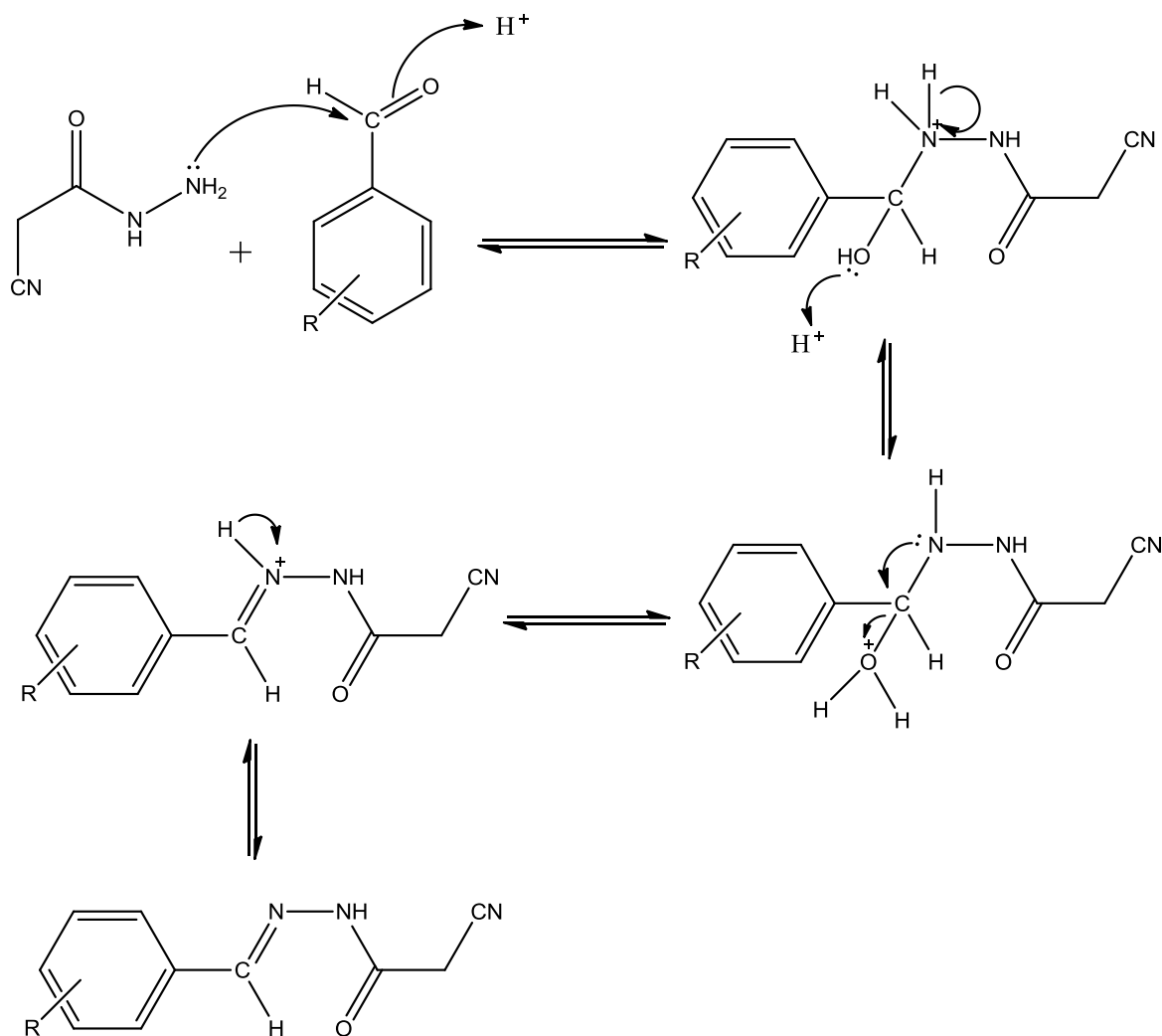
Composto	Nomenclatura	Estrutura Molecular
JR05	2-ciano- <i>N'</i> -(2-nitrobenzilideno)-aceto-hidrazida	
JR06	2-ciano- <i>N'</i> -(4-clorobenzilideno)-aceto-hidrazida	
JR08	2-ciano- <i>N'</i> -(4-nitrobenzilideno)-aceto-hidrazida	
JR09	<i>N</i> -benzilideno-2-ciano-aceto-hidrazida	
JR11	2-ciano- <i>N'</i> -(4-metoxibenzilideno)-aceto-hidrazida	

JR15	2-ciano- <i>N'</i> -(4-(dimetilamino)-benzilideno)-aceto-hidrazida	
JR16	2-ciano- <i>N'</i> -(3-nitrobenzilideno)-aceto-hidrazida	
JR18	2-ciano- <i>N'</i> -(4-(quinolina-4-il)benzilideno)aceto-hidrazida	
JR19	<i>N'</i> -(3-(1 <i>H</i> -indol-3-il)benzilideno)-2-cianoacetohidrazida	
JR20	2-ciano- <i>N'</i> -(4-(piperidina-1-il)benzilideno)aceto-hidrazida	
JR21	2-ciano- <i>N'</i> -(4-(piridina-2-il)benzilideno)aceto-hidrazida	

5.2 Possível mecanismos de reação para a série JR

A obtenção dos derivados *N*-acilidrazônico se procedeu a partir de uma reação de condensação do 2-cianoacetohidrazida com diferentes aldeídos aromáticos seguida de uma desidratação, como proposto no mecanismo reacional descrito no esquema 8.

Esquema 8. Mecanismo reacional para obtenção da série JR



Os compostos *N*-acilidrazônicos acridínicos foram cedidos pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) ligados a UEPB campus V. O composto AMAC01 foi sintetizado e descrito por SERAFIM (2014). O composto ACSAZ foi sintetizado e descrito por PEREIRA (2016). Ambos apresentam suas nomenclaturas e estruturas moleculares descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Compostos *N*-acilidrazônicos acridínicos

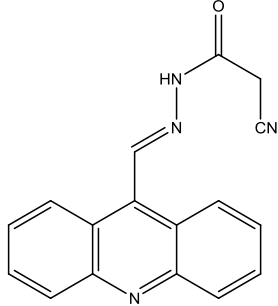
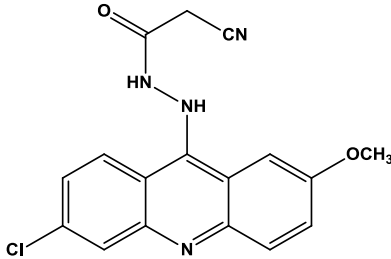
Composto	Nomenclatura	Estrutura Molecular
AMAC01	<i>N'</i> -(acridin-9-ilmetileno)-2-cianoaceto-hidrazida	
ACSAZ	<i>N'</i> -(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazida	

Tabela 3 – Características físico-químicas dos derivados *N*-acilidrazônicos

Composto	Rend (%)	Rf	Faixa de Fusão (°C)	Massa Molecular (g/mol)	Fórmula Molecular	Log P
AMAC01	79,8	0,44 ^a	217-222	376,1	C ₂₄ H ₁₆ N ₄ O	3,17
ACSAZ	75,3	0,9 ^b	259	340,7	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄ O ₂	2,65
JR05	53	0,6 ^a	201-204	232,06	C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₃	0,5
JR06	72,5	0,53 ^d	213-217	221,64	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O	2,22
JR08	68	0,41 ^d	184-186	232,06	C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₃	0,5
JR09	54,05	0,5 ^d	180-182	187,2	C ₁₀ H ₉ N ₃ O	1,67
JR11	94	0,38 ^d	212	233,1	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂	1,54
JR15	74	0,47 ^a	217-220	230,12	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O	1,95
JR16	57	0,61 ^d	248-250	232,06	C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₃	0,5
JR18	54	0,48 ^d	242-244	238,09	C ₁₃ H ₁₀ N ₄ O	1,75
JR19	89	0,66 ^c	233-236	226,09	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O	1,21
JR20	79	0,54 ^a	240-245	270,15	C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O	2,68
JR21	77	0,57 ^d	249-250	264,10	C ₁₅ H ₁₂ N ₄ O	2,43

Rend (%): Rendimento; Rf: Fator de Retenção; Log P: Coeficiente de Partição; ^aHexano/Acetato de Etila (1:1); ^bClorofórmio/Metanol (9:1); ^cAcetato de Etila, ^dHexano/Acetato de Etila(6:4)

De acordo com a tabela 3, todas as moléculas apresentaram rendimentos acima de 50% comprovando a boa exequibilidade da rota sintética adotada e fácil metodologia de purificação. Em relação à faixa de fusão a variação de temperatura para a maioria dos compostos foi de até 3°C, tendo apenas os compostos AMAC01 JR06 e JR20, os quais apresentam intervalos de faixa de fusão acima de 3°C.

Quanto ao Log P os compostos que apresentaram menor lipofilia foram os JR05, JR08 e JR16 sendo os que obtiveram maior solubilidade. Já o composto mais lipofílico foi o composto AMAC01 apresentando menor solubilidade dentre todos os compostos sintetizados, o que está diretamente relacionado ao núcleo acridínico do mesmo. Contudo, todos os compostos apresentaram LogP <5, estando de acordo com a regra de Lipinsk o qual esses valores podem indicar um bom perfil de biodisponibilidade (BARREIRO, 2009), resultando em um aumento de sua ação farmacológica.

