



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA**

LUCAS LINHARES DE LÓCIO

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE DERIVADOS HÍBRIDOS ANILÍNICOS-
ACRIDÍNICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

**CAMPINA GRANDE-PB
2018**

LUCAS LINHARES DE LÓCIO

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE DERIVADOS HÍBRIDOS ANILÍNICOS-
ACRIDÍNICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao Departamento de
Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito para obtenção
do título de Farmacêutico Generalista.

Área de concentração: Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio
de Moura

**CAMPINA GRANDE-PB
2018**

É expressamente proibido 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 do trabalho.

L432p Lócio, Lucas Linhares de.
Planejamento e síntese de derivados híbridos anilínicos-acridínicos com potencial atividade antibacteriana [manuscrito]
: / Lucas Linhares de Lócio. - 2018.
75 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.

"Orientação : Prof. Dr. Ricardo Olimpio Moura, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

1. Fármacos. 2. Atividade bacteriana. 3. Atividade hemolítica. 4. Química medicinal. 5. Bioisosterismo.

21. ed. CDD 615.19

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE DERIVADOS HÍBRIDOS ANILÍNICOS-
ACRIDÍNICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao Departamento de
Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito para obtenção
do título de Farmacêutico Generalista.

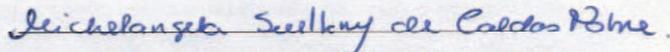
Área de concentração: Farmácia

Aprovada em: 11/08/2017

BANCA EXAMINADORA

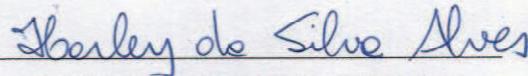


Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Msc. Michelangela Suelleny de Caldas Nobre (Avaliadora)

Faculdades Integradas de Patos



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

*Dedico esse trabalho a
minha mãe, cuja vitória é
mais sua do que minha.*

**Dedico esse trabalho a
minha mãe, essa vitória é
mais sua do que minha.**

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros e humildes agradecimentos a todos que contribuíram para vida acadêmica e me fizeram uma pessoa melhor nessa jornada universitária.

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças nos momentos difíceis e ter me dado à sorte de esta rodeada de pessoas tão boas.

Agradeço a minha mãe por fazer o possível e o impossível para manter meus estudos. A meu irmão Junior, meu padrasto De Assis e minhas irmãs Geovana e Germana como também meu primo Marcelo por sempre me apoiarem mais diretamente nessa caminhada.

Agradeço ao Professor Ricardo Olimpio de Moura pelos ensinamentos acadêmicos e pela paciência. Sendo ele pra mim um exemplo como ser humano.

Aos meus melhores amigos Raiff, Rafael, Renato, Rogério, Lucas Almeida, Jadson, Edivan, Alisson e Kaynes pelos momentos de descontração e apoio nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus colegas de turma que contribuíram de forma significativa nos meus conhecimentos durante todo o curso, em especial Mariana, Blenda, Daniele, Joyce, Pablo, Geovana e Luiz Paulo.

Aos meus colegas de laboratório e amigos Willian, Sonaly, Camila, Jamire, Gleyton, Michelangela e Mércia pela ajuda nos procedimentos e conselhos acadêmicos que foram essenciais para o desenvolvimento do meu trabalho.

Agradeço aos amigos que fiz durante a vida acadêmica que se tornaram parte fundamental na minha vida, em especial Renaly, Morgana e Marcelinha.

Ao corpo docente do departamento farmácia pela incalculável contribuição nos meus conhecimentos acadêmicos, em especial aos professores Harley, Bolivar, Heronides e Ivana.

Ao laboratório LaRMiCC chefiado pela professora Zilka Nanes e seu aluno Cayque que me ajudaram nos testes microbiológicos.

Agradeço a Universidade Estadual da Paraíba por permitir que eu iniciasse minha vida acadêmica, a UFPE, UFPB e UFRN pela ajuda nas análises necessárias para elucidação estrutural. E por fim, ao CNPq pelo o financiamento desse estudo.

RESUMO

PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE DERIVADOS HÍBRIDOS ANILÍNICOS-ACRIDÍNICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Segundo a Organização Mundial de Saúde cerca de 10 milhões de pessoas irão morrer por doenças infecciosas em todo mundo até 2050 tendo esse problema associado principalmente a resistência bacteriana. Neste contexto, a busca de antibióticos estruturalmente novos surge como a melhor estratégia para enfrentar essas infecções. Com isso química medicinal surge como uma proposta promissora para a obtenção de moléculas cada vez ativas contra essas infecções. Este estudo tem o intuito de sintetizar, avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica de derivados híbridos anilínicos-acridínicos e seus bioisómeros. Inicialmente foi sintetizado o núcleo 5-metil-2-amino-1,3,4-Tiodiazol a partir da condensação da tiossemicarbazida com anidrido acético com equivalência molar de 1:1, usando como catalisador o ácido acético em meio etanólico. Em seguida realizou a condensação dos núcleos 5-metil-2-amino-1,3,4-Tiodiazol 2-aminotiazol, 2-amino-1,3,4-Tiodiazol e anilínico com as acridinas através da substituição nucleofílica no aromático, com e equivalência molar de 1:1, usando como catalisador o ácido clorídrico e DMF como solvente. Foram realizados ensaios *in vitro* para os testes de avaliação da ação antibactericida dos compostos, averiguando a atividade dos núcleos isolados e dos seus derivados híbridos, através da determinação concentrações inibitórias mínimas usando a método de microdiluição em caldo como proposto na pelo CLSI M7-A6, 2012, frente às cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Também foi realizado testes de toxicidade *in vitro* através da avaliação atividade hemolítica dos compostos. Os resultados mostram que os compostos apresentam rota sintética viável, já que todos os compostos rendimentos satisfatórios (acima de 50%). Através de espectroscopia de infravermelho e RMN de ^1H e RMN de ^{13}C do composto LLAC02 se observou deslocamentos determinantes para caracterizar o sucesso da reação. Portanto, nessa pesquisa foi possível sintetizar nove moléculas, um intermediário e oito finais, determinar suas características físico-químicas básicas, avaliar sua atividade citotoxicidade através dos testes de hemólise e atividade bactericida. Os testes de hemólise sugeriram que os compostos não apresentam citotoxicidade significativa e os testes antibactericidas mostraram que não teve atividade bactericida, provavelmente devido à dificuldade de solubilização dos compostos.

PALAVRAS-CHAVE: Desenvolvimentos de fármacos; Hibridação molecular; Derivados anilínicos-acridínicos; Bioisosterismo; Atividade Bacteriana; Atividade hemolítica.

ABSTRACT

PLANNING AND SYNTHESIS OF ANILINE-ACRIDINE HYBRID DERIVATIVES WITH POTENTIAL ANTIBACTERIAL ACTIVITY

According to the World Health Organization about 10 million people will die from infectious diseases worldwide by 2050 and this problem primarily associated with bacterial resistance. In this context, the search for structurally new antibiotics appears as the best strategy to confront these infections. With this medicinal chemistry emerges as a promising proposal to obtain molecules increasingly active against these infections. This study aims to synthesize, evaluate the antimicrobial and cytotoxic activity of aniline-acridine hybrid derivatives and their bioisosters. Initially, the 5-methyl-2-amino-1,3,4-thiodiazole nucleus was synthesized from the condensation of thiosemicarbazide with acetic anhydride with 1: 1 molar equivalency using acetic acid in ethanolic medium as the catalyst. It then performed the condensation of the 5-methyl-2-amino-1,3,4-thiodiazol 2-aminothiazole, 2-amino-1,3,4-thiodiazole and aniline nuclei with the acridines via nucleophilic non-aromatic substitution, with and molar equivalence of 1: 1, using as the catalyst hydrochloric acid and DMF as solvent. In vitro assays were performed for the evaluation of the antibacterial action of the compounds, investigating the activity of the isolated nuclei and their hybrid derivatives by determining minimum inhibitory concentrations using the broth microdilution method as proposed in CLSI M7-A6, 2012, against *Staphylococcus aureus* strains (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922). In vitro toxicity tests were also performed by evaluating the hemolytic activity of the compounds. The results show that the compounds present viable synthetic route, since all compounds yield satisfactory (above 50%). Infrared spectroscopy and ^1H NMR and ^{13}C NMR of compound LLAC02 showed important shifts to characterize the success of the reaction. Therefore, in this research it was possible to synthesize nine molecules, one intermediate and eight final, determine their basic physicochemical characteristics, evaluate their cytotoxicity activity through hemolysis tests and bactericidal activity. The hemolysis tests suggested that the compounds did not present significant cytotoxicity and the antibacterial tests showed that it did not have bactericidal activity, probably due to the solubilization difficulty of the compounds.

KEYWORDS: Drug development; Molecular hybridization; Aniline-acridine derivatives; Bioisosterism; Bacterial Activity; Hemolytic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estruturas da Cefdinir® e Cefazolina® com destaque para os anéis tiazol e tiodiazol, respectivamente.....	16
Figura 2:	Tipos de Hibridação Molecular	19
Figura 3:	Tipos de Bioisosterismo.....	20
Figura 4:	Mecanismo geral para SNAr.....	21
Figura 5:	Isômeros do Tiodiazol.....	22
Figura 6:	Isômeros do tiazol.....	23
Figura 7:	Estados de oxidação das acridinas.....	24
Figura 8:	Amostras na microplaca de 96 poços utilizada nos testes de hemólise.....	32
Figura 9:	Amostras na microplaca de 96 poços utilizada nos testes microbianos..	34
Figura 10:	Reação de redução da Resazurina.....	35
Figura 11:	Estrutura do 5-metil-1,3,4-tiodiazol-2-amino (NL).....	40
Figura 12:	Espectro de Infravermelho do 5-metil-1,3,4-tiodiazol-2-amino (NL).....	41
Figura 13:	Estrutura do LLAC01.....	43
Figura 14:	Espectro de Infravermelho do LLAC01.....	43
Figura 15:	Estrutura do LLAC02.....	44
Figura 16:	Espectro de Infravermelho do LLAC02.....	45
Figura 17:	Representação de rotâmetria do LLAC02.....	46
Figura 18:	Espectro de RMN ¹ H (DMSO _d ₆) 400 MHz do LLAC02.....	47
Figura 19:	Espectro de RMN ¹ H (DMSO _d ₆) 400 MHz do LLAC02 (Ampliado).....	47
Figura 20:	Espectro de RMN ¹³ C (DMSO _d ₆) 100 MHz do LLAC02.....	48
Figura 21:	Espectro de RMN ¹ H e RMN ¹³ C (DMSO _d) do 2-amino-tiazol.....	49
Figura 22:	Espectro do RMN ¹³ C (DMSO _d ₆) do 9-cloro-acridina.....	49
Figura 23:	Espectro do RMN ¹ H (DMSO _d ₆) do 9-cloro-acridina.....	50
Figura 24:	Estrutura do LLAC03.....	51
Figura 25:	Espectro de Infravermelho do LLAC03.....	51
Figura 26:	Estrutura do LLAC04.....	52
Figura 27:	Espectro de Infravermelho do LLAC04.....	53

Figura 28:	Estrutura do LLAC05.....	54
Figura 29:	Espectro de Infravermelho do LLAC05.....	55
Figura 30:	Estrutura do LLAC06.....	56
Figura 31:	Espectro de Infravermelho do LLAC06.....	56
Figura 32:	Estrutura do LLAC07.....	57
Figura 33:	Espectro de Infravermelho do LLAC07.....	58
Figura 34:	Ilustração da interferência da troca de anéis bioisosteres, na acridina clorada e metoxilada, na atividade hemolítica na tipagem A ⁺	62
Figura 35:	Ilustração da interferência da troca de anéis bioisosteres, na acridina não substituída, na atividade hemolítica na tipagem A ⁺	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Compostos sintetizados com suas respectivas estruturas.....	37
Tabela 2:	Estrutura dos núcleos usados nas reações.....	38
Tabela 3:	Propriedades físico-químicas dos compostos sintetizados.....	38
Tabela 4:	Resultados da solubilidade aparente dos compostos sintetizados.....	39
Tabela 5:	Tabela dos valores de absorvância encontrados no espectro de infravermelho do 5-metil-1,3,4-tiodiazol-2-amino (NL).....	43
Tabela 6:	Tabela dos valores de absorvância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC01.....	44
Tabela 7:	Tabela dos valores de absorvância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC02.....	44
Tabela 8:	Tabela dos valores de absorvância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC03.....	44
Tabela 9:	Tabela dos valores de absorvância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC04.....	44
Tabela 10:	Tabela dos valores de absorvância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC05.....	44
Tabela 11:	Tabela dos valores de absorvância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC06.....	44
Tabela 12:	Tabela dos valores de absorvância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC07.....	44
Tabela 13:	Resultados dos testes microbiológicos dos núcleos isolados e dos seus derivados híbridos.....	60
Tabela 14:	Resultado dos testes de hemólise dos derivados sintéticos no sangue tipo A ⁺	61

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1:	Síntese do núcleo 5-metil-2-amino-1,3,4-Tiodiazol.....	31
Esquema 2:	Obtenção dos derivados no núcleo 5-metil-2-amino-1,3,4-Tiodiazol.....	31
Esquema 3:	Obtenção dos derivados núcleo 2-amino-1,3,4-Tiodiazol.....	32
Esquema 4:	Obtenção dos derivados no núcleo 2-aminotiazol.....	32
Esquema 5:	Obtenção dos derivado no núcleo anilínico.....	32
Esquema 6:	Possível mecanismo reação via SNAr.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMCRA: A Aliança Mundial contra a Resistência Antibiótica.
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- ATCC: American Type Culture Collection.
- BrCAST: Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
- CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica.
- CIM: Concentração Inibitória mínima.
- CLISI: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- DMF: Dimetilformamida.
- DMSO: Dimetilsulfoxido.
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico.
- ETOH: Etanol.
- FBDD: Fragment-Based Drug Discovery.
- FF: Faixa de Fusão.
- FTIR: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.
- HTS: High Throughput Screening.
- IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.
- LaRMiCC: Coleção do Laboratório de Microbiologia de Resistência Microbiana Clínica e Contemporânea.
- LBDD: Ligand-Based Drug Design.
- LDSF: Laboratório de Desenvolvimento de Síntese Fármacos.
- Log P: Coeficiente de Partição.
- MH: Caldo Mueller Hinton.
- OMS: Organização Mundial da Saúde.
- PA: Para Análise.
- REA: Relação Estrutura-Atividade.
- RMN ¹³C: Ressonância Magnética Hidrogênio.
- RMN ¹H: Ressonância Magnética Hidrogênio.
- RMN: Ressonância Magnética Nuclear.
- SBDD: Structure-Based Drug Design.