5.3 Elucidação Estrutural e Análise Conformacional

5.3.1 Identificação Estrutural do JR-09

Em seguida, podemos visualizar os espectros de RMN ¹H (figura 9) e RMN ¹³C DEPT-Q (figura 10) do composto JR09, onde nessa técnica são separados os carbonos secundários e quaternários dos primários e terciários.

Figura 9. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H do composto JR09 (500 MHz)

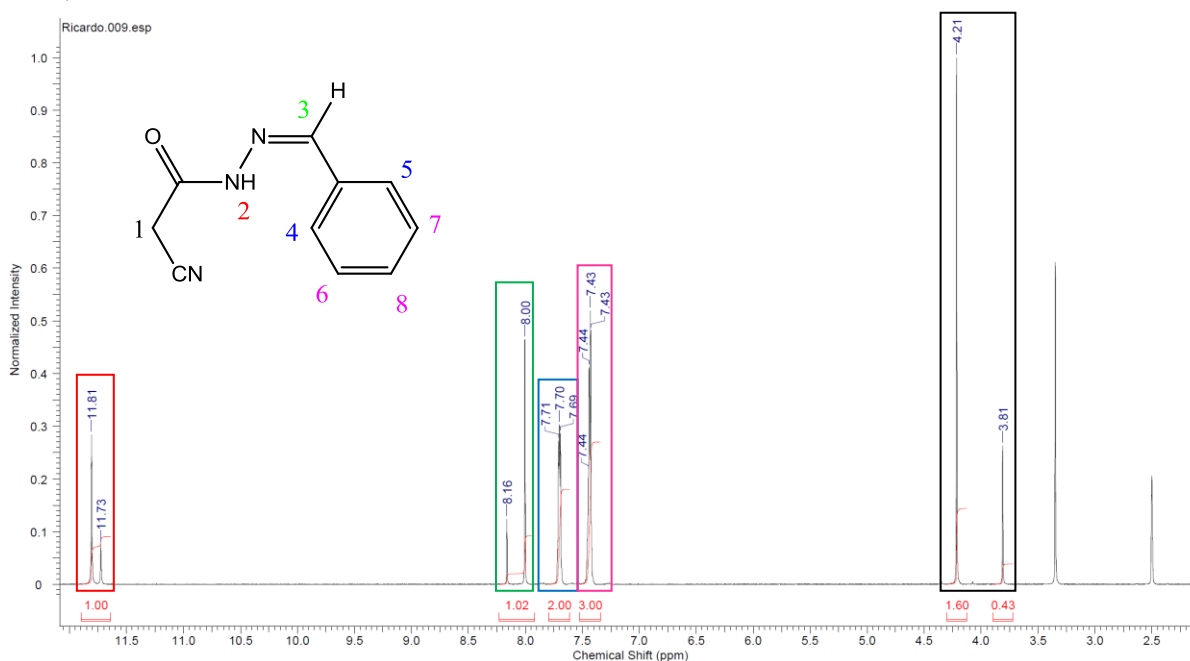
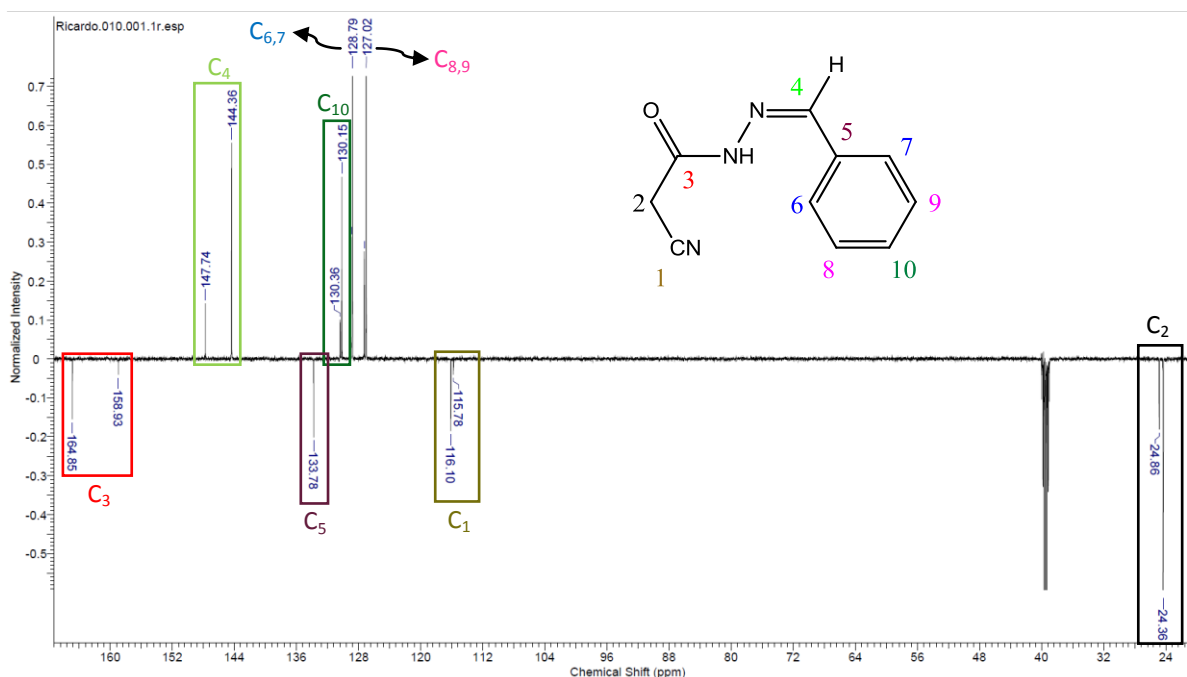


Figura 10. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)¹³C DEPT Q do composto JR09



Em seguida está descrito os resultados dos espectros de RMN ¹H e ¹³C DEPT Q dos compostos JR09 e JR11.

N'-benzilideno-2-cianoacetohidrazida (JR-09): RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): δ 11.81, 11.73 (2s, 1H, NH-CO); 8.16, 8.00 (2s, 1H, NH=C); 7.71-7.69 (m, 2H, H_{4,5}); 7.44-7.43 (m, 3H, H_{6,7,8}); 4.21, 3.81 (2s, 1H, H₁); RMN de ¹³C DEPT-Q (125 MHz, DMSO-d₆): δ 24.36, 24.68 (C₂); 115.78, 116.10 (C₁); 127.02 (C_{8,9}); 128.79 (C_{6,7}); 130.15, 130.36 (C₁₀); 133.78 (C₅); 144.36, 147.74 (C₄); 158.93, 164.85 (C₃).

2-ciano-*N*'-(4-metoxibenzilideno)acetohidrazida (JR-11): RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆): δ 11.67, 11.59 (2s, 1H, NH-CO); 8.09, 7.94 (2s, 1H, N=CH); 7.66-7.63 (m, 2H, H_{4,5}); 7.01-6.98 (m, 2H, H_{6,7}); 4.18, 3.80 (2s, 2H, metilênico); 3.79 (s, 3H, OCH₃); RMN ¹³C DEPT-Q (125 MHz, DMSO-d₆): δ 24.31, 24.80 (C₂); 55.33 (OCH₃); 114.29, 114.35 (C_{8,9}); 115.86, 116.17 (C₁); 126.38 (C₅); 128.65, 128.91 (C_{6,7}); 144.26, 147.64 (C₄); 160.87, 161.05 (C₁₀); 164.56, 158.62 (C₃).

Foi observado nos resultados de RMN duplicidade da maioria dos picos. De acordo com a literatura, derivados *N*-acilidrazônicos podem apresentar configuração *Z* e *E*, devido a

sua função imina (N=CH), ou conformação *syn e anti-periplanar*, devido a função amida (CO-NH), o que justificaria a duplicidade dos sinais (LOPES, 2013).

Para dar suporte a presença de confôrmeros foram realizadas as análises do cálculo de energia mínima global estérica e análise conformacional, além da obtenção de novos espectros de RMN de ^1H com gradiente de temperatura.

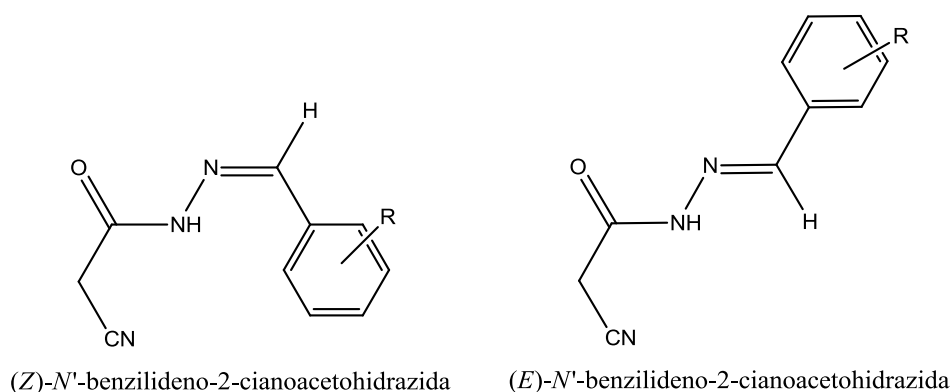
5.3.2 Energia Mínima Global Estérica

As moléculas sintetizadas podem apresentar uma configuração molecular específica *Z* ou *E* (Figura 11), sendo a configuração mais estável a de menor energia potencial total ou energia estérica (E) como podemos observar na Tabela 4.

Tabela 4. Energia mínima global estérica de cada composto na conformação *Z* e *E*.

Composto	Conformação <i>Z</i>	Conformação <i>E</i>
AMAC01	20.3796 kcal/mol	13.4469 kcal/mol
JR05	2,9751 kcal/mol	19,0615 kcal/mol
JR06	3.6417 kcal/mol	1.5165 kcal/mol
JR08	2,9641 kcal/mol	3.4234 kcal/mol
JR09	2,9009 kcal/mol	1,0050 kcal/mol
JR11	8,8770 kcal/mol	6,9665 kcal/mol
JR15	13.0224 kcal/mol	11.3153 kcal/mol
JR16	-0.0477 kcal/mol	4.7439 kcal/mol
JR18	18.8236 kcal/mol	11.8261 kcal/mol
JR19	12.6101 kcal/mol	8.5630 kcal/mol
JR20	22.3261 kcal/mol	20.6688 kcal/mol
JR21	14.1279 kcal/mol	12.4445 kcal/mol

Figura 11. Configurações *Z* e *E* assumida pelos derivados *N*-acilidrazônicos



Fonte: ChemDraw 12.0

Analisando a tabela 2, observamos que apenas os compostos JR05, JR08 e JR16, que apresentam grupamento NO₂ no anel benzilideno nas posições *orto*, *meta* e *para*, apresentaram energia global total favorecendo a uma configuração preferencial em *Z*. Os demais compostos apresentaram energia global total na configuração *E*.

5.3.3 Análise Conformacional

Com o intuito de avaliar se a duplicidade dos picos está de fato relacionada a configuração ou a conformação *syn* e *anti-periplanar*, foram realizados estudos de análise conformacional visando avaliar a maior e menor energia de conformação entre os compostos e uma análise de RMN de ¹H do composto JR09 em duas temperaturas diferentes (26°C e 60°C, respectivamente) (Figura 13 e 14).

Com o auxílio do programa ChemDraw 3D versão 12.0, foi realizado uma análise de energia conformacional do composto JR09 onde observa-se uma variação de energia entre as conformações *syn* e *anti-periplanar* com $\Delta E = 5,16$ Kcal/mol que equivale a $\Delta E = 21,58$ KJ/mol, sugerindo assim, a possibilidade de confôrmeros, de acordo com os dados obtidos por Lacerda et al. (2014) (Gráfico 1) (Figura 12).

Gráfico 1. Confôrmeros *anti* (A) e *syn-periplanar* (B), respectivamente, do composto JR09

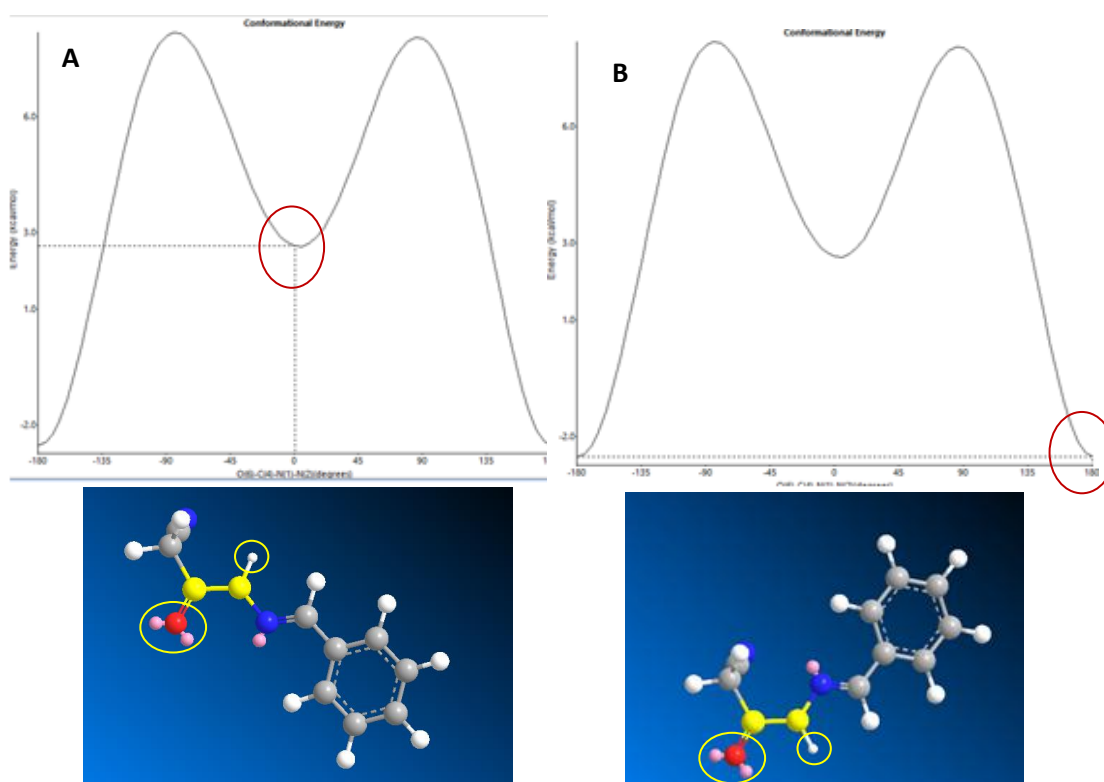
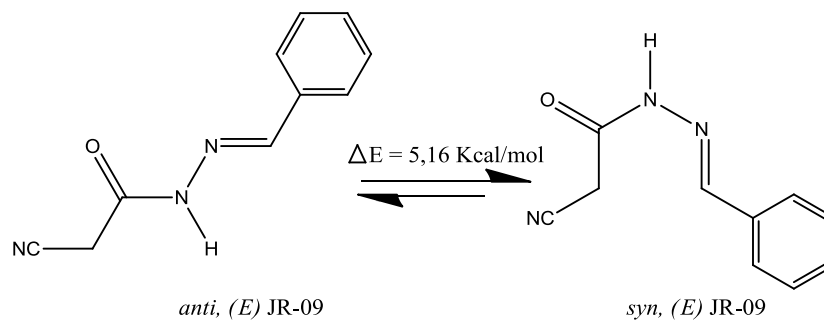


Figura 12. Prováveis isômeros conformacionais do composto JR09



Fonte: ChemDraw 12.0

Como já mencionado, foram realizados espectros de RMN ^1H com variação de temperatura de 26 °C (figura 13) e 60 °C (figura 14) a 400 MHz em DMSO.

Figura 13. Espectro de RMN de ^1H do composto JR09 à temperatura de 26 °C (400 MHz).

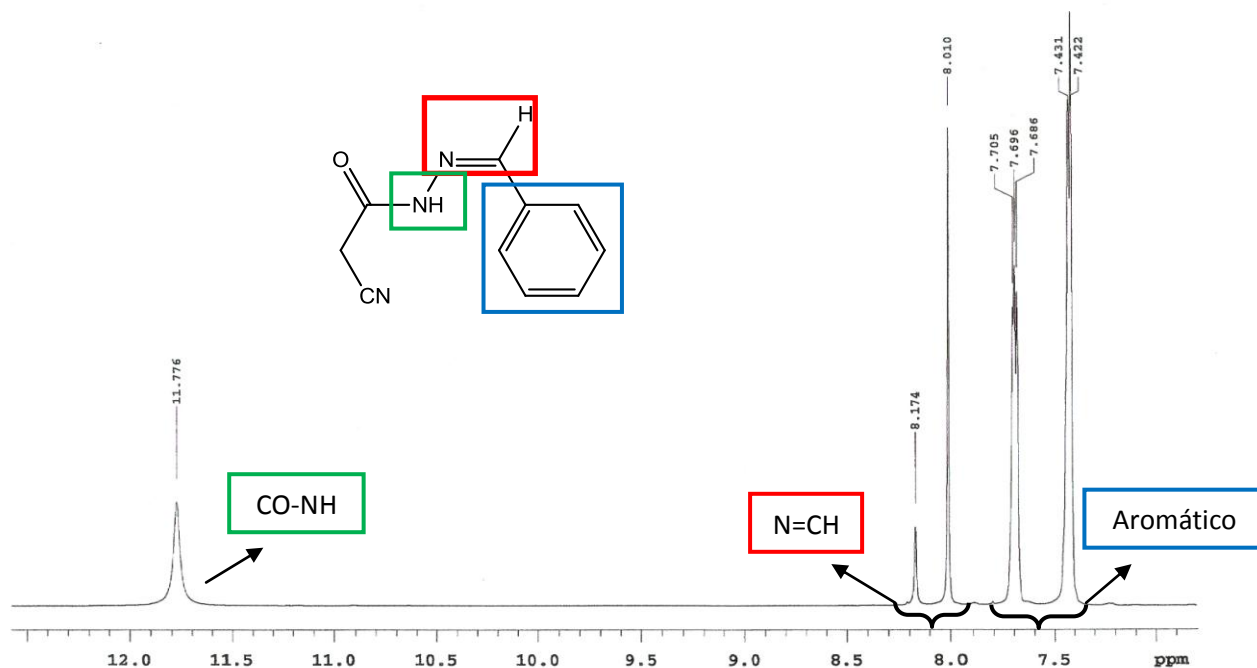
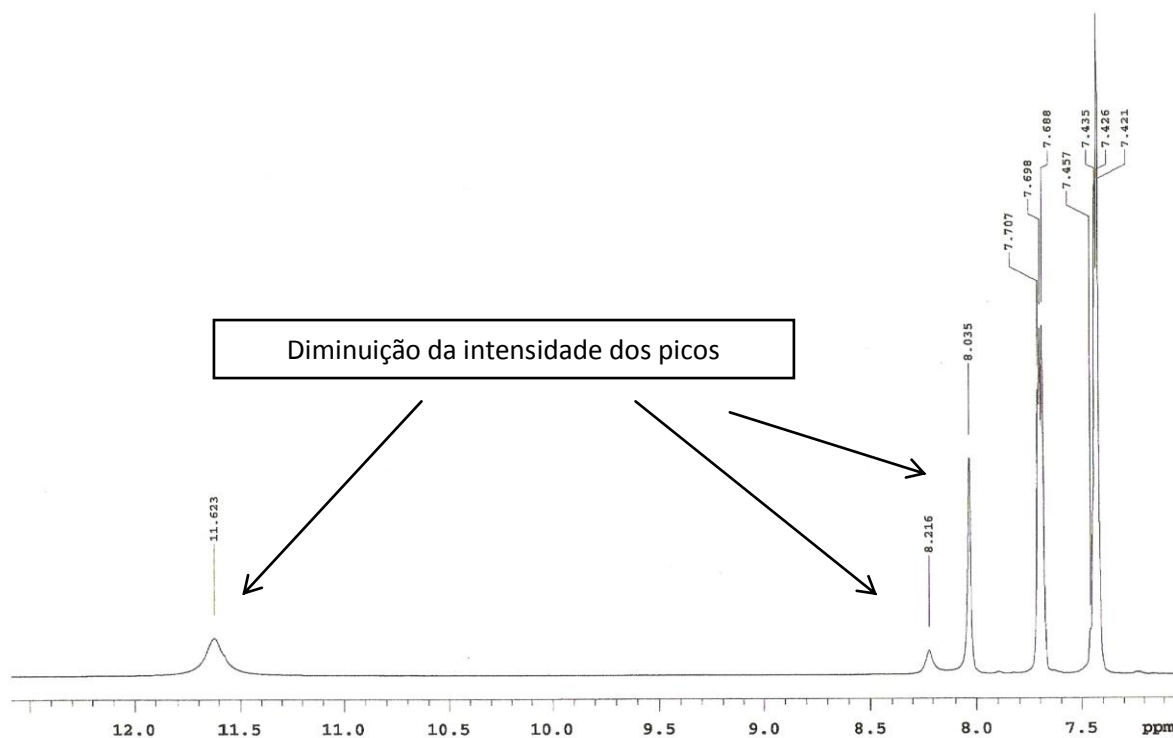