SNAr: Substituição Nucleofílica em Aromáticos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
3.1	PLANEJAMENTOS DE FÁRMACOS NA QUÍMICA MEDICINAL.	20
3.1.1	Descoberta de Drogas Baseadas em Grupo Farmacofórico (FBDD)...	21
3.2	ESTRATÉGIAS DE MODIFICAÇÃO MOLECULAR.....	22
3.2.1	Hibridação Molecular	22
3.2.2	Bioisosterismo.....	23
3.3	ESTRUTURAS AROMÁTICAS	24
3.3.1	Substituição Nucleofílica em Aromáticos.....	24
3.4	HETEROCÍCLICOS.....	25
3.4.1	Anel Tiodiazol.....	26
3.4.2	Anel Tiazol.....	27
3.4.3	Anel acridínico.....	28
3.5	AS BACTÉRIAS.....	29
3.5.1	Staphylococcus aureus	30
3.5.2	Escherichia coli.....	30
3.5.3	Resistência Bacteriana	30
3.5.4	Técnica de Microdiluição	31
3.6	TESTE DE CITOTOXICIDADE ATRAVES DE ATIVIDADE HOMOLÍTICA	32
4	METODOLOGIA.....	33
4.1	SÍNTESE DO 5-METIL-2-AMINO-1,3,4-TIODIAZOL.....	33
4.2	SÍNTESE DOS DERIVADOS HÍBRIDOS ANILÍNICOS- ACRIDÍNICOS E SEUS BIOISÓMEROS.....	34
4.3	PROCEDIMENTO PARA O TESTE DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA	35
4.4	PROCEDIMENTO PARA O TESTE DE ATIVIDADE BACTERICIDA.....	36

4.4.1	Preparo das Soluções a Serem Testadas	36
4.4.2	Bactérias Utilizadas	36
4.4.3	Cultura e Preparo da Suspensão Bacteriana	37
4.4.4	Teste de Sensibilidade <i>In vitro</i> Para Bactérias	37
4.4.5	Leitura do Experimento	38
4.5	ELUCIDAÇÕES ESTRUTURAIS	39
4.5.1	Espectrometria de Infravermelho com Transformador de Fourier (FTIR)	39
4.5.2	Espectroscopia de Resonância Magnética Nuclear	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS COMPOSTOS	41
5.2	POSSÍVEL MECANISMO DE REAÇÃO PARA A SÉRIE LLAC	43
5.3	ELUCIDAÇÕES ESTRUTURAIS	44
5.3.1	5-Metil-2-Amino-1,3,4-Tiodiazol	44
5.3.1.1	Espectrometria de Infravermelho	44
5.3.2	LLAC01	46
5.3.2.1	Espectrometria de Infravermelho	46
5.3.3	LLAC02	48
5.3.3.1	Espectrometria de Infravermelho	48
5.3.3.2	Resonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono	49
5.3.4	LLAC03	54
5.3.4.1	Espectrometria de Infravermelho	55
5.3.5	LLAC04	56
5.3.5.1	Espectrometria de Infravermelho	57
5.3.6	LLAC05	58
5.3.6.1	Espectrometria de Infravermelho	59
5.3.7	LLAC06	59
5.3.7.1	Espectrometria de Infravermelho	60
5.3.8	LLAC07	61
5.3.8.1	Espectrometria de Infravermelho	62
5.4	TESTES BIOLÓGICOS	63

5.4.1	Teste Microbiológico	63
5.4.2	Citotoxicidade Através de Atividade Hemolítica	64
6	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	69

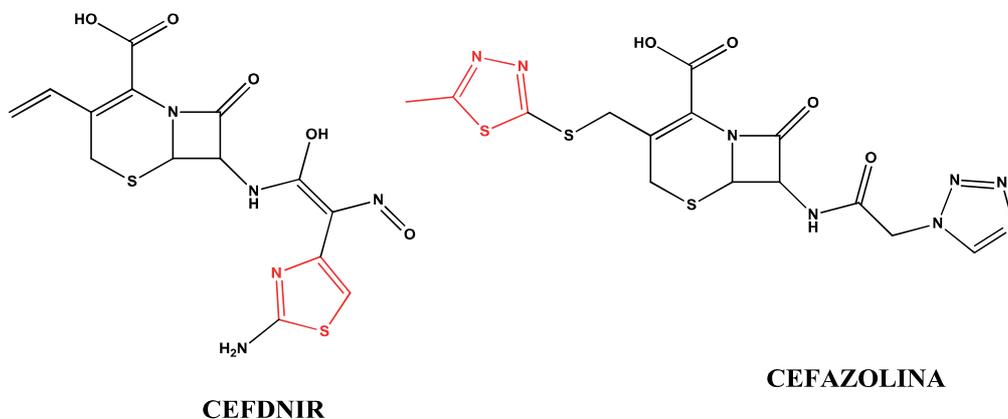
1. INTRODUÇÃO

Desde que Wohler sintetizou a ureia em 1828, a síntese orgânica teve grande evolução permitindo, assim, a síntese de compostos completos de forma mais eficiente. Nesse sentido, a síntese de análogos, isômeros, isósteros ou outros processos de modificação molecular, como a simplificação molecular, a latenciação, bioisosterismo, hibridização molecular, entre outros, qualificam a química medicinal como ferramenta para o desenvolvimento de estruturas cada vez mais ativas em sistemas biológicos (CERA; PANCOTE, 2012).

Uma das estratégias de síntese de novas estruturas químicas usadas pela indústria farmacêutica é a hibridação molecular. Essa estratégia clássica é a conjugação de duas entidades químicas distintas a fim de se obter uma molécula nova com dois grupos farmacofóricos com atividades biológicas e, assim, ter uma eficácia maior em relação aos seus compostos de origem (ARAÚJO et al., 2015).

Dentre essas entidades químicas, destacamos os derivados dos núcleos tiodiazol e tiazol, que apresentam amplo emprego na Farmacologia sendo usado como antiviral, antitumoral, anti-hipertensiva, anticonvulsivante, anti-inflamatória, antioxidante, analgésica e com maior relevância como antibacteriano sendo exemplificado pelas cefalosporinas Cefdinir®, Cefozoina® (figura1) que apresenta o núcleo tiazol (EL-BEHAIRY, et al., 2014) e tiodiazol (DAS; SIKDAR; BAIRAGI, 2016) em sua estrutura, respectivamente.

Figura 1: Estruturas da Cefdinir® e Cefazolina® com destaque para os anéis tiazol e tiodiazol, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Outra entidade bastante estudada são as acridinas, que também são conhecidas como compostos versáteis que possuem ampla variedade de atividade biológica, sendo usado como anticonvulsivantes, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, antimaláricos, antileishmania e, principalmente, como antimicrobiano e antitumoral. A hibridação de núcleos de acridinas com tiazol e tiodiazol não é relatado na literatura, porém os mesmos separados apresentam atividade antibacteriana comprovada em estudos já citados. E assim, seria interessante avaliar essa conjugação tanto na parte sintética como na possível atividade antibacteriana (MAKHAEVA et al., 2017)

Normalmente para a determinação da atividade antibacteriana preliminar de compostos novos, tanto de origem sintética quanto de origem natural, utiliza-se a metodologia de CIM, que determina a concentração mais baixa de uma entidade química a qual impede o crescimento visível de uma bactéria (BRASIL, 2017). Esse método, que segue a normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLISI), utiliza frequentemente a microdiluição em caldo por ser uma metodologia mais simples e econômica, pois utiliza uma pequena quantidade da substância a ser testada (DE BONA et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem o intuito de sintetizar, avaliar a atividade antimicrobiana e hemolítica dos derivados híbridos anilínicos-acridínicos e seus bioisómeros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Sintetizar híbridos de acridinas, tiodiazol, tiazol e anilina;
- b) Determinar as características físico-químicas dos compostos;
- c) Elucidar a estrutura dos compostos através de técnicas de espectroscopia no infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e de carbono;
- d) Avaliar preliminarmente a citotoxicidade dos compostos através de teste de hemólise;
- e) Avaliar a atividade antibacteriana dos compostos sintetizados frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) utilizando a técnica da microdiluição.

3. REFERENCIAL TEORICO

3.1 PLANEJAMENTOS DE FÁRMACOS NA QUÍMICA MEDICINAL

Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) a Química Medicinal é a parte da química cuja missão é planejar, descobrir, inventar, identificar e preparar de compostos biologicamente ativos, estudar o metabolismo, interpretar o mecanismo de ação a nível molecular e construir as relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica (LIMA, 2007).

Inicialmente a obtenção de novas substâncias orgânicas para fins terapêuticos eram feitas através de processos de fermentação ou isolamento de fontes naturais, porém devido esses produtos naturais bioativos geralmente serem isolados em baixa quantidade e muitas vezes apresentarem alta complexidade estrutural, surgiu necessidade de obter novas fontes de compostos químicos e assim, a síntese orgânica apareceu como uma forma alternativa para as indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de medicamentos de forma mais rápida e eficiente (SANGI, 2016).

Um dos grandes desafios da química medicinal no processo de planejamento de fármacos é contribuir para o aumento da taxa de sucesso na descoberta de novas entidades químicas. Nesse âmbito, dentre as várias técnicas utilizadas para criação de novas entidades químicas podemos destacar obtenção a partir da natureza (naturais, animais ou microorganismos), ou novas moléculas obtidas por técnicas SBDD (structure-based drug design), LBDD (ligand-based drug design) FBDD (fragment-based drug discovery). Essa estratégia ligada a integração entre métodos experimentais e computacionais tem enorme importância na identificação e no desenvolvimento de novas moléculas bioativas, pelo fato de agilizar várias etapas do processo. (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Os métodos de SBDD se baseiam no conhecimento do arranjo topológico de alvos biológicos, logo, utilizam como pré-requisito dados 3D detalhados da macromolécula em estudo. Essa informação pode ser obtida mediante a análise de estruturas cristalográficas, de RMN ou de modelagem por homologia (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). A medida que se tem a cristalografia do receptor, é comum aplicar o docking molecular na análise de grandes bases de dados de compostos com o objetivo de caracterizar um espaço químico-biológico privilegiado e permitir a seleção de compostos para testes bioquímicos e/ou biológicos macromoleculares

(proteína-alvo), seguido da avaliação (pontuação) e classificação do modo de ligação proposto (HUANG et al., 2010).

Quando a estrutura da proteína alvo é desconhecida ou não pode ser previsto pelas técnicas de modelagem, o desenho do fármaco baseado em uma estrutura já conhecida surge como solução. Esse método, intitulada LBDD, usa abordagens estatísticas para correlacionar a atividade do ligante com a informação estrutural, onde se baseia no conhecimento de moléculas que se ligam ao alvo biológico de interesse (APAROY; KUMAR REDDY; REDDANNA, 2012).

3.1.1 Descoberta de Drogas Baseada em Grupo Farmacofórico (FBDD)

A descoberta de drogas baseada em fragmentos (FBDD) surgiu na última década como uma ferramenta poderosa para descobrimento de novos fármacos. A primeira abordagem é identificar os pontos de partida: observar os grupos funcionais que estão diretamente associada a atividade biológica de uma determinado molécula já com a atividade consolidada. Esses fragmentos são, então, expandidos ou ligados entre si para gerar *leads* com atividade biológica superior às moléculas de origem. Embora as origens dessa técnica tenham decorrido há cerca de 30 anos, foi apenas em meados da década de 1990, com técnicas experimentais suficientemente sensíveis e rápidas, que essa metodologia explodiu resultando em pelo menos 18 drogas que entraram na clínica (ERLANSON, 2011)

Para estabelecer os grupamentos que são mais eficazes para determinado alvo, é necessário fazer o que chamamos de *screening*, que pode ser feito através de testes *in vitro* e *in situ*. Com isso, é feito o uso de estudos de relação estrutura-atividade (REA), com o intuito de saber quais os grupos funcionais mais ativos. A técnica robotizada de HTS (*High-throughput screening*) ajuda a rastrear os fragmentos moleculares mais rapidamente, pois pode testar milhares de fragmentos em poucas horas, contrapondo-se aos estudos *in vivo*, que podem demorar anos (ERLANSON; MCDOWELL; O'BRIEN, 2004.)

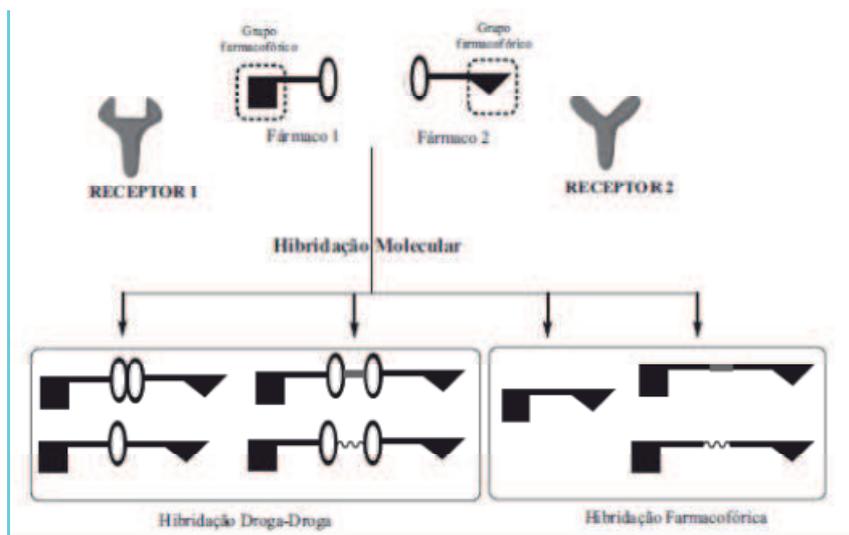
3.2 ESTRATÉGIAS DE MODIFICAÇÃO MOLECULAR

O sucesso das estratégias de modificação molecular dar-se pelo fato de ser usado de forma significativa na otimização de fármacos de diferentes classes terapêuticas, sendo essa prática amplamente utilizada pela indústria farmacêutica para descobrir novos análogos mais potentes que a molécula original (LIMA; BARREIRO, 2005). Dentre as principais estratégias de otimização molecular se destaca o bioisosterismo, hibridação molecular (CERA; PANCOTE, 2012).

3.2.1 Hibridação Molecular

A hibridação molecular refere-se a incorporação de dois ou mais fragmentos bioativos em uma molécula através de ligações covalentes. Estes novos híbridos, quase sempre, são dotados de atividade melhorada ou novas propriedades biológicas em comparação aos seus membros individuais. A hibridação molecular recentemente ganhou crescente atenção entre a comunidade científica com vários exemplos bem sucedidos (YU et al., 2016).

O híbrido de ação sinérgica pode ser obtido pela união de fármacos inteiros ou apenas por grupos farmacofóricos que exibam a mesma atividade farmacológica, mas que atuam em alvos bioquímicos diferentes, como esquematizados na figura 2. A molécula híbrida pode ter uma única atividade farmacológica por diferentes mecanismos de ação ou pode ter atividades biológicas diferentes, mas que possuam alguma relação no combate da patologia do paciente. Neste último, o híbrido também chamado de agente simbiótico, exerça duas ações farmacológicas distintas no combate as causas e sintomas decorrentes da doença (ARAÚJO et al., 2015).

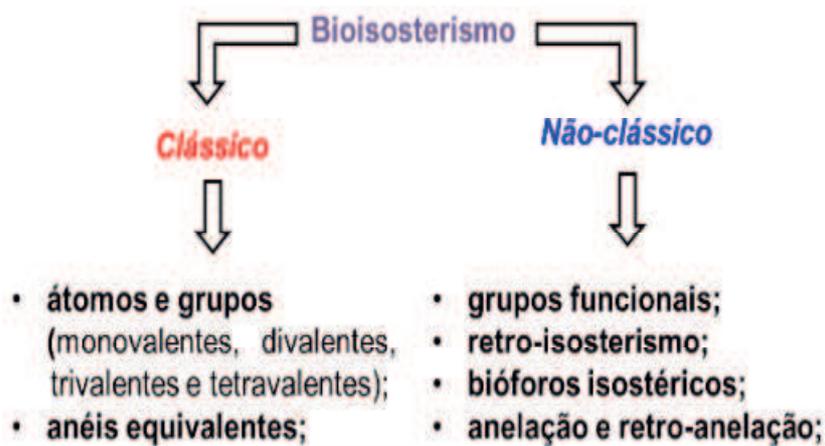
Figura 2: Tipos de Hibridação Molecular

Fonte: ARAÚJO et al., 2015.

3.2.2 Bioisosterismo

O bioisosterismo é outra estratégia de modificação molecular de um composto-protótipo baseada na troca de fragmentos moleculares, ou seja, a troca de uma parte da molécula por outra. Esse fragmento substituído pode apresentar propriedades físico-químicas semelhantes (bioisosterismo clássico) ou não (bioisosterismo não clássico) da porção de origem, porém apresentarem o mesmo efeito no meio biológico. Esse artifício pode ser utilizado para melhoria da farmacocinética (melhorando a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação) e sua farmacodinâmica, obtendo um composto mais ativo no organismo (BARREIRO; FRAGA, 2014).

Alfred Burger classificou o bioisosterismo em duas categorias: clássico e não-clássico (Figura 3). O bioisosterismo clássico consiste em permutar átomos de mesma valência, grupos ou substituintes, incluindo anéis aromáticos equivalentes e o bioisosterismo não clássico não atende as regras eletrônicas e estéricas dos bioisósteros clássicos, mas podem produzir atividade biológica similar e grupos intercversíveis como $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{CO}_2$, $-\text{SO}_2$, $-\text{CON}-$ (BURGER, 1983).

Figura 3: Tipos de Bioisosterismo

Fonte: BARREIRO; FRAGA, 2014.

O bioisosterismo clássico de anéis equivalentes é utilizado para planejar séries semelhantes de compostos principais, com o objetivo de investigações detalhadas sobre as diferentes contribuições físico-químicas resultantes da permutação de anéis equivalentes e, por isso, sendo uma ferramenta fundamental no desenvolvimento dos chamados fármacos *me-too* (OLIVEIRA et al., 2017).

3.3 ESTRUTURAS AROMÁTICAS.

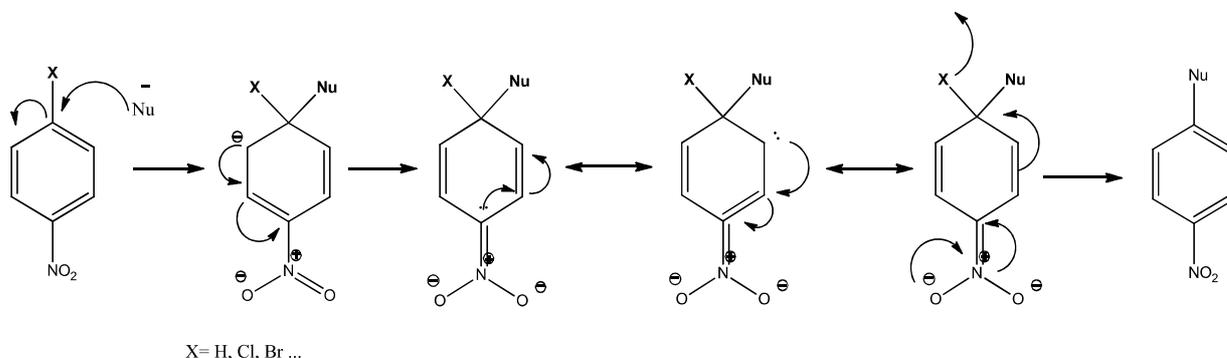
Estruturas que apresentam aromaticidade são planares cíclico e possui um sistema de elétrons π deslocalizados, sendo essa deslocalização manifestada por algumas características moleculares típicas, como aumento da estabilidade termodinâmica em comparação com os análogos acíclicos, equalização dos comprimentos de ligação, propriedades magnéticas com a indução de corrente cíclica de elétrons π , quando a molécula é exposta a campo magnético externo. As peculiaridades dessas estruturas eletrônicas despertam interesse em várias áreas como na química analítica e farmacêutica dada a grande aplicabilidade de compostos como flavonoides, terpenos, porfirinas e outros derivados aromáticos (CARAMORI; OLIVEIRA, 2009).