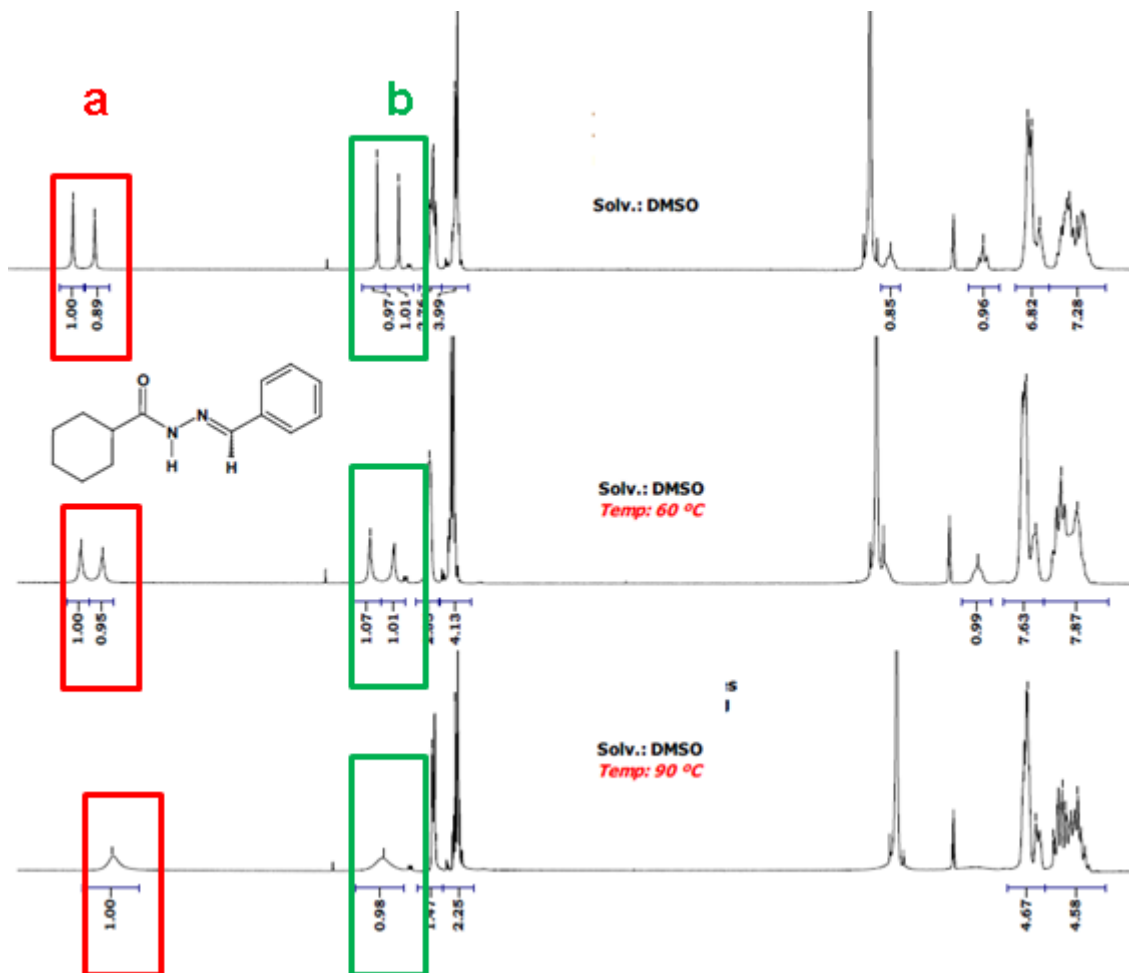
Figura 14. Espectro de RMN ^1H do composto JR-09 à temperatura de 60°C (400 MHz).



Analisando os espectros de RMN de ^1H do composto JR09 com variação de temperatura, observa-se no espectro com temperatura à 60 °C (figura 14) uma diminuição na intensidade dos picos, sugerindo possíveis confôrmeros.

De acordo com Silva (2012) o qual seguindo abordagens de Wyrzykiewicz e colaboradores (1998), verificou uma diminuição da intensidade dos picos de hidrogênio em RMN de ^1H à temperatura de 60 °C, bem como uma possível coalescência dos mesmos em RMN de ^1H à temperatura de 90 °C, indicativos para presença de confôrmeros. Neste caso, o aumento da temperatura forneceria energia suficiente para interconversão conformacional, implicando na coalescência de sinais dos hidrogênios anteriormente duplicados. Como resultado, observaram a coalescência dos sinais dos hidrogênios amídicos (a) e imínicos (b) em 90°C (Figura 15), resultados também encontrados para os demais homólogos (SILVA, 2012).

Figura 15. Espectro de RMN de ^1H do LASSBio-1601 em diferentes temperaturas: 25°C, 60°C e 90°C [300 MHz, DMSO-d₆/TMS]



Fonte: (SILVA, 2012).

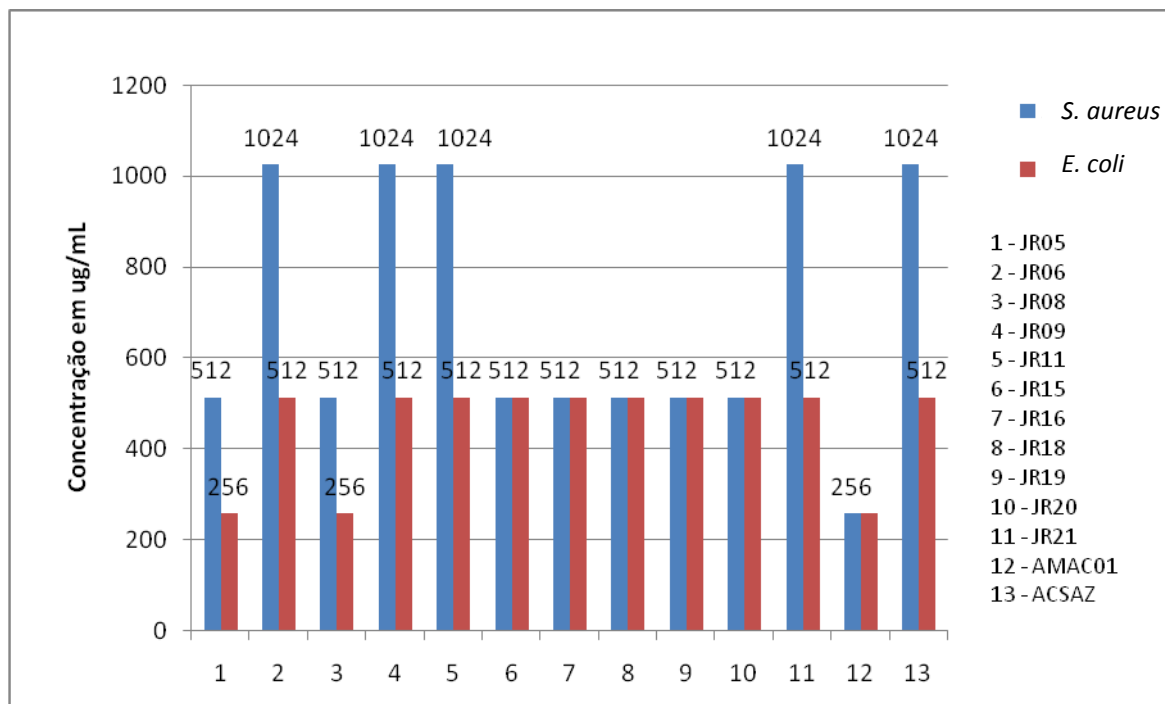
Entretanto para maiores confirmações serão necessários técnicas bidimensionais como COSY, NOESY, HMBC e HMQC, bem como realizar RMN de ^1H em temperatura de 90 °C para a verificação da coalescência entre os picos de hidrogênio amídico e imínico.