3.3.1 Substituição Nucleofílica em Aromáticos

Uma das reações químicas mais comuns é a substituição nucleofílica em aromático (S_NAr), representada na figura 4, pelo fato de ter mecanismo sintético simples quando essas estruturas apresentarem bons grupos de saída como Halogêneos (cloro, bromo, fluor, iodo), tosilatos, e grupos como NO₂, C-N, entre outros. Esses

grupos causam por efeito indutivo negativo uma deficiência na densidade eletrônica do carbono ligado ao grupo de saída, resultando no ataque do nucleófilo (RICARDO, 2006).

Figura 4: Mecanismo geral para S_NAr



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 Heterocíclicos

Os heterocíclicos podem ser divididos em dois grupos principais: alifáticos e aromáticos. Os alifáticos são os análogos cíclicos de aminas, éteres, amidas entre outros, e não apresentam insaturações conjugadas em sua estrutura. Os aromáticos são compostos que possuem ligações instauradas, tendo heteroátomos no seu anel, e apresenta algumas propriedades comuns com as do benzeno (ARANTES, 2007).

A importância do estudo dos compostos heterocíclicos para a química medicinal é evidente quando se observa a grande variedade de fármacos atualmente empregados na prática clínica que contêm pelo menos um desses anéis, como por exemplo o losartan®, ribavirina®, fluconazol®, dipirona® entre muitos outros com várias atividades farmacológicas diferentes (MELLO, 2006).

Um grande número de compostos orgânicos como produtos naturais, fármacos ou compostos de interesse teórico são heterocíclicos. Estas substâncias desempenham também um importante papel em muitos processos biológicos. Compostos como o DNA, cocaína, nicotina, quinina, emetina, antibióticos como a penicilina, e até uma grande variedade de vitaminas, apresentam em sua estrutura um ou mais anéis heterocíclicos (ARANTES, 2007)

Estima-se que cerca de 80% dos fármacos presentes no mercado são de origens sintéticas e os outros 20% são de origem natural ou semissintética. (MENEGATTI;

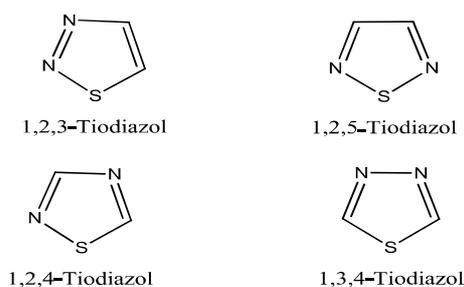
FRAGA; BARREIRO, 2001), sendo que 90% dos fármacos utilizados na terapêutica apresentam pelo menos um heterocíclico na sua estrutura. Os heterocíclicos mais estudados nas últimas décadas nos campos da Química e Farmácia são o pirazol, tetrahydroquinolinas, benzotriazol, tiazol, tiofeno, acridínicos, pirimidinas e tiodiazóis (DAI et al., 2017).

3.4.1 Anel Tiodiazol

O tiodiazol de fórmula molecular $C_2H_2N_2S$ tem uma di-insaturação em seu anel de cinco membros. Por apresentarem essa dupla instauração, esse anel apresenta as formas isoméricas 1,2,3-tiodiazol, 1,2,5-tiodiazol, 1,2,4-tiodiazol e 1,3,4-tiadiazol (figura 5), sendo o composto 1,3,4-tiodiazol, descoberto por Kuh e Freund em 1890, o isômero que foi mais concentrado as investigações no campo farmacológico (GUR et al., 2017).

Esse heterocíclico é muito usado na indústria farmacêutica pelo fato de exibir grande variedade de atuações farmacológicas como atividade antimicrobiana, antiviral, antitumoral, anti-hipertensiva, anticonvulsivante, anti-inflamatória, antioxidante, analgésica, antituberculose, antidepressiva e anticâncer (EL-BEHAIRY, et al., 2014).

Figura 5: Isômeros do Tiodiazol



Fonte: Elaborado pelo autor.

Sobre a estrutura desse anel, pode-se dizer que a presença dos heteroátomos, enxofre e dois átomos de nitrogênio aumentam a permeabilidade da membrana biológica, bem como a capacidade de atuar como aceptores de ligações de hidrogênio, além da aromatização desse anel, que contribui para uma menor toxicidade e durabilidade *in vivo* (BAUMANNA; BAXENDALE,2017).

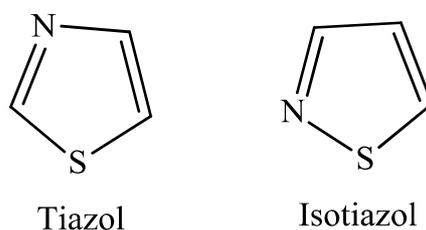
As metodologias comumente utilizadas para síntese do 1,2,3-tiodiazol incluem aqueles partidos das monoacil-hidrazinas, diacil-hidrazinas, tiosemicarbazidas, tiocarbazidas, ditiocarabazatos, tiohidrazinas, assim como na transformação de 1,3,4-oxadiazóis. Os métodos requerem um reagente de sulfuração para introduzir o átomo de enxofre seguida da utilização de um reagente, geralmente um ácido forte, para a ciclização (SHAHCHERAGH; HABIBI; KHOSRAVI, 2017).

Vários derivados tiodiazol substituídos apresentam atividade biológica como o anel 2-amino-1,3,4-tiadiazol que tem ação diurética, inibidor da anidrase carbônica, antiparkinsoniano, antibacteriano em infecção no trato gastrointestinal. São também intermediários chave na síntese de fármacos comercialmente disponíveis tais como Megazol®, acetozolamida®, furidiazina® (PANDEY et al., 2012).

3.4.2 Anel Tiazol

O anel tiazol é encontrado nas formas 1,3-tiazol e 1,2-tiazol, também chamado isotiazol (figura 6). O isômero 1,3-tiazol é a forma mais comum, sendo encontrado principalmente ligado a grupos aril ou heteroaril e, por isso, tem aplicações em diferentes campos, como nas ciências dos materiais na preparação de cristais líquidos, interruptores moleculares, sensores, na indústria de cosméticos (protetores solares), como também na indústria farmacêutica (FRIJA; POMBEIRO; KOPYLOVICH, 2016).

Figura 6: Isômeros do tiazol



Fonte: Elaborado pelo autor.

Sobre a estrutura do tiazol, o mesmo possui um grupo doador de elétrons (Enxofre) e um grupo elétron-retirado (C-N). Esse anel é um aromático com deslocalização de um par de elétrons isolados no átomo de enxofre com 6π que cumpri a regra de Huckel sobre aromaticidade (MISHRA; KUMARI; TIWARI, 2015). Com o

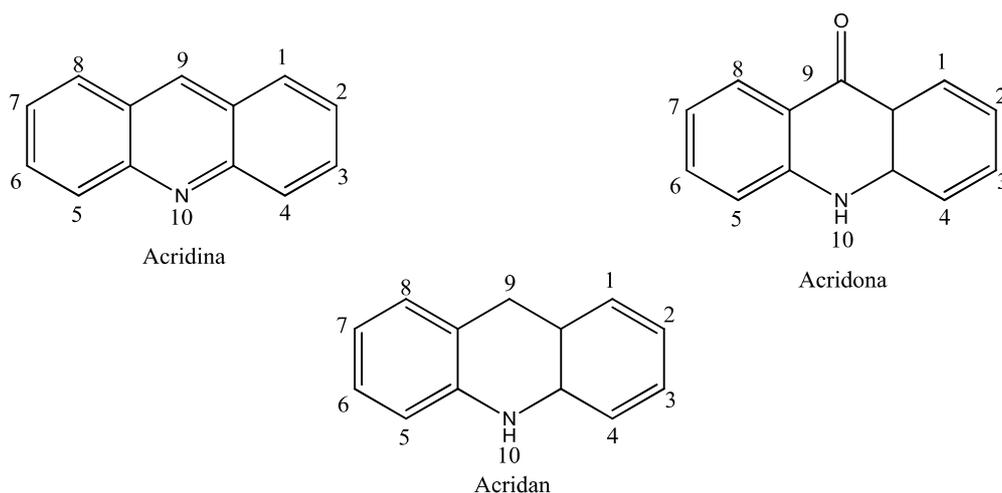
enxofre e nitrogênio nas posições 1,3 respectivamente é encontrado em produtos naturais como a vitamina tiamina (B1). Decorrendo o uso amplo na indústria farmacêutica, estando presente na Famotidina® (antiulcerogênico), Abafungina® (antifúngico), Cefedir® (antibacteriano-cefolosporina) entre outros. (DAS; SIKDAR; BAIRAGI, 2016).

Esta classe de compostos apresenta, também, potencial aplicação em síntese orgânica, podendo ser utilizada em reações de condensação, oxidação, transformação de grupos funcionais e formação de ligação carbono-carbono. A primeira metodologia de obtenção do anel tiazol foi desenvolvida com Hantzsch em 1887 que se baseia na condensação de compostos alfa-halocarbonílicos com tioamidas ou tiouréias substituídas (AGUILAR; MEYERS, 1994).

3.4.3 Anel Acridínico

A acridina é uma molécula tricíclica, linear e aromático sendo formada por uma piridina central e dois anéis de benzenos fundidos. O anel acridina pode apresentar três níveis de oxidação, que são: acridina, acridan e acridona, sendo praticamente impossível a separação dessas formas (ALMEIDA, 2015).

Figura 7: Estados de oxidação das acridinas



Fonte: Elaborado pelo autor.

As acridinas são uma das classes mais importantes de compostos heterocíclicos que contem nitrogênio. Desde que foi extraído do alcatrão de hulha por Carl Grabe e

Heinrich Caro em 1871, tem sido muito estudado, sua síntese e aplicação. Pelo fato dessa molécula ser aromática tricíclica e planar, a mesma possui a capacidade de se intercalar, reversivelmente, com a estrutura helicoidal do DNA e, por isso, tem ação como antiprotozoário, antibacteriana, antitumoral e antileishmania, como também têm relatos na literatura de atividade antivirais, anti-inflamatório e inibidor da acetilcolinesterase (SVITKOVÁ et al., 2017; ZHANG, et al., 2014).

As acridinas são estruturas extremamente reativas, tendo diferentes possibilidades de obtenção de derivados. Essa estrutura policíclica está sujeita a ataques eletrofílicos nas posições C-1 e C-4 e a ataques nucleofílicos nas posições C-9 e C-10. Tendo como posição C-9 a opção mais utilizada recentemente, principalmente quando adiciona grupos de saída (*leaving groups*) como cloro e aldeídos que permite que a reação seja mais espontânea (SCHMIDT, LIU; 2015).

Mesmo o anel acridínico sendo obtido de forma natural, a forma de obtenção por via sintética é a mais usada atualmente. Uma das formas de síntese é o método de Radchenko et al., 2010, onde se observa uma reação de acoplamento catalisada por cobre, brometo e 2-aminoacetofenona, como também a ciclização eletrofílica da amina para formação do anel acridínico (RADCHENKO et al., 2010).

3.5 AS BACTÉRIAS

Bactérias são organismos simples, unicelulares que não apresentam membrana nuclear (procariontes), mitocôndria, complexo de golgi ou retículo endoplasmático e que se reproduzem por divisão assexuada. A classificação mais básica destes seres está associado, à sua complexa parede celular, consistindo em duas formas básicas: uma parede celular com uma camada fina de peptidoglicano, nas bactérias gram-positivas e uma membrana externa sobreposta nas bactérias gram-negativas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015).

Louis Pasteur através dos seus experimentos descobriu que as bactérias são importantes para processos de fermentação e, também, que as mesmas eram de ampla distribuição pelo meio ambiente. Porém, somente no século XIX, o pesquisador Robert Koch sugeriu a hipótese que as bactérias poderiam ser os causadores de processos infecciosos como tuberculose, cólera e febre tifoide. Desta forma, começou o interesse de desenvolver medicamentos que combatesse essas doenças, surgindo a Penicilina® e a Salvarsan® primeiro antibiótico de origem sintética (GUIMARÃES et al., 2010).

3.5.1 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* atua normalmente em comensalismo com o ser humano, no entanto, por vez, algumas de suas cepas são capazes de causar relações desarmônicas em condições em que o hospedeiro encontra-se fragilizado, resultando em infecções. Os grupos de pessoas mais suscetíveis a riscos de acometimentos por este patógeno são usuários de drogas endovenosas, portadores de insuficiência renal, insulino-dependentes, pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI) ou com doenças dermatológicas, usuários de cateteres, idosos e imuno comprometido (SILVA, 2014).

Staphylococcus aureus é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos gram-positivos, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção como espinhas, furúnculos e celulites ou infecções graves como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia etc (DOS SANTOS et al., 2017).

5.2.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, que habitam normalmente no intestino humano e de alguns animais. Nem todas as cepas de *E. Coli* são inofensivas, certos tipos são nocivos e causa uma gastroenterite com intensa diarreia com muco, semelhante ao catarro ou sangue, ou uma infecção urinária (MARIA et al., 2012)

3.5.3 Resistência Bacteriana

Segundo o Centro Europeu de Prevenção e Controle das Doenças (ECDC) cerca de 25.000 pessoas morrem de infecções causadas por bactérias multirresistentes por ano e acrescentou que esses microrganismos custam 1,5 bilhões de euros anualmente em serviços extras de saúde. Além disso, segundo a OMS, esses custos chegam a 35 bilhões de dolares por ano apenas nos Estados Unidos. A Aliança Mundial contra a Resistência Antibiótica (WAAR) estipula que os antibióticos podem perder sua eficácia completamente nos próximos cinco anos devido ao uso indiscriminado desses agentes terapêuticos, o que leva o desenvolvimento de cepas de bactérias resistentes a todos os antibioticos disponiveis no mercado. (RIOS et al., 2016)

Segundo a Anvisa (2017) as bactérias multirresistentes são definidas como microorganismos que são resistentes a várias classes de antimicrobianos. Os principais patógenos caracterizados como multirresistentes são:

- *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos;
- *Enterobactérias* produtoras de ESBL (beta-lactamase de espectro ampliado);
- *Enterococcus spp.* resistente a vancomicina (VRE);
- *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina ou meticilina (MRSA);
- Identificação de patógenos com novos mecanismos de resistência, não encontrados na microbiota da instituição.

As bactérias possuem um arsenal de mecanismos de resistência aos antibacterianos, podendo muitas vezes gerar falha terapêutica. Existe vários mecanismos de resistência bacteriana, que podem ser classificados em três tipos: primeiro, os microrganismos sintetizam enzimas capazes de degradar o antibiótico ou modificar grupos funcionais farmacologicamente importantes na estrutura; segundo, genes mutantes superexpressam proteínas transportadoras capazes de expulsar o fármaco para meio extracelular e, assim, mantem uma concentração insuficiente dentro da célula para bloquear as funções celulares; e por fim, a modificação da estrutura dos alvos macromoleculares do antibiótico e, com isso, afetando o reconhecimento do fármaco pelo alvo e diminuindo a sua potência (SILVEIRA et al., 2006).

3.5.4 Técnica de Microdiluição

O método de microdiluição é usado amplamente nos dias atuais na pesquisa da atividade *in vitro* de novos antimicrobianos. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições sucessivas, com os objetivos de determinar a menor concentração capaz de inibir crescimento de um organismo, sendo essa concentração chamada de concentração inibitória mínima (CIM). Para realizar esse teste preparam-se várias placas com meio caldo ou ágar, aos quais são acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, as placas são inoculadas com uma suspensão padrão do organismo a ser testado. Após incubação overnight a 35 °C examinam a CIM do agente. Esse parâmetro pode ser detectado tanto a “olho nu” ou através de aparelhos de leitura óptica (ALVES et al., 2008).

3.6 TESTE DE CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A membrana eritrocítica é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada por interações com drogas. O teste de hemólise *in vitro* é usado como método de triagem para toxicidade de substâncias estimando o dano, que podem induzir *in vivo*, nos eritrócitos. (PITA, 2010)

Vários estudos indicam que certos compostos, principalmente os isolados de plantas, tais como polifenóis, glicosídeos, saponinas e triterpenoides podem causar alterações nas membranas das células vermelhas do sangue e, posteriormente, produzir hemólise. A partir deste fato, é possível inferir que a estabilidade mecânica da membrana dos eritrócitos é um indicador para avaliação da citotoxicidade de uma droga, fornecendo por meio de seus resultados indícios para uma possível toxicidade *in vivo* (SOUZA, 2013).

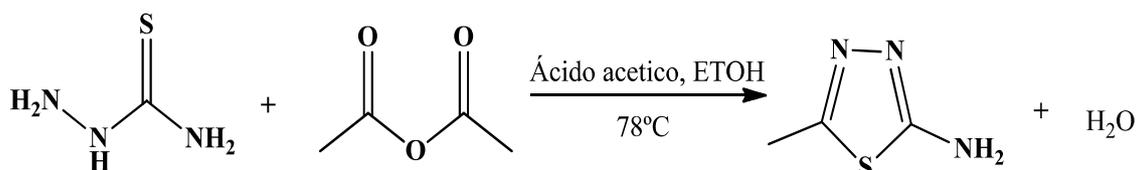
Agências regulatórias, a exemplo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomendam a realização de ensaios desta natureza para a aprovação de medicamento e principalmente em produtos cosméticos. O ensaio permite quantificar e avaliar os efeitos adversos dos componentes da formulação sobre a membrana plasmática das hemácias e a consequente liberação da hemoglobina (hemólise), sendo possível ser quantificada por espectrofotometria. A relação entre a hemólise e oxidação da hemoglobina fornece um parâmetro de caracterização dos efeitos dessas substâncias *in vitro* (BRASIL, 2003).

4. METODOLOGIA

4.1 SÍNTESE DO 5-METIL-2-AMINO-1,3,4-TIODIAZOL

Inicialmente foi sintetizado o núcleo 5-metil-2-amino-1,3,4-Tiodiazol (NL) a partir da condensação da tiossemicarbazida com anidrido acético com equivalência molar de 1:1, usando como catalisador o ácido acético (10 gotas) em meio etanólico (10,0 mL) na temperatura de 78°C em refluxo, como ilustrado no esquema 1. A reação foi acompanhada através de cromatografia em camada delgada (CCD), usando acetato de etila PA como a fase móvel. Após notar que os reagentes de partida não apareceram na placa cromatográfica, pois já foram consumidos, caracterizando o fim da reação. Em seguida o precipitado formado no meio reacional foi filtrado, secado em temperatura ambiente e por fim pesado.

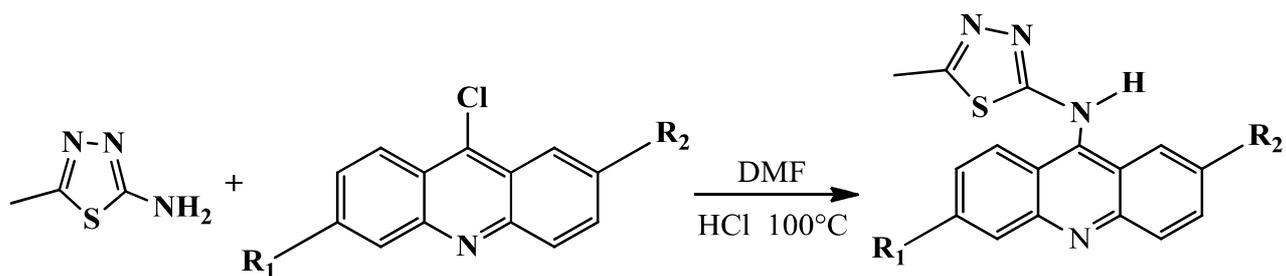
Esquema 1: Síntese do núcleo 5-metil-2-amino-1,3,4-Tiodiazol.



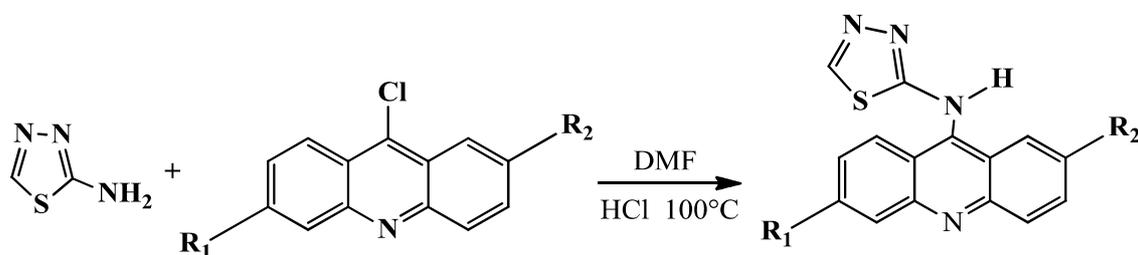
Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 SÍNTESES DOS DERIVADOS HÍBRIDOS ANILÍNICOS-ACRIDÍNICOS E SEUS BIOISOSTERES

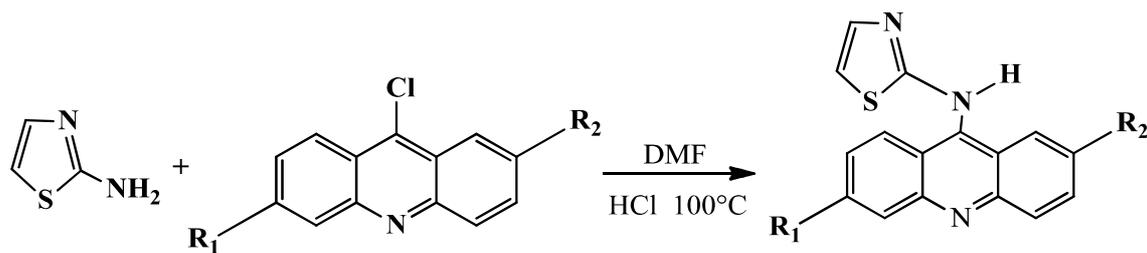
Foi realizado a condensação dos núcleos 5-metil-2-amino-1,3,4-Tiodiazol (esquema 2), 2-aminotiazol (esquema 3), 2-amino-1,3,4-Tiodiazol (esquema 4) e anilínico (esquema 5) com as acridinas através da substituição nucleofílica no aromático. No procedimento da síntese adicionou com um dos núcleos acima com a acridina na equivalência molar de 1:1, juntamente com ácido clorídrico (1 gota), usando como solvente o Dimetilformamida (DMF) sob refluxo a 100°C. A reação foi acompanhada através de cromatografia em camada delgada (CCD), usando hexano/acetato de etila (1:1) como a fase móvel. Após notar que os reagentes de partida não apareceram na placa cromatográfica, pois já foram consumidos, decretou o fim da reação. Em seguida o precipitado formado foi filtrado, secado em temperatura ambiente e pesado.

Esquema 2: Obtenção dos derivados no núcleo 5-metil-2-amino-1,3,4-Tiodiazol

Fonte: Elaborado pelo autor.

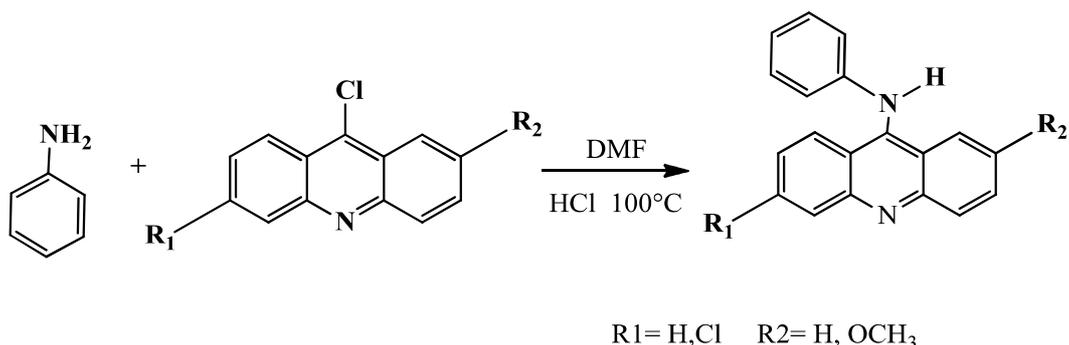
Esquema 3: Obtenção dos derivados núcleo 2-amino-1,3,4-Tiodiazol

Fonte: Elaborado pelo autor.

Esquema 4: Obtenção dos derivados no núcleo 2-aminotiazol

Fonte: Elaborado pelo autor.

Esquema 5: Obtenção dos derivados no núcleo anilínico



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 PROCEDIMENTO PARA O TESTE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.

A atividade hemolítica dos compostos foi realizada em eritrócitos humanos frescos (tipo A+). As células foram lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato e 100µl desta suspensão (1% hematócrito) e foi distribuído em cada cavidade de uma placa de 96 poços. Depois, com 100µl de cada composto sintetizado previamente dissolvido em uma solução tampão fosfato salino com 1% de DMSO. Foram testados em triplicata, adicionados à placa e incubadas durante 1 h. O ácido acético a 5% LT foi utilizado como droga hemolítica padrão. Após a incubação, as amostras serão centrifugadas (1500 rpm durante 10 min.), 100µl de cada sobrenadante será transferido para outra placa de microtítulo. A hemoglobina libertada será monitorizada através da medição da absorbância a 540 nm num espectrofotômetro. E será mensurada a partir da equação abaixo:

$$\% \text{hemólise} = \frac{\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco}}{\text{absorbância do controle da ácido acético a 5\% LT}}$$

Figura 8: Amostras na microplaca de 96 poços utilizada nos testes de hemólise.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 PROCEDIMENTO PARA O TESTE DE ATIVIDADE BACTERICIDA

4.4.1 Preparo das soluções a serem testadas

Para o preparo das soluções dos núcleos isolados e dos seus híbridos testados, pesou-se 0,02 g (20 mg) da molécula a ser testada e solubilizou-se em 2,0 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Para melhorar a solubilidade das moléculas no meio aquoso, adicionou-se três gotas de tween 20 obtendo a solução mãe na concentração de 10.000 µg/mL da molécula e 99,9% de DMSO.

Com o objetivo de diminuir a concentração do DMSO, pois o mesmo é considerado altamente tóxico para as células bacterianas em concentrações de igual ou acima 20%, foram preparadas outras três soluções. Na primeira solução (10.000 µg/mL da molécula e 99,9% de DMSO) retirou 1,00 mL dessa solução e adicionou-se 1,00 mL de água destilada estéril, tendo então a segunda solução na concentração de 5.000 µg/mL da molécula e o DMSO em 50%. Na terceira solução retirou 1,00 mL da solução anterior e adicionou 1,00 mL de água destilada estéril obtendo a solução estoque da molécula na concentração de 2.500 µg/mL e o DMSO em 25%. Já a diluição seguinte foi a preparação da solução teste, o qual se adicionou 1230 µL da solução estoque e 1770 µL de caldo Mueller Hinton, obtendo-se o volume de 3,00 mL, ficando o DMSO na concentração de 10% e a solução final na concentração de 2.048 µg/mL. Esta foi a solução utilizada para se realizar os testes em triplicata nas microplacas.

Também foi preparado solução estoque do antibiótico controle na concentração de 10.000 µg/mL, ao volume total de uma ampola de amicacina que tinha concentração de 50.000 µg/mL foi adicionado 8 mL de água destilada estéril obtendo-se assim a solução na concentração desejada. A partir desta, foi preparada a solução teste com 205 µL (0,205 mL) e 795 µL (0,795 mL) de água destilada estéril, de forma a se obter o volume desejado de 1 mL na concentração de 2.048 µg/mL.

4.4.2 Bactérias utilizadas

Foram realizados ensaios *in vitro* para os testes de avaliação da ação antibactericida dos compostos, averiguando a atividade dos núcleos isolados e dos seus derivados híbridos, frente as cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) da Coleção do Laboratório de Microbiologia de Resistência Microbiana Clínica e Contemporânea (LaRMiCC) do Centro de Ciências

Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba, determinando-se as concentrações inibitórias mínimas (CIM) através do método de microdiluição em caldo.

4.4.3 Cultura e preparo da suspensão bacteriana

Foi utilizado o método de suspensão direta de colônias proposta pelo CLSI M7-A6, 2012, após 24 horas de incubação a 35 ± 2 °C preparou-se o inóculo fazendo suspensão direta, em solução salina, a partir de colônias previamente isoladas em ágar Brain Heart Infusion (BHI). No dia do teste foi preparada uma nova suspensão em caldo BHI, ajustando-se a turbidez segundo a escala 0,5 de McFarland através da leitura em espectrofotômetro. A leitura foi realizada em comprimento de onda 625 nm, para que a solução viesse a apresentar uma variação de absorvância de 0,08 – 0,10%.

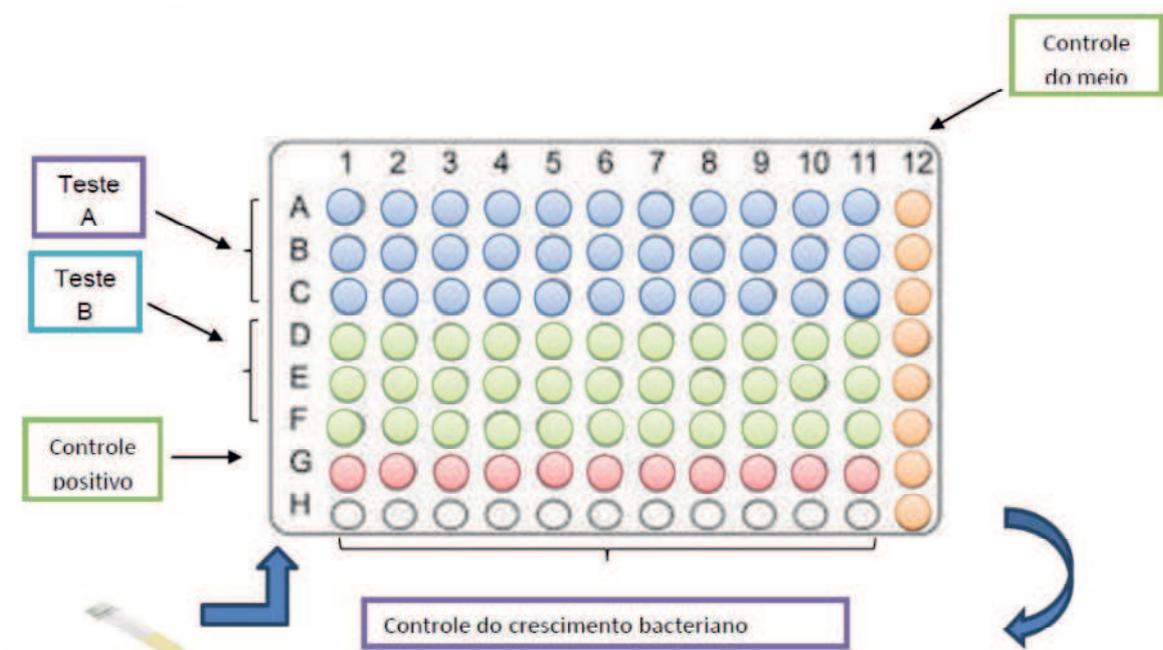
4.4.4 Testes de sensibilidade in vitro para bactérias

As concentrações utilizadas dos derivados compostos núcleos isolados e dos seus derivados híbridos testados variaram entre 1.024 e 1 µg/mL. O meio de cultura utilizado nos testes foi o Caldo Mueller Hinton (MH). A droga controle utilizada foi a amicacina® 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 µL de Caldo Mueller Hinton, em seguida foi adicionada 100 µL da solução teste no poço 12 das linhas A até F, seguindo então a homogeneização dentro do poço e retirada de 100 µL que foram transferidos para o poço vizinho, poço 11 da mesma linha, e assim sucessivamente até o poço 2. A concentração da molécula a ser testada ficou entre 1 a 1.024 µL, respectivamente da coluna 2 à coluna 12; foi realizado triplicata para cada molécula testada. A coluna 1 foi destinada ao controle de crescimento bacteriano. Foram adicionados ainda, 100 µl do antibiótico controle (amicacina®) do poço 12 da coluna G até o poço 4 da mesma linha, e do poço 12 da linha H até o poço 4 da mesma.

A concentração do antibiótico variou de 0,0078125 a 1024 µg/mL. Foram adicionados ainda 10 µL das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas, com exceção dos poços 1 da linha G e H, que foram destinados ao teste de esterilidade. Foram reservados ainda os poços 2 e 3 das linhas G e H para o controle negativo referente aos solventes.

Figura 9: Amostras na microplaca de 96 poços utilizada nos testes microbianos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

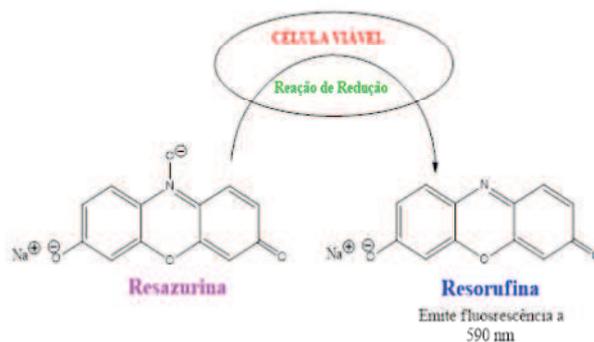
4.6.5 Leitura do Experimento

Após a realização dos experimentos e incubação da placa na estufa, por 20 ± 2 horas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$, adicionou-se $20 \mu\text{l}$ do corante resazurina na concentração de $0,010\%$ para facilitar a realização da leitura. Após o período de aproximadamente 4 horas, foi feita a leitura das placas, na qual a cor azul representava a ausência do crescimento bacteriano e a cor rosa o crescimento bacteriano (PALOMINO et al. 2002).