5.4 Avaliação Biológica

5.4.1 Atividade Antibacteriana

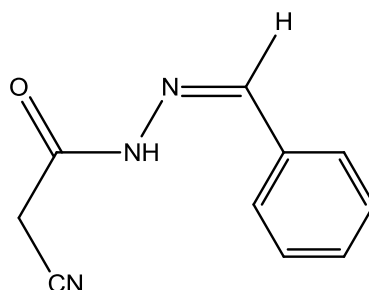
Os compostos foram testados, *in vitro*, frente à cepa Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922), partindo da concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$ até 1 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados dos testes de CIM encontram-se dispostos no gráfico 2.

Gráfico 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ de derivados *N*-acilidrazônicos frente às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922



Para a série JR, o composto JR09 (Figura 16), por não apresentar substituinte ao anel aromático, foi utilizado com referência na análise de atividade para os demais compostos da série testados. Observou-se que o mesmo apresentou um CIM de 1024 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa de *S. aureus* e de 512 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa de *E. coli*, o que indica uma atividade 2x melhor para a cepa Gram-negativa.

Figura 16. Estrutura molecular do JR09

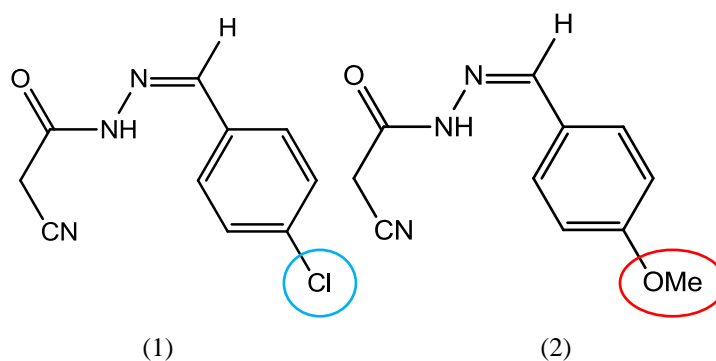


Fonte: ChemDraw 12.0

Cachiba et al. (2012) não encontraram resultados significativos para testes com bactérias. No trabalho desenvolvido, eles avaliaram a eficácia de derivados acilidrazônicos frente a três espécies de bactérias: *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, sendo uma cepa de cada espécie.

Os compostos JR06 e JR11 apresentaram atividade semelhante ao composto JR09, contudo, estes apresentam grupos substituintes na posição 4 (*para*) (Figura 17) do anel benzênico, o qual a presença de grupos retiradores e doadores de elétrons na posição *para* do aromático não influencia na atividade dos mesmos, quando comparado ao composto JR09 sem substituinte.

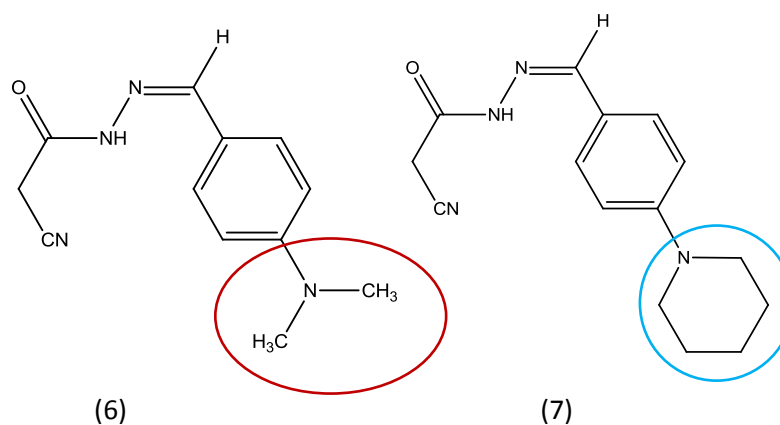
Figura 17. Diferenças estruturais entre (1) JR06 e (2) JR11



Fonte: ChemDraw 12.0

Diante dos resultados obtidos com os compostos descritos acima, pensou-se em testar derivados acilidrazônicos com aldeídos substituídos por grupamentos nitrogenados (N-R) (Figura 18) com efeito doador por indução e mesomeria positiva. De acordo com o gráfico 2 os compostos apresentaram uma atividade semelhante para a cepa Gram-negativa porém uma melhor atividade para a cepa Gram-positiva em relação aos compostos JR06, JR09 e JR11.

Figura 18. Diferenças estruturais entre (6) JR15 e (7) JR20 quanto ao grupo *N* livre e ciclizado.



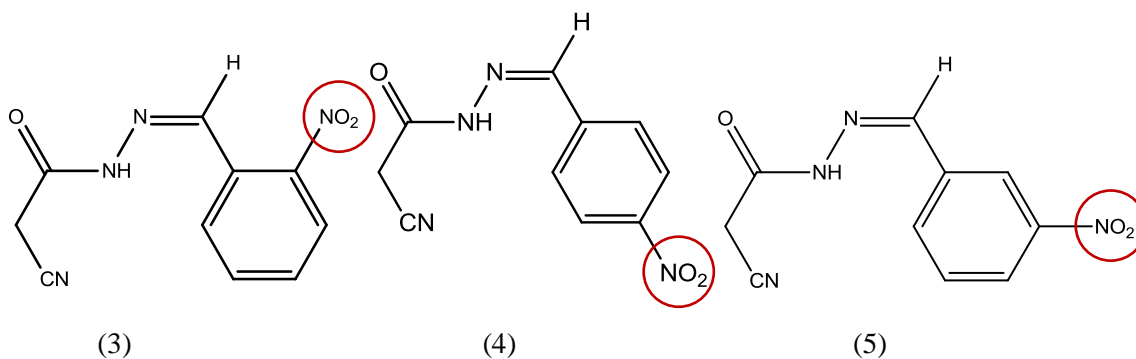
Fonte: ChemDraw 12.0

Os dois compostos com grupamentos nitrogenados (figura 18) apresentaram CIM de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para as duas cepas testadas, o qual indica que a ciclização do nitrogênio e o aumento do tamanho da molécula, não interfere na atividade biológica, mas comprovam a importância da inserção de nitrogênio na molécula é favorável para atividade.

Apesar dos compostos contendo nitrogênio na sua estrutura apresentarem uma melhora na atividade para as cepas Gram-positivas, esse aumento não foi considerado tão expressivo. Dessa forma, foram avaliados grupos fortemente retiradores, como o grupamento nitro (NO_2) (Figura 19).

Analisando os compostos JR05, JR08 e JR16, todos apresentam a mesma fórmula molecular, Log P e Peso molecular, variando somente na posição do grupamento NO_2 em que está ligado ao anel aromático.

Figura 19. Diferenças estruturais entre (3) JR05, (4) JR08 e (5) JR16 quanto à posição do grupo NO_2 .



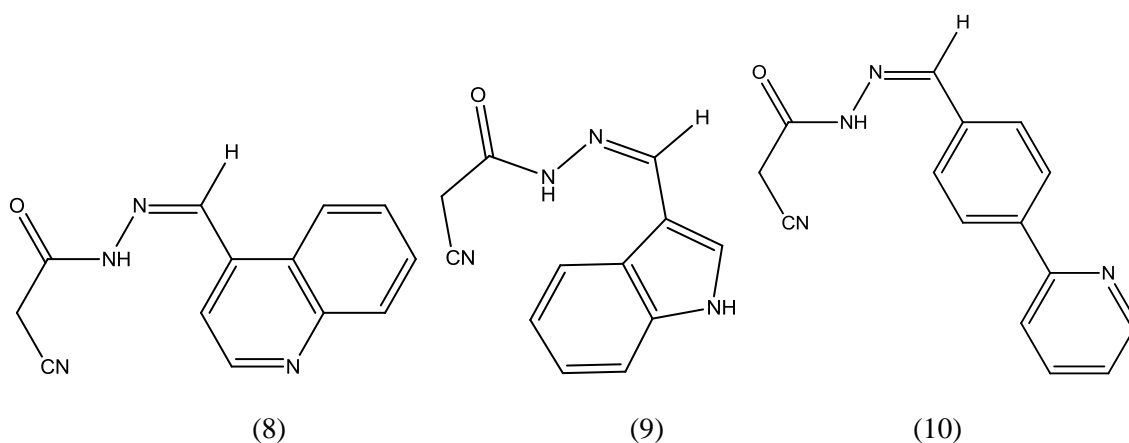
Fonte: ChemDraw 12.0

Baseado nas suas estruturas, os compostos JR05 e JR08 apresentaram atividades semelhantes para as duas cepas testadas (512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. aureus* e 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *E. coli*), sendo mais ativos para a cepa Gram-negativa. Já o composto JR08 apresentou atividade de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ambas as cepas, obtendo uma atividade inferior em relação à cepa Gram-negativa, quando comparado aos compostos anteriormente citados.