Para interpretar a atividade da amicacina®, que é o antibiótico controle, foi utilizado o Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST) 2017, que considera como sensível $\text{CIM} \leq 8 \mu\text{g/mL}$, intermediário $\text{CIM}=16 \mu\text{g/mL}$ e resistente $> 16 \mu\text{g/mL}$. Já o documento CLSI M100-S27 considera como sensível $\leq 16 \mu\text{g/mL}$, intermediário $= 32 \mu\text{g/mL}$ e resistente $\geq 64 \mu\text{g/mL}$.

A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-onda10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (PALOMINO et al. 2002). A forma reduzida é azul (não fluorescente/ célula não viável) e a forma oxidada é rósea (fluorescente/célula viável), conforme indicado na figura 1.

Figura 10: Reação de redução da Resazurina



Fonte: <http://www.sscdt.org/tuberculose/> Acessado em: 25/03/2018

4.5 ELUCIDAÇÕES ESTRUTURAIS

4.5.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para verificação das faixas de absorvância correspondente aos grupos funcionais presentes no derivado, a amostra foi analisada pela técnica de refletância total atenuada (ATR) na faixa espectral de 700 a 4000 cm^{-1} . Foi usada a balança analítica no modelo AUW220D-SHIMADZU, espectrofotômetro modelo SP-2000 UV, Spectrum e o espectrofotômetro de FTIR modelo IR Prestige-21, SHIMADZU-Japão.

4.5.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro: Bruker Avance 400 MHz e 100MHz, Ultrashield. Esses espectros foram obtidos no laboratório de síntese da UFPE.

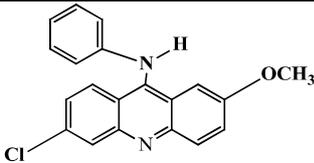
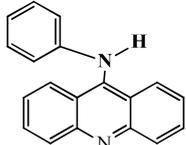
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS COMPOSTOS.

Os compostos sintetizados estão descritos com seu código, nome segundo a IUPAC e estrutura na tabela 1.

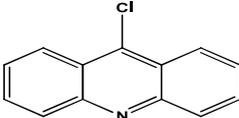
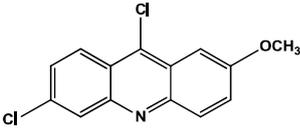
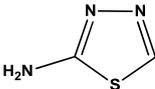
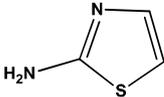
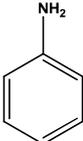
Tabela 1: compostos sintetizados com suas respectivas estruturas.

Código	Nome segundo a IUPAC	Estrutura
NL	5-metil-1,3,4-tiodiazol-2-amina	
LLAC01	<i>N</i> -(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)tiazol-2-amina	
LLAC02	<i>N</i> -(acridin-9-il)tiazol-2-amina	
LLAC03	<i>N</i> -(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-5-metil-1,3,4-tiodiazol-2-amina	
LLAC04	<i>N</i> -(acridin-9-il)-5-metil-1,3,4-tiodiazol-2-amina	
LLAC05	<i>N</i> -(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-1,3,4-tiodiazol-2-amina	
LLAC06	<i>N</i> -(acridin-9-il)-1,3,4-tiodiazol-2-amina	

LLAC07	6-cloro-2-metoxi- <i>N</i> -fenilacridina-9-amina	
LLAC08	<i>N</i> -fenilacridina-9-amina	

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Tabela 2: Estrutura dos núcleos usados nas reações

Código	Nome segundo a IUPAC	Estrutura
AC	9-cloroacridina	
ACMO	6,9-dicloro-2-metoxiacridina	
TIOD	1,3,4-tiodiazol-2-amina	
TIAZ	tiazol-2-amina	
ANL	anilina	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3: Propriedades físico-químicas dos compostos sintetizados.

Composto	Rendimento (%)	Log P	Rf	Peso molecular (g/mol)	Formula molecular	Faixa de fusão	Cor
NL	67,50	1,38	0,40 ^a	115,15	C ₃ H ₅ N ₃ S	310 - 312°C	Branco
LLAC01	86,74	5,15	0,60 ^b	341,04	C ₁₇ H ₁₂ ClN ₃ OS	ND	Laranja
LLAC02	57,78	4,72	0,60 ^b	277,34	C ₁₆ H ₁₁ N ₃ S	ND	Amarelo claro
LLAC03	69,20	5,58	0,60 ^b	356,83	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄ OS	ND	Amarelo
LLAC04	56,40	5,15	0,60 ^b	292,36	C ₁₆ H ₁₂ N ₄ S	ND	Amarelo claro

LLAC05	86,73	4,91	0,60 ^b	342,03	C ₁₆ H ₁₁ ClN ₄ OS	ND	Marrom
LLAC06	50,00	4,48	0,52 ^c	278,33	C ₁₅ H ₁₀ N ₄ S	330 – 334°C	Laranja
LLAC07	52,20	5,44	0,46 ^c	334,78	C ₂₀ H ₁₅ ClN ₂ OS	212 - 215°C	Amarelo queimado
LLAC08	83,46	5	0,50 ^c	270,32	C ₁₉ H ₁₀ N ₂	ND	Amarelo

Rend (%): Rendimento; Rf: Fator de Retenção; Log P: Coeficiente de Partição; ND: não determinado; a = Acetato de Etila; b = Hexano/Acetato de Etila(7:3) e Hexano/Acetato de Etila(8:2)

Fonte: Elaborado pelo Autor.

A tabela 3 mostra que todos os compostos obtiveram rendimentos satisfatórios, ou seja, maior que 50%, variando de 50 a 86,74%. As moléculas tiveram coeficiente de partição variando seu log P de 1,38 a 5,58. No entanto apenas os compostos NL, LLAC02, LLAC05 e LLAC06 obtiveram $\text{Log P} \leq 5$ e assim respeitaram a regra dos 5 de Lipinsk, que estima que valores iguais ou menores que 5 apresentaram uma boa biodisponibilidade *in vivo*. Esse grau de lipofilicidade já era esperado pelo fato da acridina isolada já contribuir com Log P de 3,51 e que mediante seu coeficiente de partição, uma alternativa seria a adição de radicais mais hidrofílicos nas estruturas com o intuito de diminuir sua lipofilicidade. (MENEGATTI; FRAGA; BARREIRO, 2001)

Referente aos pesos moleculares observou-se que os pesos da série LLAc variaram de 292,36 g/mol e 356,83 g/mol. O fator de retenção (Fr) variou de 0,46 a 0,6 nas fases móveis de hexano/acetato (7:3) e hexano/acetato (8:2)

Tabela 4: Resultados da solubilidade aparente dos compostos sintetizados.

Solventes /Compostos	Água Destilada	DMF	ETOH	DMSO	Aceta de Etila	Hexano
NL	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Insolúvel
LLAC01	Insolúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel
LLAC02	Insolúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel
LLAC03	Insolúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel
LLAC04	Insolúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel
LLAC05	Insolúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel
LLAC06	Insolúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel
LLAC07	Insolúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel
LLAC08	Insolúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Insolúvel	Insolúvel

DMF: Dimetilformamida; DMSO: Dimetilsulfoxido; ETOH: Etanol.

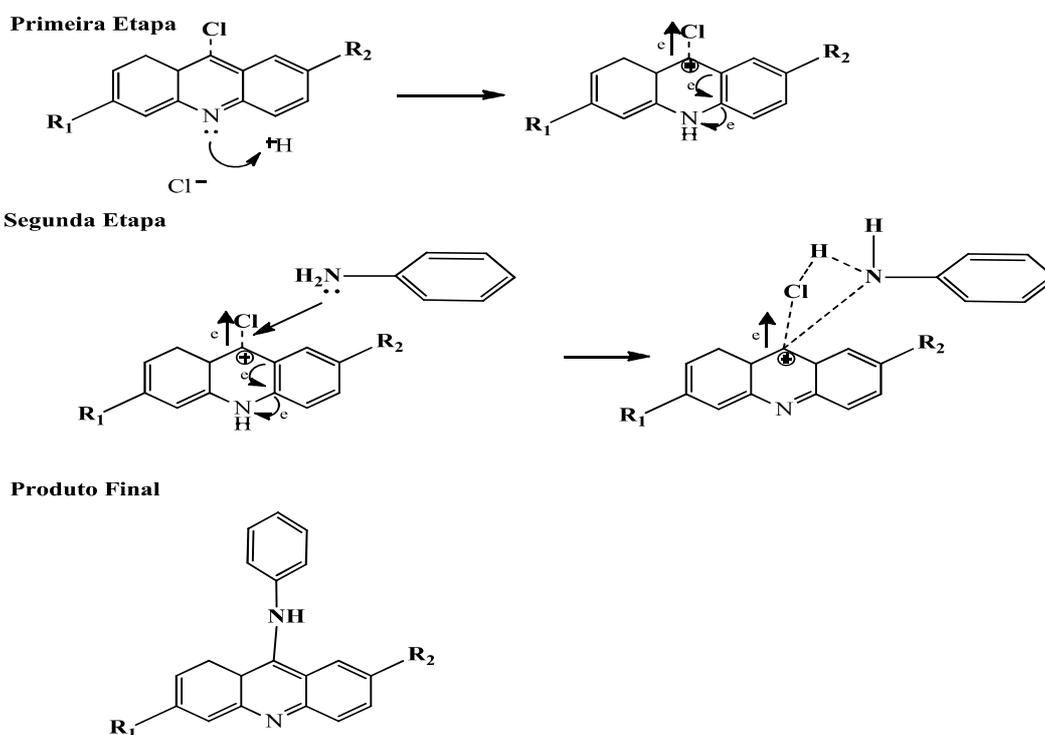
Fonte: Elaborado pelo autor.

Sobre a solubilidade dos compostos a tabela 4 mostra que o intermediário NL teve boa solubilidade nos solventes polares, devido ao seu $\log p$ 1,38 relativamente baixo e assim apresenta mais características polares. Compostos LLAC01, LLAC02, LLAC03, LLAC04, LLAC05, LLAC06, LLAC07 e LLAC08 tiveram solubilidade em quase todos os solventes exceto água, acetato de etila e hexano, esse resultado esperado pelo $\log P \geq 4,48$ e assim tem características mais apolares mais não o suficiente para ser solúvel em hexano que é um solvente bem mais apolar comparado com os outros.

5.2 POSSÍVEL MECANISMO DE REAÇÃO PARA A SÉRIE LLAC

Acreditasse que o mecanismo de reação seja através de substituição nucleofílica no aromático. Na primeira etapa o nitrogênio da acridina captura um H^+ (que veio da dissociação do HCl) e fica positivo fazendo com que os elétrons sejam convergidos para o N da acridina, tornando a posição 9 mais eletrofílica. Na segunda etapa a amina da anilina rica em elétrons (nucleofilo) ataque o carbono com carga parcial positiva e pobre em elétrons. Logo em seguida ocorre um estado de transição, onde o nitrogênio da amina está formando uma ligação com o carbono 9 eletrofílico e liberando H do nitrogênio da acridina, ao mesmo tempo, expulsa o cloro restaurando a ressonância. Com o fim do estado de transição institui o produto final.

Esquema 6: Mecanismo reação via S_NAr



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 ELUCIDAÇÕES ESTRUTURAIS

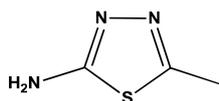
5.3.1 Elucidação Estrutural do intermediário do 5-metil-1,3,4-tiodiazol-2-amino (NL)

5.3.1.1 Espectroscopia de Infravermelho.

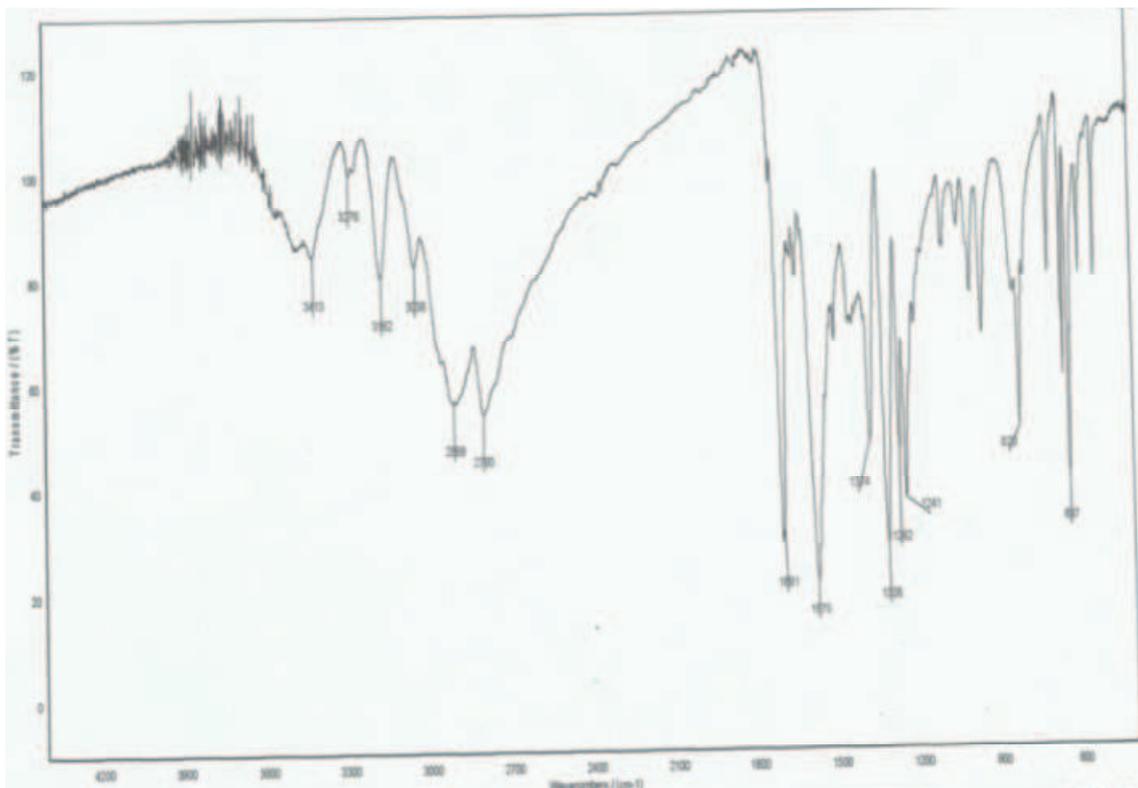
Na análise o espectro no infravermelho na figura 11 é possível sugerir que estrutura condiz com o que foi planejado, pois observa-se duas bandas de alta intensidade na região de 3162 cm^{-1} e 3036 cm^{-1} sugerindo a presença de amina primária, que é muito parecido com as bandas de amina primária observadas no IV do núcleo 1,3,4-tiodiazol-2-amino (figura 13) adquirido comercial, pela Sigma Aldrich. Assim, como a presença da absorvância em 1570 cm^{-1} , correspondente à deformação angular simétrica no plano causada por ligação NH_2 livre. Em 1374 cm^{-1} observa-se uma banda característica C-H de metila (CH_3) como também a presença de bandas nas absorvâncias de 2899 e 2793 cm^{-1} que reforçam a presença de ligação C-H na estrutura.

Em 3036 cm^{-1} visualizou-se uma banda fraca sugestiva ligação C-H de aromático que pode justificar a ocorrência de ciclização. Ressaltando que nos reagentes de partida (tiossemicarbazida e anidrido acético) não apresentam aromaticidade, e sim, estruturas alifáticas.