Essa diferença na atividade pode está relacionada à posição dos grupos substituintes, pois se constatou que, para o grupamento NO_2 , a posição *orto-para* é mais favorecida para a atividade antibacteriana em cepa Gram-negativa.

Partindo desse pressuposto, se pensou em testar compostos heteroaromáticos nitrogenados (Figura 20) a fim de verificar a influencia da planaridade e aromaticidade na atividade bacteriana.

Figura 20. Diferenças estruturais entre (8) JR18, (9) JR19 e (10) JR21 quanto à ausência e presença de anel benzênico fusionado a um anel aromático nitrogenado.



Fonte: ChemDraw 12.0

Ao analisar as estruturas e correlaciona-las com o resultado microbiológico descrito no gráfico 2, verificou-se que os compostos heteroaromáticos nitrogenados fusionados a um anel benzênico (JR-18 e JR-19) apresentaram a mesma atividade para as duas bactérias testadas (CIM de 512 $\mu\text{g/mL}$), mesmo um tendo anel de 6 e outro de 5 membros; contudo, o composto JR-21 apresentou atividade diminuída para a cepa Gram-positiva (CIM de 1024 $\mu\text{g/mL}$).

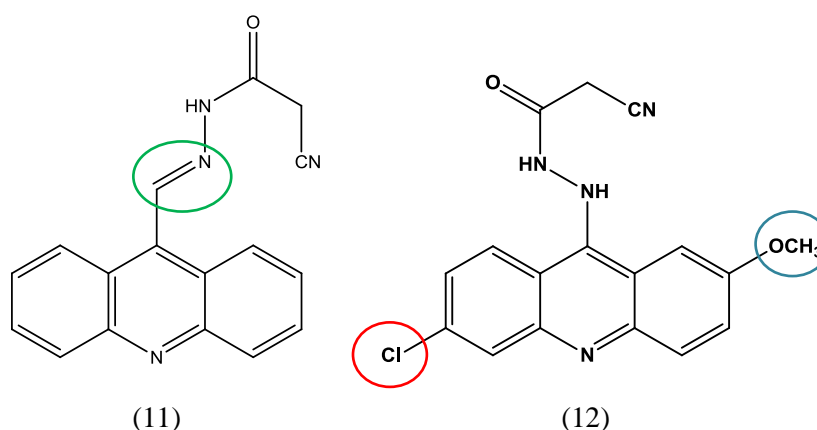
De fato, os anéis heteroaromáticos nitrogenados fusionados ao anel benzênico contribuem, consideravelmente, para um aumento da atividade antibacteriana desses compostos, confirmando a estratégia de que a planaridade e aromaticidade são promissoras para atividade proposta.

Desta forma, pensou-se em verificar a influencia de mais um anel benzênico fusionado ao composto JR-18, o que nos levou a verificar a atividade antibacteriana do composto AMAC01, que apresenta um núcleo acridínico.

Baseado em estudos da literatura envolvendo o núcleo acridínico, verificou-se que o mesmo apresenta considerável atividade antibacteriana (ALBERT, 1966; CACHIBA et al, 2012). Sendo assim dois derivados *N*-acilidrazônicos acoplados com núcleos de acridína (Figura 21) foram testadas para ambas as cepas.

De acordo com o gráfico 2, o composto AMAC01 (2-ciano-acridin-9-il-metileno-hidrazida) apresentou uma CIM de 256 $\mu\text{g/mL}$, tanto para a cepa de *Escherichia coli*, quanto para a cepa de *Staphylococcus aureus*, o que indica uma atividade moderada para ambas as cepas. Quando comparado com o composto ACSAZ, que possui CIM de 1024 $\mu\text{g/mL}$ para *Staphylococcus aureus* e 512 $\mu\text{g/mL}$ para *Escherichia coli*, observa-se que mesmo ambos apresentando um núcleo acridínico, o composto ACSAZ apresentou uma atividade diminuída para as duas cepas sendo um pouco mais ativo para a cepa Gram-negativa.

Figura 21. Diferenças estruturais entre (11) AMAC01 e (12) ACSAZ



Fonte: ChemDraw 12.0

Essa diminuição da atividade do ACSAZ pode estar relacionada aos grupos substituintes no anel acridínico, como demonstrado na Figura 20, uma vez que o composto AMAC01 não apresenta substituições nos anéis aromáticos e sua atividade foi melhor do que o composto ACSAZ em ambas as cepas, como também a ausência da função imina ($\text{N}=\text{CH}$) entre o núcleo acridínico e o esqueleto carbônico pode influenciar na interação do composto com o alvo biológico.

Os resultados obtidos corroboram com Araujo et al. (2013), o qual avaliou a ação antimicrobiana de dois compostos acridínicos frente as cepas *Escherichia coli* (ATCC) e *Helicobacter pylori* (ATCC), onde constatou ação bactericida na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ para cepa de *E. coli*.

6. CONCLUSÃO

Foram sintetizados onze derivados acilidrazônicos substituídos ou não, nos quais todos tiveram suas características físico-químicas determinadas, com rendimentos bastante plausíveis, de 53% a 94%, indicando rota sintética satisfatória.

Das moléculas sintetizadas apenas JR-09 e JR-11 tiveram suas estruturas elucidadas por espectroscopia de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C DEPT-Q. Todas apresentaram padrões de deslocamento e absorbância de acordo com a literatura confirmando a existências dessas moléculas.

De acordo com os resultados de RMN, foi observado a duplicidade dos picos, o que pode estar diretamente relacionado à configuração ou conformação adotada pela molécula podendo estar em configuração *Z* e *E* (isômeros) ou na conformação *syn* e *anti-periplanar* (confômeros). Contudo, analisando os resultados observados nos RMN ^1H com variação de temperatura foi possível observar uma diminuição na intensidade dos picos de hidrogênio, o que indica a formação de confômeros. Porém, a fim de identificar a coalescência entre os mesmos será necessário a realização de RMN ^1H em temperatura de 90 °C, bem como de técnicas bidimensionais como COSY, HMBC e HMQC.

Todas as moléculas foram submetidas à avaliação antibacteriana o qual se constatou uma maior atividade para a cepa Gram-negativa. Contudo, os compostos NITRADOS, na posição *orto* e *para*, e a molécula AMAC01 tiveram atividade mais promissora para a cepa de *E. coli* ATCC 25922, sendo o composto AMAC01 o que apresentou-se mais ativo para ambas as cepas, eleito o composto *Hit* da série testada.

Em vista disso, observa-se que o composto AMAC01 apresenta-se como promissor fármaco antibacteriano, uma vez que essa contém um núcleo acridínico sem substituinte e apresenta a função imina, diretamente ligado ao anel, os quais parecem ser essenciais para a atividade microbiológica, visto que o núcleo acridínico já é conhecido, de acordo com a literatura, por apresentar atividade biológica como intercalador de DNA.

REFERÊNCIAS

ALBERT, A. 1966. The Acridines. 2. ed. London: **Edward Arnold** LTDA. cap. 19, p. 403-433, 1966.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. 2008. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ANVISA. “**Resistência Microbiana – Mecanismos e Impacto**”. 2016. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm>. Acesso em: 27/08/2016.

ARAÚJO, G. M.; MACEDO, E. M.; CARVALHO, M. S.; FERNADESJ. V.; ANDRADE, V. S. Compostos acridínicos frente às bactérias gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Helicobacter pylori* ATCC 43504. In: **27º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. 2165-1., 2013, Natal. Anais... Rio Grande do Norte: Sociedade Brasileira de Microbiologia. 2013.

BARREIRO, E. J. A. Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, p. 26-34, 2009.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos. São Paulo: **Artmed**, 243 p. 2015.

BONSE, S., SANTELLI-ROUVIER, C., BARBE, J., KRAUTH-SIEGEL, R.L. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by acridines: kinetic studies and structure activity relationships. **J. MedChem.**,v. 42, p. 5448-5454, 1999.

BRANÃ, M.F., CASARRUBIOS, L., DOMÍNGUEZ, G., FERNANDÉZ, C., PÉRES, J.M., QUIROGA, A.G., NAVARRO-RANNINGER, C., PASCUAL-TERESA, B. Synthesis, cytotoxic activities and proposed mode of binding of a series of bis{[(9-oxo-9,10-dihydroacridine-4-carbonyl)amino]alkyl}alkylamines. **Eur. J. Med. Chem.**,v. 37, p. 301-313, 2002.

CACHIBA, T. H.; CARVALHO B. D.; CARVALHO, D. T.; CUSINATO, M.; PRADO, C. G.; DIAS, A. L. T. 2012. Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados *N*-acilidrazônicos. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1566-1669, 2012.

CAIXEIRO, J. M. R. 2007. Dialquilfosforidilidrazonas e *N,N'*- Bis-(Diisobutilfosforiltioamida)-diaminas: Síntese, caracterização, modelagem molecular e estudo da atividade biológica. **Tese de Doutorado**, Instituto de Ciências Exatas – Programa de pós-Graduação em Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

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. 2003. **Quim. Nova**, Vol. 26, No. 3, 428-438, 2003.

CLSI. 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**, ed. 10, v. M7-A10. 2015

DUARTE, C M., Novos Derivados *N*-acilidrazônicos Planejados como Candidatos a Fármacos Analgésicos e Antiinflamatórios. **Tese de D.Sc.**, Instituto de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2006.

FUKUSHIMA, R.S.; WEIMER, P.J.; KUNZ, D.A. Use of photo catalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.

GIRAULT, S., GRELLIER, P., BERECIBAR, A., MAES, L., MOURAY, E., LEMIÈRE, P., DEBREU, M-A, DAVIOUD-CHEVET, E., SERGHERAERT, C. Antimalarial, antitypanosomal, and antileishmanial activities and cytotoxicity of Bis-(9-amino-6 chloro- 2-methoxyacridines): influence of the linker. **J. MedChem.**, v. 43, p. 2646-2654, 2000.

GOULD, I. M. 2008. The epidemiology of antibiotic resistance. **Int J Antimicrob Agents**. 32 Suppl1:S2–9. 2008.

GRUNDMANN, H.; SOUSA, M. A.; BOYCE, J.; TIEMERSMA, E. 2006. Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. **Lancet**. 368:874–85. 2006.

GUIDO, R. V. C.; OLIVIA, G.; ANDRICOPULO A. D. 2008. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Curr. Med. Chem.**, v.15, n.1, p.37-46, 2008.

HAWKEY, P.M. 2008. The growing burden of antimicrobial resistance. **J Antimicrob Chemother.**;62 Suppl 1:i1–9. 2008.

HAWKEY, P.M.; JONES, A. M. 2009. The changing epidemiology of resistance. **Journal Antimicrob Chemother.**;64 Suppl 1:i3–10. 2009.

JORGE, S. D.; PALACE-BERL, F.; MASUNARI, A.; CECHINEL, C. A.; ISHII, M.; PASQUALOTO, K. F.; TAVARES, L. C. 2011. Novel benzofuroxan derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains: Design using Topliss' decision tree, synthesis and biological assay. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, n.16, p. 5031-5038, 2011.

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

LACERDA, R. B.; SALES, N. M.; DA SILVA, L. L.; TESCH, R.; MIRANDA, A. L.; BARREIRO, E. J.; FERNADES, P. D.; FRAGA, C. A. 2014. Novel Potent Imidazo[1,2-a]pyridine-N-Glyciny- Hydrazone Inhibitors of TNF- α Production: In Vitro and In Vivo Studies. **Plos One**, v. 9, n. 3, p 1-10. 2014.

LIMA, L. M. 2007. Química Medicinal Moderna: Desafios e Contribuição Brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468. 2007.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. 2005. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.

LOPES, A. B.; MIGUEZ, E.; KÜMMEERLE, A. E.; RUMJANEK, V. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Characterization of Amide Bond Conformers for a Novel Heterocyclic Template of N-acylhydrazone Derivatives. **Molecules**, v. 18, p. 11683-11704, 2013.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. Ed. Porto Alegre: Artmed, 1160 p. 2016.

MAIA, R. C. 2008. Novos derivados quinazolinônicos planejados como análogos conformacionalmente restrito de N-acilidrazonas bioativas. **Dissertação de Mestrado**. IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 2008.

MONTANARI, C. A. 1995. Química Medicinal: Contribuição e Perspectiva no Desenvolvimento da Farmacoterapia. **Química Nova**, v. 18, p.56-64, 1995.

MORPHY, R; KAY, C.; RANKOVIC, Z., 2004. "From magic bullets to designed multiple ligands", **Drug Discov. Today**, v. 9 (15), p. 642-51, 2004.

NEPALI, K.; SHARMA, S.; SHARMA, M.; BEDI, P. M. S.; DHAR, K. L.; **Eur. J. Med. Chem.** 2014, 77, 422.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OLIVEIRA, A. C. Princípios básicos da modelagem molecular e sua aplicação no desenvolvimento de novos fármacos. **In: II Jornada de Inverno de Química.** 2010. Duque de Caxias. Anais... Duque de Caxias, 2010.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. 2002. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PANCOTE, C. G.; CERA, T. P. 2013. Planejamento de Fármacos. **Revista Científica Unilago.** p. 137-142. 2013.

PEREIRA, A. L. C. Síntese, Elucidação Estrutural e *Screening* Antimalárico de Novos Derivados *N*-acilidrazônicos Acridínicos. 2016. 70. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2016.

PINTO T. J. A.; KANEKO T. M.; OHARA M. T. 2003. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: **Atheneu Editora**, 325 p. 2003.

RAITZ, I. Síntese de Derivados *N*-acilidrazônicos com potencial atividade antiparasitária. 2012. 118 f. **Dissertação de Mestrado** (Pós-graduação em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, S. G. 2007. Biological activities of hydrazones derivatives. **Molecules.** V. 12, p. 1910-1939.

RODRIGUES, A. P. C. 2008. Otimização estrutural do prótipo 2-furanil-1,3-benzodioxolil-*N*-acilidrazônico LASSBio-129. **Dissertação de Mestrado** – LASSBio – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SAHM D. F.; WASHINGTON II J. A. 1991. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: Balows, A.; Hauser, W.J.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D.; Shamody, H.J. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington, DC: **American Society for Microbiology**, p. 1105-1116.

SÁNCHEZ, I. et. Al. 2006. Synthesis and biological evaluation of modified acridines: the effect of N- and O- substituent in the nitrogenated ring on antitumor activity. Eur. J. Med. Chem. V. 41, n. 3, p. 340-352, 2006.

SANTOS, C. M. 2011. Síntese e caracterização de compostos $\text{HoMn}^1 - \text{X}(\text{Ni}, \text{Co})\text{XO}^3$. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Ciências – UNESP. Bauru, SP, Brasil. 2011.

SANTOS, J. C. S. 2012. Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica preliminar de derivados *N*-acilidrazônicos. 59 f. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa-PB, 2012.

SANT’T ANNA, C. M. R.; 2007. Glossário de Termos Usados no Planejamento de Fármacos (Recomendações da IUPAC para 1997). **Quim. Nova** v. 30, n. 6, p.1446-1455, 2002.

SERAFIM, V. L. Síntese, Elucidação Estrutural e Avaliação Biológica de Potenciais Fármacos Antitumorais e Antimaláricos de Derivados Acilidrazônicos-Acridínicos. 2014. 81 f. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2014.

SILVA, T. F. Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de uma nova série de derivados cicloalquil-*n*-acilidrazonas: análogos de LASSBio-294. 2012. 280 f. **Dissertação de Mestrado** (Pós-graduação em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, 2012.

SILVA, T. G. Síntese e avaliação da atividade biológica de novos derivados acridino-tiazolidínicos e acridinoimidazolidínicos. 2003. 228 F. **Tese de Doutorado** (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2003.

SOURDON, V., MAZOYER S., PIQUE, V., GALY, J-P. Synthesis of new Bis-and Tetraacridines. **Molecules**,v. 6, p. 673-682, 2001.

TOPLISS, J.G. A. manual method for applying the Hansch approach to drug design. **J MedChem**, v.20, n4, p.463-469, 1977.

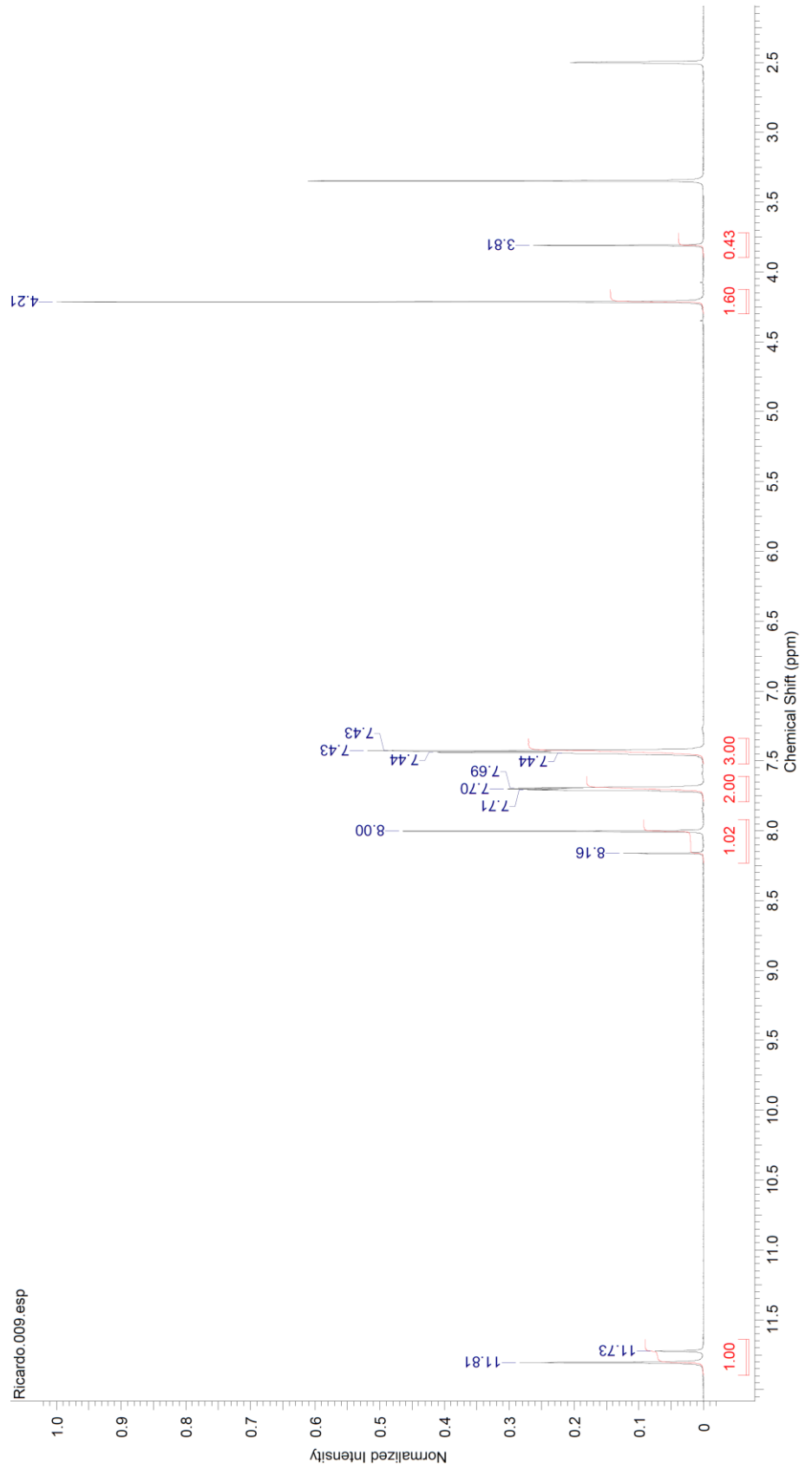
WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of terms in Medicinal Chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, 3 ed. v. 70, n. 5, p. 1129-1143, 2008.