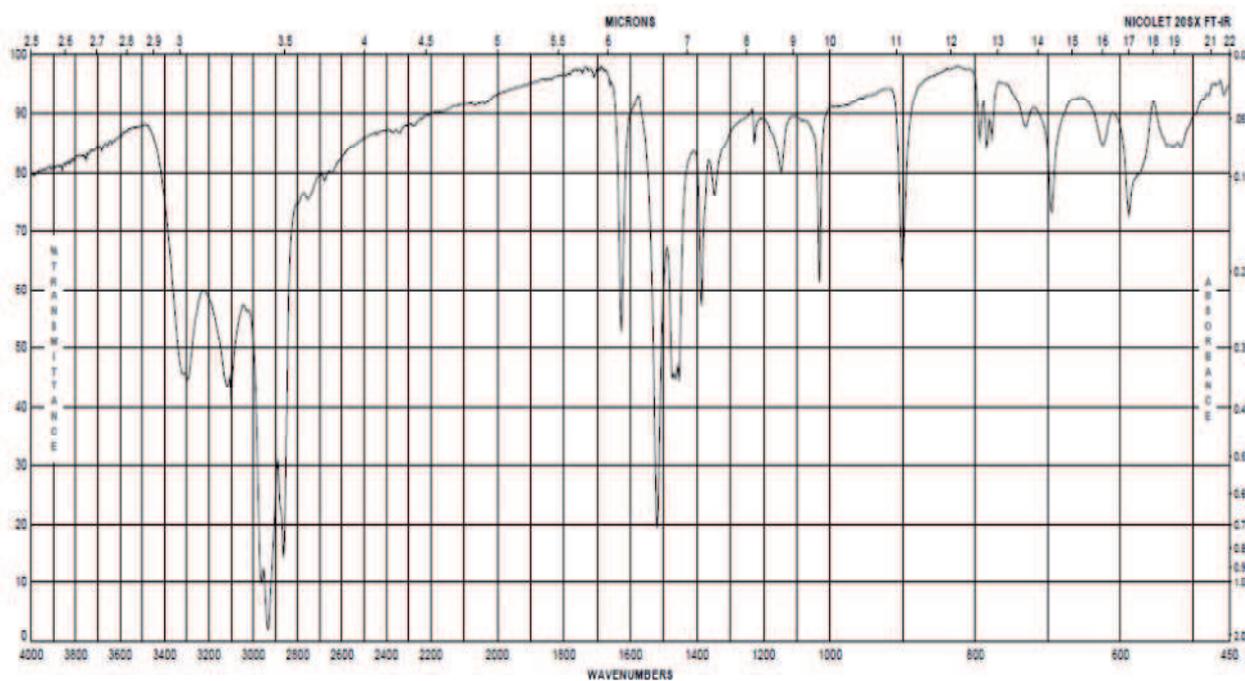
Figura 11: Estrutura do 5-metil-1,3,4-tiodiazol-2-amino



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12: Espectro de Infravermelho do 5-metil-1,3,4-tiodiazol-2-amino

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Figura 13: Espectro de infravermelho do 1,3,4-tiodiazol-2-amino

Fonte: Fornecido pela Sigma Aldrich.

Tabela 5: Tabela dos valores de absorvância encontrados no espectro de infravermelho do 5-metil-1,3,4-tiodiazol-2-amino

Absorvância de Referência	Absorvância Visualizada	Grupamento Funcional
3.400 - 3.100	3162 cm^{-1}	Aminas livres ligadas a anéis aromáticos
~ 3.030	3036 cm^{-1}	C-H presentes em aromáticos
2.960 - 2.850	2899 e 2793 cm^{-1}	C-H de metila
1.590 - 1.550	1570 cm^{-1}	NH ₂ livre
1500 – 1000 cm^{-1}	1348 cm^{-1}	Ligação C-N

Fonte: Elaborado pelo autor.

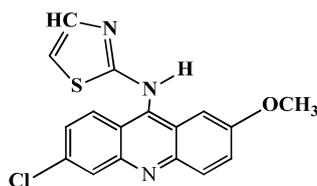
5.3.2 Elucidação Estrutural do LLAC01

5.3.2.1 Espectroscopia de Infravermelho

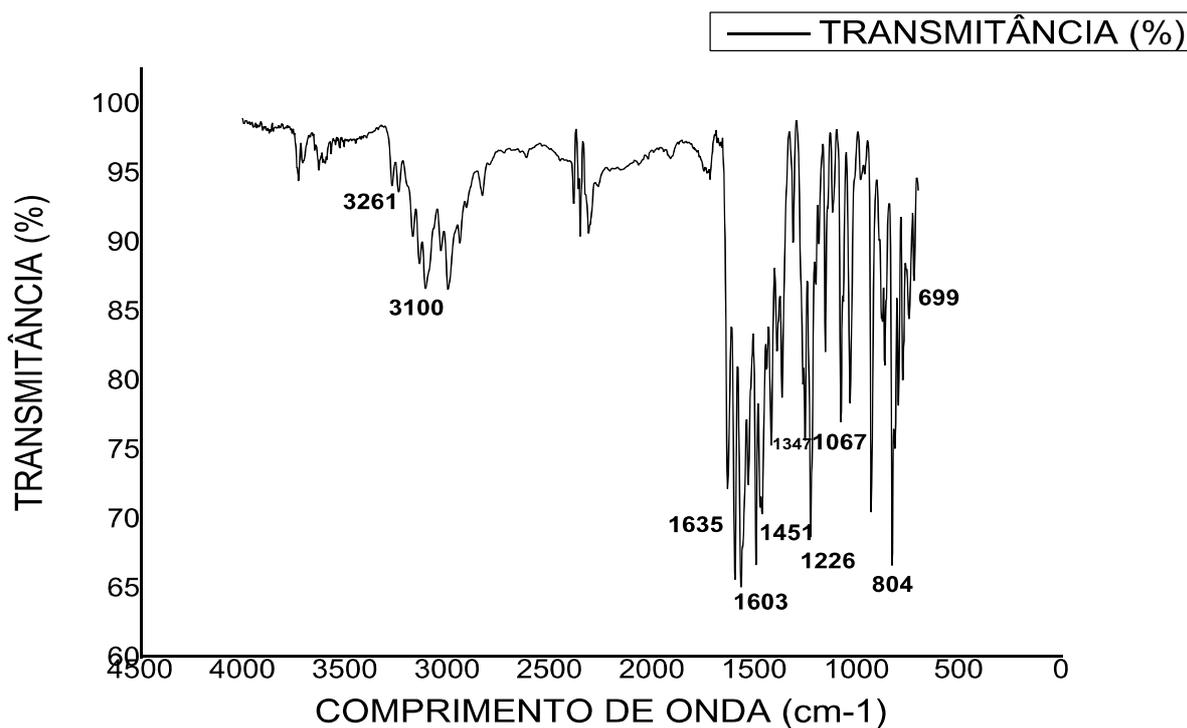
O espectro no IV da figura 14 sugere que a estrutura requerida foi sintetizada, pois apresenta bandas características de grupos funcionais específicos encontrados no composto LLAC01. Inicialmente observa-se uma banda em 3261 cm^{-1} que é sugestiva de amina secundária, sendo esse tipo de grupo funcional não se encontra presente nos reagentes de partida.

Foi observado ainda bandas entre 3000 a 3100 cm^{-1} e 1603 a 1451 cm^{-1} sugestivas de ligação C-H e C=C de aromáticos, respectivamente largamente encontrados na estrutura final. Além disso, foi visto uma banda de media intensidade em 1635 cm^{-1} , uma banda em 1347 cm^{-1} e outra em 699 cm^{-1} característica de ligação C=N (imina), de C-N e C-S, respectivamente, oque corrobora a porção tiazol da estrutura proposta.

Por fim, visualizou-se uma banda em 804 cm^{-1} sugestiva de ligação C-Cl e outra banda em 1226 cm^{-1} característica de ligação O-C de metoxila presente na acridina.

Figura 13: Estrutura do LLAC01

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14: Espectro de Infravermelho do LLAC01

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Tabela 6: Tabela dos valores de absorvância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC01

Absorvância de Referência	Absorvância Visualizada	Grupamento Funcional
3.450 a 3200 cm^{-1}	3200 cm^{-1}	Amina secundária
3100 cm^{-1} - 3100 cm^{-1}	3100 a 3000 cm^{-1}	C-H de aromático
2.960 - 2.850 cm^{-1}	2999 cm^{-1}	C-H de metila
1690 – 1630 cm^{-1}	1635 cm^{-1}	Ligação C=N
1600 – 1450 cm^{-1}	1603 a 1451 cm^{-1}	Ligação C=C de aromático
1500 – 1000 cm^{-1}	1347 cm^{-1}	Ligação C-N

1275 - 1200 cm^{-1}	1226 cm^{-1}	Ligação C-O (metoxila)
1020 – 1075 cm^{-1}	1067 cm^{-1}	Ligação C-O (metoxila)
800 – 700 cm^{-1}	806 cm^{-1}	Ligação C-Cl
700-600 cm^{-1}	699 cm^{-1}	Ligação C-S

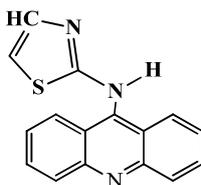
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 Elucidação Estrutural do LLAC02

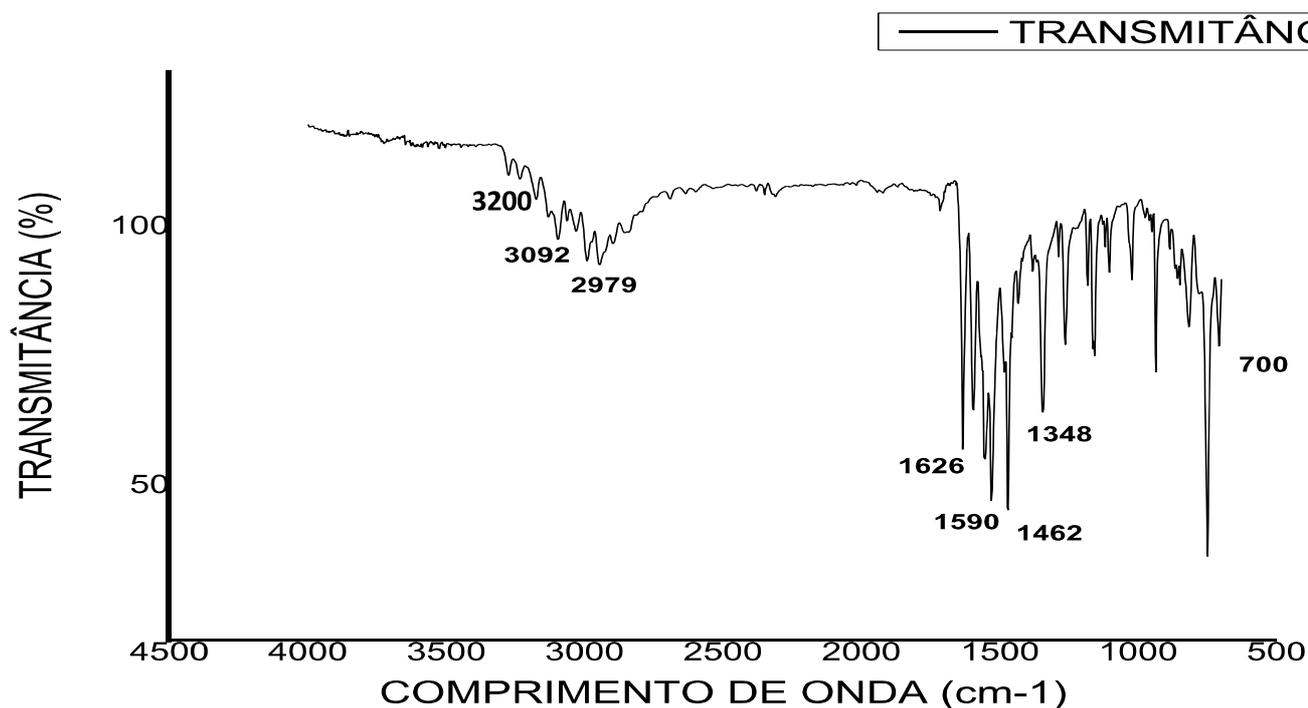
5.3.3.1 Espectrometria de Infravermelho

Através da análise de espectro de infravermelho do LLAC02 foi possível associar que a estrutura sintetizada é a requerida, pois apresenta bandas características dos grupos funcionais esperados. Primeiramente, observou-se uma banda de pequena intensidade na região de 3200 cm^{-1} sugestiva de amina secundária. Foram observados também bandas sugestivas de deformações axiais de C-H de aromático entre 3092 e 3000 cm^{-1} , assim como a presença de bandas C=C de aromático nas regiões de 1590 a 1462 cm^{-1} . Em 1626 cm^{-1} foi observado uma banda sugestiva de grupo imina, além de bandas em 1348 cm^{-1} e 700 cm^{-1} sugestivas de ligações C-N e C-S, respectivamente. Na porção acridínica da molécula verifica as ausências das bandas de absorção das metoxilas, sendo essa a principal característica que diferencia as estruturas LLAC01 e LLAC02.

Figura 15: Estrutura do LLAC02



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16: Espectro de Infravermelho do LLAC02

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7: Tabela dos valores de absorbância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC02

Absorbância de Referência	Absorbância Visualizada	Grupamento Funcional
3.450 a 3100 cm ⁻¹	3200 cm ⁻¹	Amina secundária
3100cm ⁻¹ a 3000 cm ⁻¹	3092 cm ⁻¹	C-H de aromático
1690 – 1630 cm ⁻¹	1626 cm ⁻¹	Ligação C=N
1600 – 1450 cm ⁻¹	1590 a 1462 cm ⁻¹	Ligação C=C de aromático
1500 – 1000 cm ⁻¹	1348 cm ⁻¹	Ligação C-N
700-600 cm ⁻¹	700 cm ⁻¹	Ligação C-S

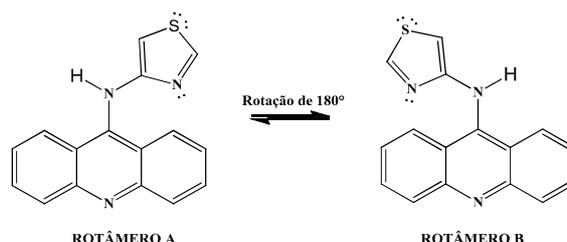
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3.2 Ressonância magnética de Hidrogênio e Carbono

Analisando os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C, observou-se que ocorreu duplicidade dos picos, provavelmente associado à presença de dois rotâmeros do composto LLAC02 que estão em equilíbrio, representadas na figura 17. A presença de rotâmeros deve-se ao fato dessa molécula não conseguir completar o giro sobre o

próprio eixo. Acredita-se que isso ocorra devido a impedimento estérico, ou seja, ao choque entre o orbital do nitrogênio imínico da porção tiazol com o orbital do hidrogênio, mais próximo, da porção acridínica, e assim o tendo uma rotação de 180°. Por isso, se faz necessária uma análise de RMN bidimensional para uma conclusão mais concreta.

Figura 17: Representação de rotâmetria do LLAC02



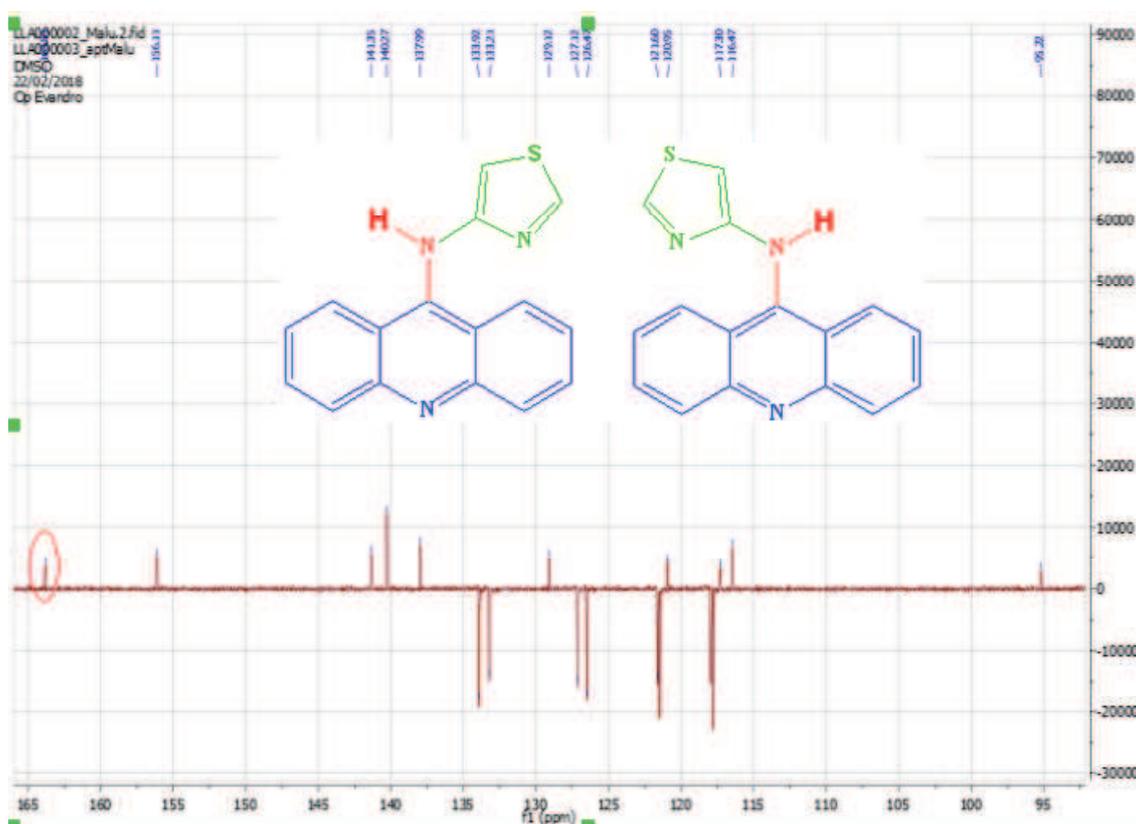
Fonte: Elaborado pelo autor.

O espectro da figura 19 referente ao RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) do primeiro rotâmero mostrou um pico em δH 11,74 (s,1H) sugestivo de hidrogênio de amina secundária. Foram vistos multipletos em δH 8,24 (m, 4H) e δH 7,72 (m, 4H) referentes aos hidrogênios das posições 8,7,6 e 5 do núcleo acridínico, além de sinais em δH 8,02 (m, 6H) e δH 7,63 (m, 6H) correspondentes aos hidrogênios das posições 1,2,3 e 4 do núcleo acridínica e os hidrogênios nas posições 11,12 da porção tiazol da molécula, respectivamente.

Para o segundo rotâmero observou-se mesmo padrão de deslocamentos das mesmas posições do primeiro rotâmero, sendo um singlete em δH 11,70 (s,1H) referente ao hidrogênio de amina secundária, um multiplete em δH 7,55 (m, 6H) e outro em δH 7,26 (m, 6H) que representam os quatro hidrogênios presentes na porção acridínico, como também multipletos em δH 7,50 (m, 6H) e δH 7,15 (m, 6H), que correspondem a seis hidrogênio, dentre os quais, quatro são para porção acridínica e dois porção tiazol da molécula.

Na análise do espectro de RMN ^{13}C na técnica APT do LLAC02 da figura 20, observou a presença de todos os dezesseis carbonos da estrutura esperada, destacando-se o sinal em 163,81, referente ao carbono amínico da posição 9. Notando que todos os carbonos foram considerados dessemelhantes entre si, ou seja, não ocorreu a simetria que é comum nos compostos que apresentam a acridina não substituída em sua estrutura, como observado no estudo de Machado 2016. Isso pode ser explicada pela presença dos rotâmeros que podem ter deixado esses carbonos em ambientes químicos distintos e com isso o aparelho os leu como diferentes entre si.

Figura 20: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO d) 100 MHz do LLAC02



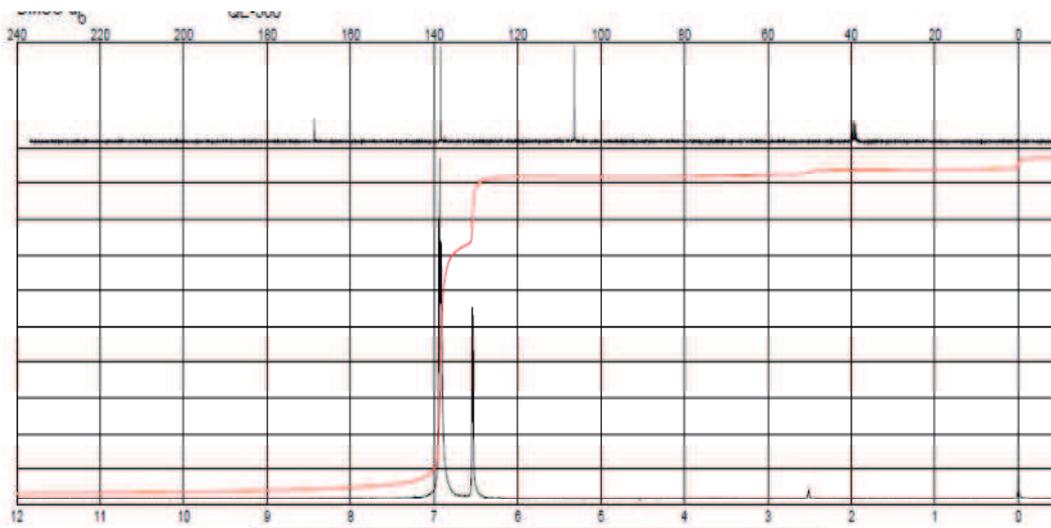
Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos compostos dos reagentes de partida, ou seja, 2-amino-tiazol (figura 21) e 9-cloroacridina (figura 22 e 23) fornecidos por Machado (2017) e pelo Sigma Aldrich respectivamente, apontam que a reação aconteceu, pois quando comparados com os espectros da LLAC02, mostram que apresentam deslocamentos muitos parecidos, porém com a presença de sinais característicos da reação de acoplamento, como o valor de NH.

Valores de deslocamento químico do N-(acrdin-9-il)tiazol-2-amina.

RMN ^1H δ 11,74; 11,70 (2s, 2H, NH) 8,24; 7,72 (2m, 4H, 4CH acridínico) 8,02; 7,63(2m, 6H, 4CH acridínico; 2CH tiazolinico); 7,55; 7,26; (2m, 4H, 4CH acridínico) 7,50; 7,15; (2m 6H, 4CH acridínico; 2CH tiazolinico).

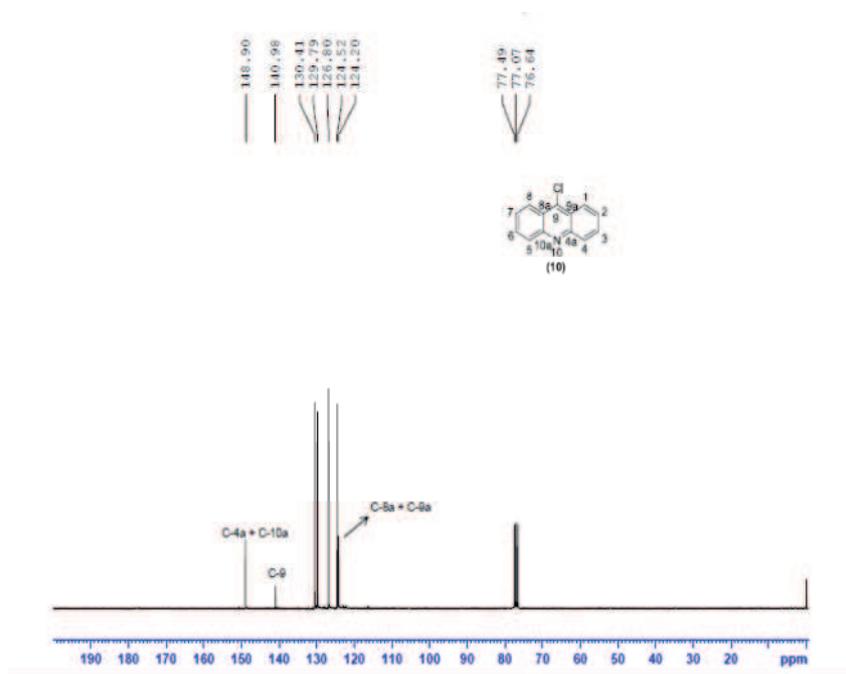
RMN ^{13}C δ 163.81, (C₉) 156.11(C₁₆), 141.35 (C₇), 141.35 (C₂), 140.27(C₁₁), 137.99(C₁₂), 133.92(C₆), 133.21 (C₃), 129.12(C₁), 127.12(C₄), 126.47(C₅), 121.60(C₁₀), 121.47 (C₈), 120.95(C₁), 117.97 (C₁₅), 117.79(C₁₃), 117.30(C₁₄).

Figura 21: Espectro de RMN ^1H e RMN ^{13}C (DMSO d_6) do 2-amino-tiazol



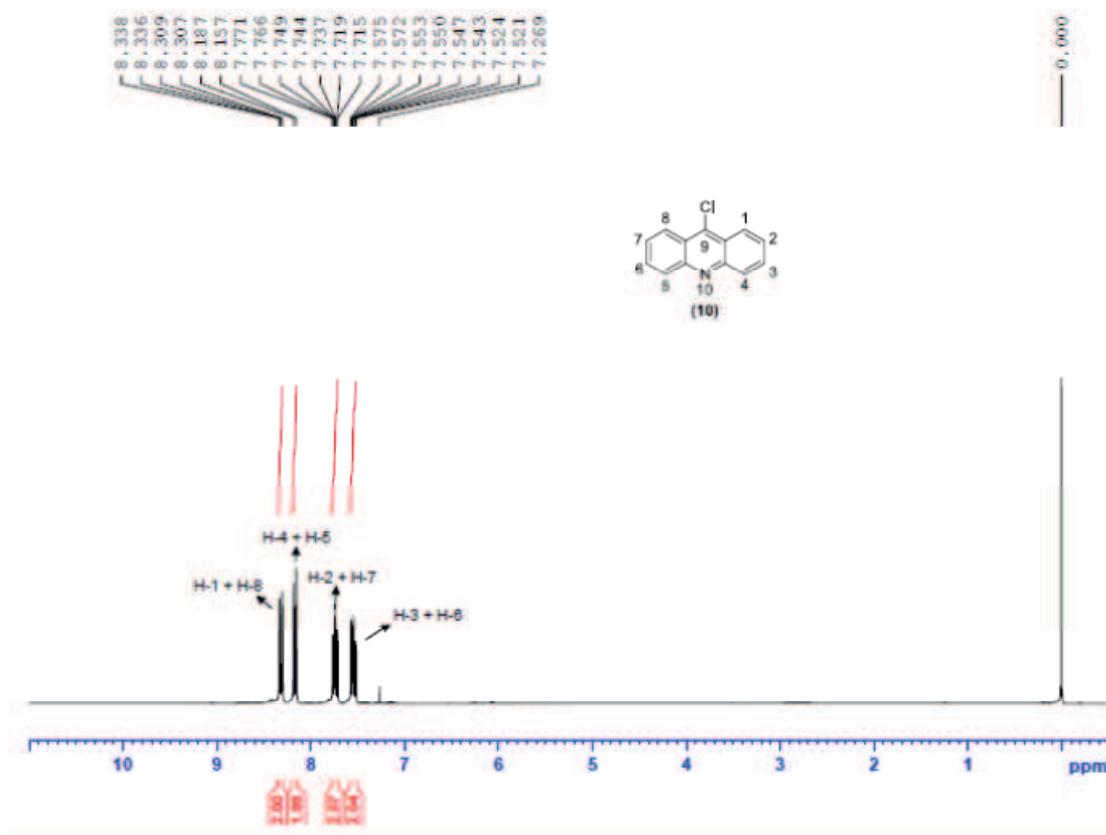
Fonte: Sigma Aldrich

Figura 22: Espectro do RMN ^{13}C (DMSO d_6) do 9-cloro-acridina



Fonte: MACHADO, 2017.

Figura 23: Espectro do RMN ^1H (DMSO d) do 9-cloro-acridina.



Fonte: MACHADO, 2017.

5.3.4 Elucidação Estrutural do LLAC03

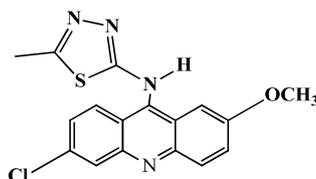
5.3.4.1 Espectroscopia de Infravermelho

Foi possível através da análise do espectro de infravermelho (figura 18) sugerir que o LLAC03 é a estrutura desejada, pois o IV mostra grupos funcionais característicos desse composto. Primeiramente nota-se uma banda de baixa na região de 3224 cm^{-1} que lembra sinais de amina secundária. Nota-se também estiramentos de ligação C-H de aromático nos comprimentos de 3000 a 3013 cm^{-1} , da mesma maneira, a presença de deformações axiais de ligação C=C de aromático nas regiões de 1559 a 1468 cm^{-1} , sendo essas bandas de aromáticos já esperadas na estrutura proposta.

A porção tiodiazol da estrutura desejada é confirmada pela presença de uma deformação axial sugestiva de imina (C=N) em 1613 cm^{-1} , do mesmo modo que uma banda na região de 1321 cm^{-1} que indica a ligação C-N, também observa estiramentos na região de 2960 cm^{-1} representativa para ligação C-H de metil, e por fim a percebe-se

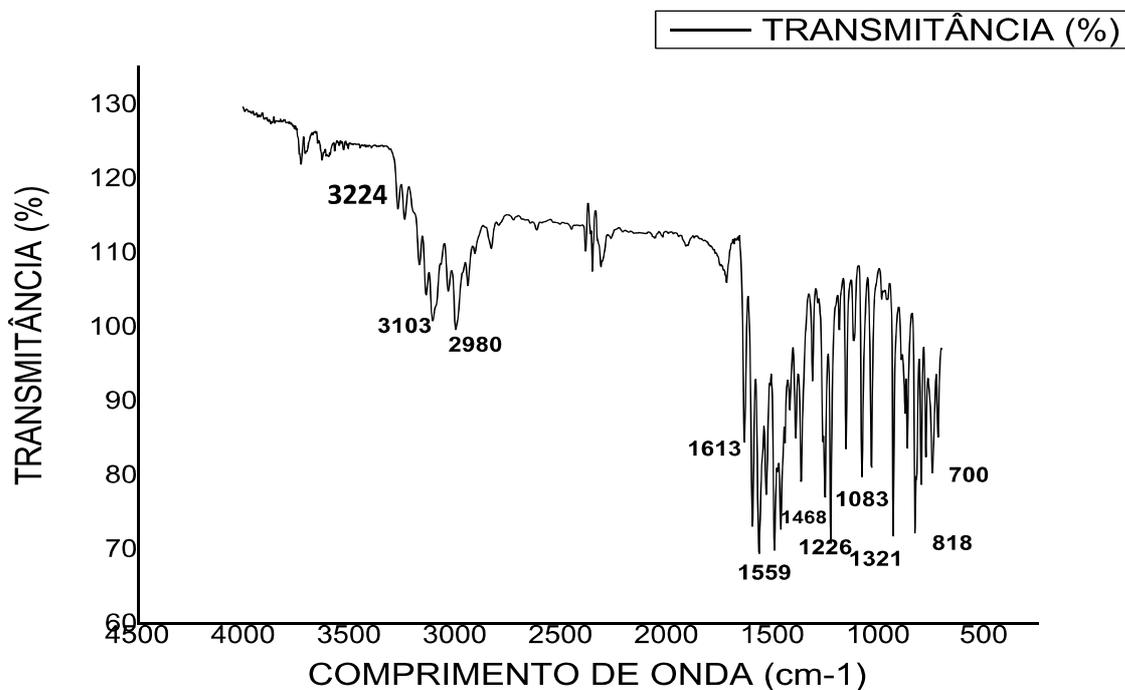
uma banda de baixa intensidade em 700 cm^{-1} que representa a ligação C-S, já esperada. O espectro mostra uma banda de media intensidade na região de 818 cm^{-1} que indica, possivelmente, a ligação C-Cl e as bandas em 1083 cm^{-1} e 1226 cm^{-1} que caracterizam a presença de metoxilas, tendo estes grupos funcionais presente na acridínica da molécula desejada.

Figura 24: Estrutura do LLAC03



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25: Espectro de Infravermelho do LLAC03



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8: Tabela dos valores de absorbância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC03

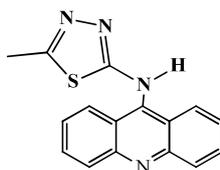
Absorbância de Referência	Absorbância Visualizada	Grupamento Funcional
3.450 a 3100 cm^{-1}	3224 cm^{-1}	Amina secundária
3100 cm^{-1} a 3000 cm^{-1}	3103 cm^{-1}	C-H de aromático
2.960 - 2.850 cm^{-1}	2980 cm^{-1}	C-H de metil
1690 – 1630 cm^{-1}	1621 cm^{-1}	Ligação C=N
1500 – 1000 cm^{-1}	1348 cm^{-1}	Ligação C-N
1600 – 1450 cm^{-1}	1559 a 1468 cm^{-1}	Ligação C=C de aromático
1275 - 1200 cm^{-1}	1226 cm^{-1}	Ligação C-O (metoxila)
1020 – 1075 cm^{-1}	1083 cm^{-1}	Ligação C-O (metoxila)
800 – 700 cm^{-1}	818 cm^{-1}	Ligação C-Cl
700-600 cm^{-1}	700 cm^{-1}	Ligação C-S

Fonte: Elaborado pelo autor.