WYRZYKIEWICZ, E. P., D. New isomeric n-substituted hydrazones of 2-, 3- and 4-pyridinecarboxaldehydes. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 35, n. 2., p. 381-387, 1998.

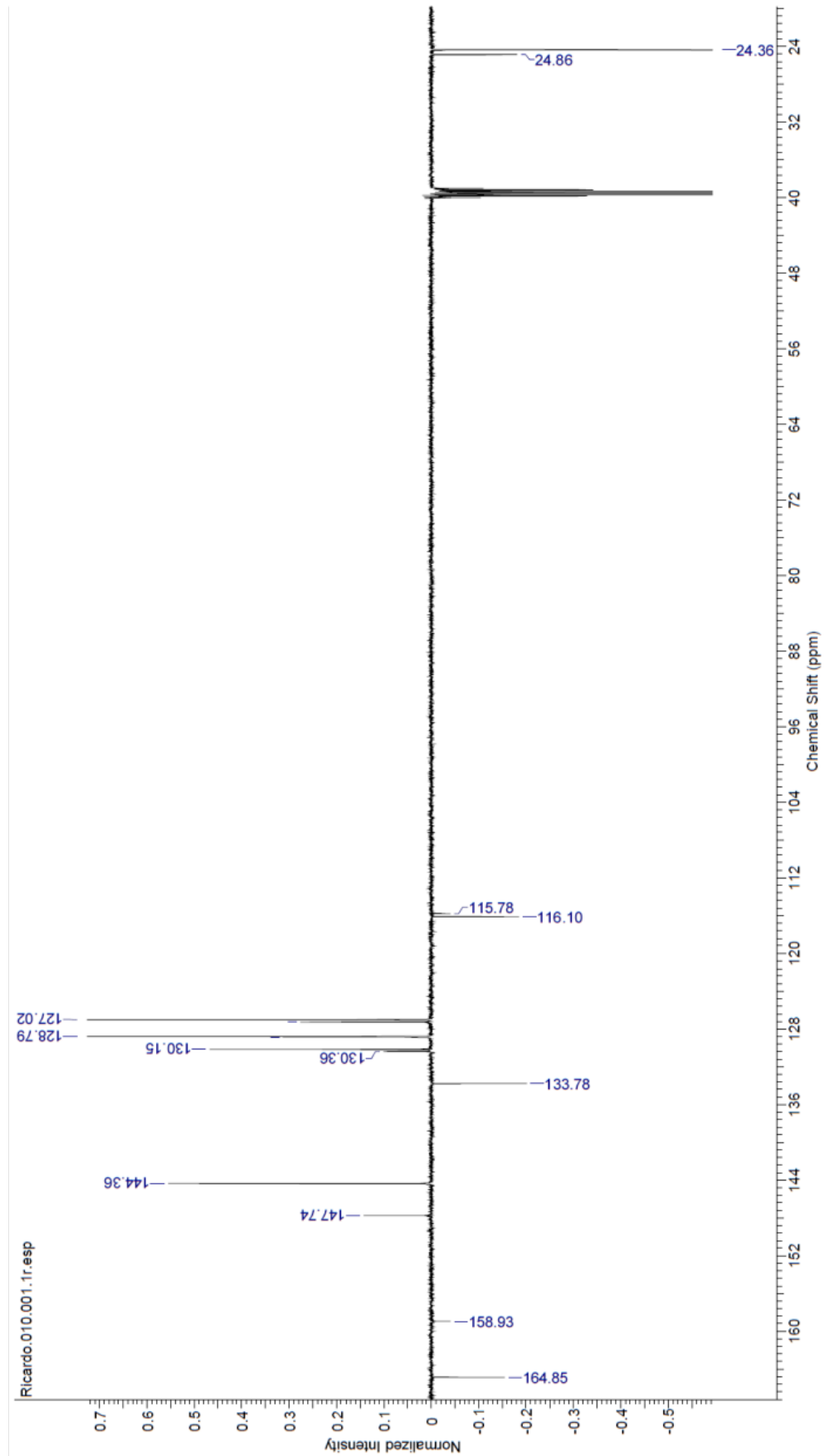
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Containing antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland: **WHO Policy Perspectives on Medicines**.v.10; 2005.

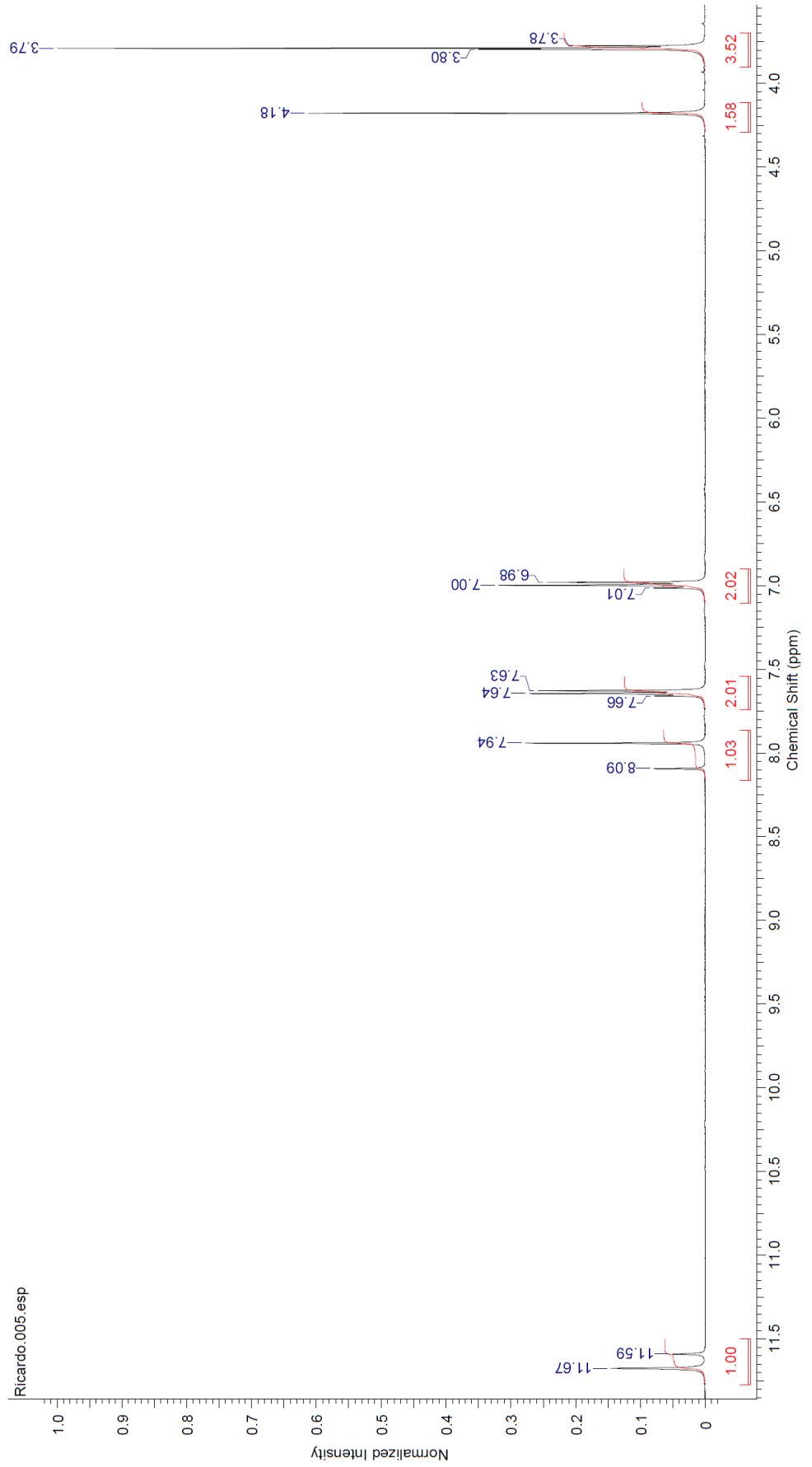
ZAMPIROLI, L. S. Dialquilfosforidilidrazonas derivadas de isatinas *N*-substituídas com potencial atividade biológica. **Dissertação de Mestrado** (Pós-graduação em Química), Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

ANEXOS

ANEXO 1 - Espectro de RMN ^1H do composto JR-09

ANEXO 2 - Espectro de RMN ¹³C DPET Q do composto JR-09



ANEXO 3 - Espectro de RMN ^1H do composto JR-11

ANEXO 4 - Espectro de RMN ^{13}C DPET Q do composto JR-11