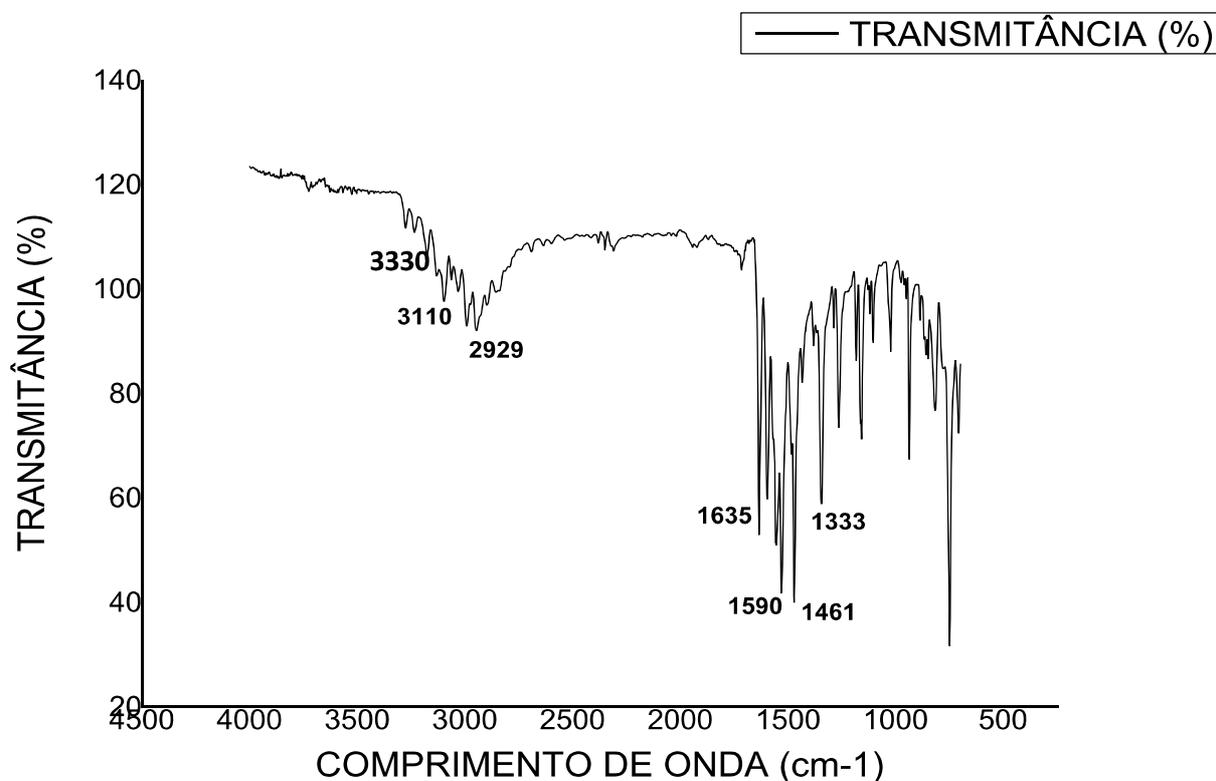
5.3.5 Elucidação Estrutural do LLAC04

5.3.5.1 Espectroscopia de Infravermelho

Grupos funcionais característicos do LLAC04 foram encontrados na análise de espectro de infravermelho da figura 21. Onde se observou a presença de bandas de baixa intensidade sugestivas de amina secundária encontradas na região de 3300 cm^{-1} . Da mesma forma a existência de ligações do tipo aromática, como no estiramento de ligação C-H de aromáticos entre 3000 e 3110 cm^{-1} e deformações axiais de ligação C=C de aromático nas regiões de 1590 a 1461 cm^{-1} . A porção tiodiazol da molécula é confirmada pela presença de banda de iminas (C=N) na região de 1635 cm^{-1} , existência de banda de ligação C-N em 1333 cm^{-1} e por fim o estiramento de C-H de metil na absorbância de 2929 cm^{-1} , assim como a ausência das bandas de metoxilas nas regiões de 1020 – 1200 cm^{-1} diferenciando as estruturas LLAC03 e LLAC04.

Figura 26: Estrutura do LLAC04

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 27: Espectro de Infravermelho do LLAC04

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10: Tabela dos valores de absorbância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC04

Absorbância de Referência	Absorbância Visualizada	Grupamento Funcional
3.450 a 3100 cm^{-1}	3330 cm^{-1}	Amina secundária
3100 a 3000 cm^{-1}	3110 cm^{-1}	C-H de aromáticos
2.960 - 2.850 cm^{-1}	2929 cm^{-1}	C-H de metil
1690 – 1630 cm^{-1}	1635 cm^{-1}	Ligação C=N
1600 – 1450 cm^{-1}	1590 a 1461 cm^{-1}	Ligação C=C de aromático
1500 – 1000 cm^{-1}	1333 cm^{-1}	Ligação C-N

Fonte: Elaborado pelo autor.

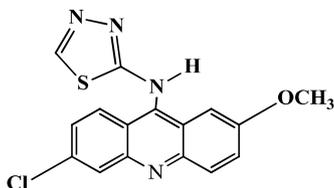
5.3.6 Elucidação Estrutural do LLAC05

5.3.6.1 Espectroscopia de Infravermelho

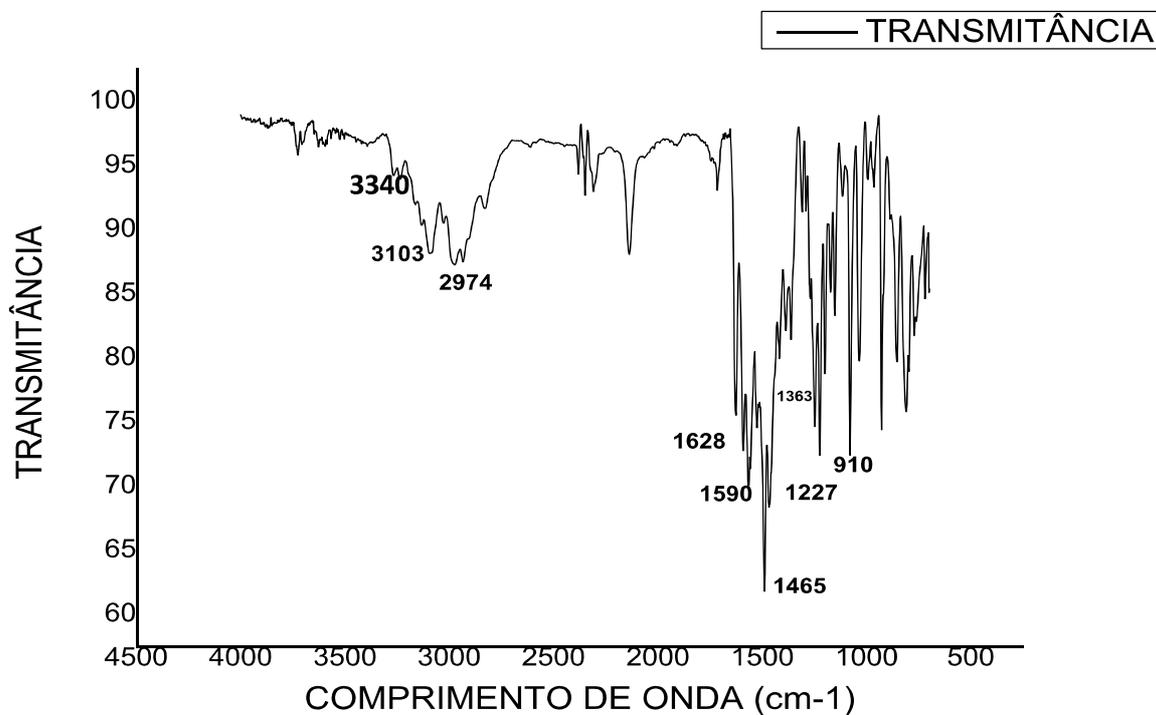
Observa mais uma vez o padrão de grupos funcionais, sugerido no espectro de infravermelho da figura 18, que condiz que se obteve a estrutura desejada. Nas áreas de maiores absorbâncias do espectro se constata a presença de uma banda de intensidade baixa na região de 3340 cm^{-1} sugerindo a presença de amina secundária, da mesma maneira a existência de estiramentos de C-H de aromáticos entre 3000 e 3103 cm^{-1} , sendo esses picos já esperados na estrutura do LLAC05.

No meio do espectro, inicialmente nota-se grupos funcionais presentes na porção tiodiazol como uma banda de intensidade media na região de 1628 cm^{-1} sugestivo de imina (C=N) e deformação axial na região de 1363 cm^{-1} que indica a ligação C-N. Descendo um pouco no espectro percebe deformações axiais entre 1590 a 1465 cm^{-1} de ligação C=C de aromático. Na parte final do espectro nota a existência de picos de metoxilas em 1227 cm^{-1} , deformação axial de baixa intensidade em 818 cm^{-1} sugestiva ligação C-Cl que estão presentes na porção acridínica da molécula.

Figura 26: Estrutura do LLAC05



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28: Espectro de Infravermelho do LLAC05

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 11: Tabela dos valores de absorbância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC05

Absorbância de Referência	Absorbância Visualizada	Grupamento Funcional
3.450 a 3100 cm^{-1}	3340 cm^{-1}	Amina secundária
3100 cm^{-1} a 3000 cm^{-1}	3103 cm^{-1}	C-H de aromáticos
1690 – 1630 cm^{-1}	1628 cm^{-1}	Ligação C=N
1600 – 1450 cm^{-1}	1590 a 1465 cm^{-1}	Ligação C=C de aromático
1400 – 1000 cm^{-1}	1363 cm^{-1}	Ligação C-N
1275 - 1200	1227 cm^{-1}	Ligação C-O (metoxila)
800 – 700 cm^{-1}	818 cm^{-1}	Ligação C-Cl

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.7 Elucidação Estrutural do LLAC06

5.3.7.1 Espectroscopia de Infravermelho

A partir da análise de espectro de infravermelho (figura 26) foi possível propor que se obteve a estrutura sintetizada. Pois a princípio verifica uma banda de intensidade baixa em 3365 cm^{-1} que é característica de amina secundária, do mesmo modo como estiramentos de ligação C-H de aromático entre 3000 e 3110 cm^{-1} e deformações axiais de ligação C=C de aromático entre 1575 e 1622 cm^{-1} que já eram esperadas, pois a estrutura terem anéis aromáticos com muitas ligações duplas.

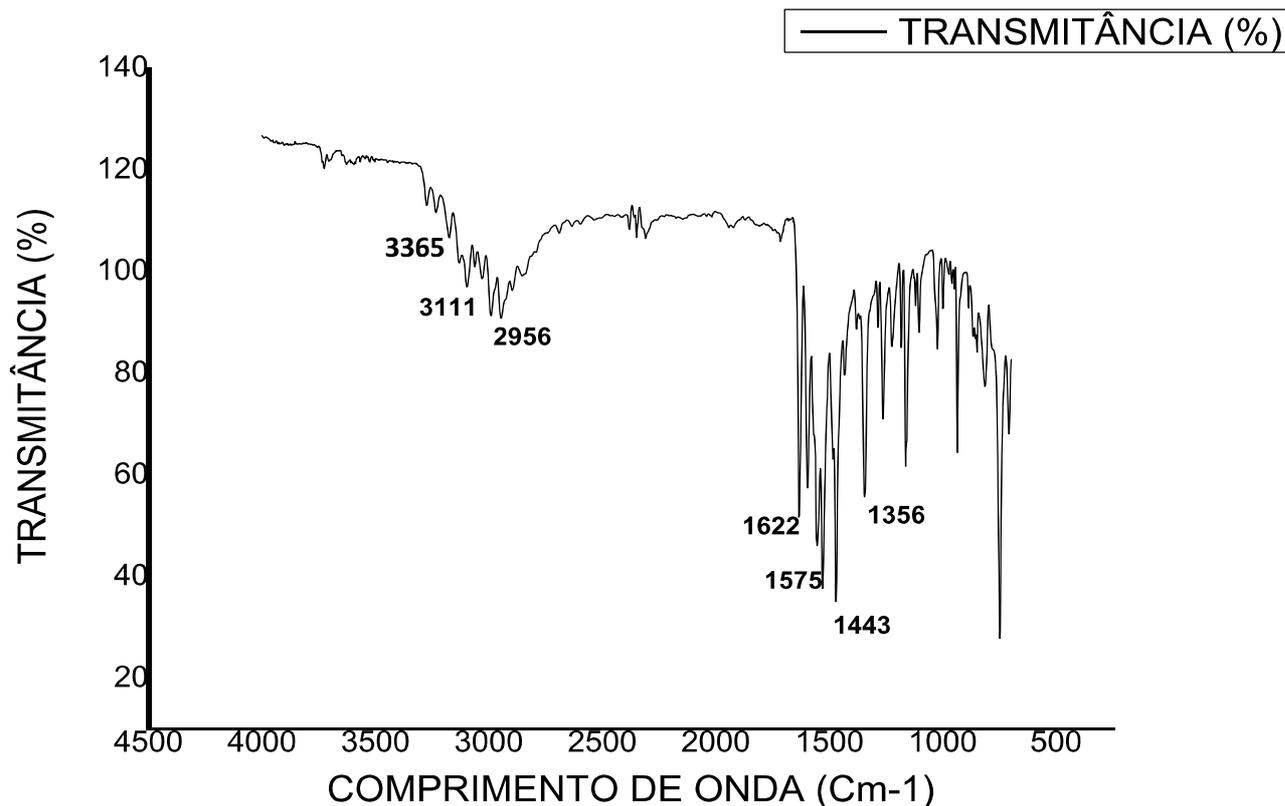
A absorvância banda em 1622 cm^{-1} característica de ligação tipo imina (C=N) como também deformação axial na região de 1413 cm^{-1} que indica a ligação C-N da estrutura proposta que esta presente porção tiodiazol. Como também foi confirmada nesse espectro a ausência das bandas de metoxilas que diferenciam os compostos LLAC05 e LLAC06.

Figura 29: Estrutura do LLAC06



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 30: Espectro de Infravermelho do LLAC06



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 11: Tabela dos valores de absorvância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC06

Absorvância de Referência	Absorvância Visualizada	Grupamento Funcional
3.450 a 3100 cm^{-1}	3365 cm^{-1}	Amina secundária
3100 a 3000 cm^{-1}	3111 cm^{-1}	C-H de aromáticos
1690 – 1630 cm^{-1}	1622 cm^{-1}	Ligação C=N
1600 – 1450 cm^{-1}	1575 a 1443 cm^{-1}	Ligação C=C de aromático
1500 – 1000 cm^{-1}	1356 cm^{-1}	Ligação C-N

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.8 Elucidação Estrutural do LLAC07

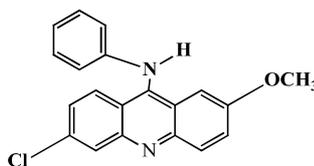
5.3.8.1 Espectroscopia de Infravermelho

O espectro de infravermelho (IV) da figura 26 sugere que a estrutura requerida foi sintetizada, pelo fato de apresentar bandas características para grupos funcionais específicos encontrados no composto LLAC07. Inicialmente se observa uma banda de

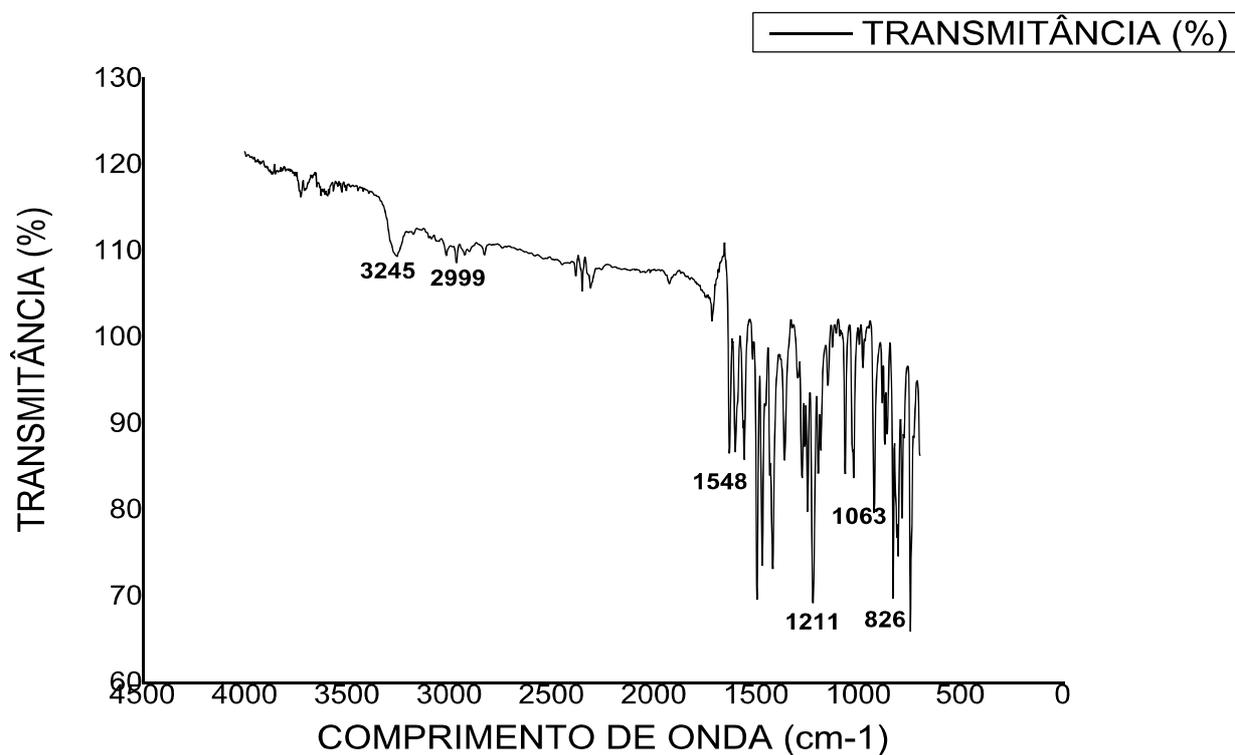
intensidade média na região de 3245 cm^{-1} de forma mais larga que é sugestiva de amina secundária ligada aromático, sendo esse tipo de ligação não esta presente nos reagentes de partida e sim formada a partir da reação química, como esperado.

O espectro mostra uma deformação axial de baixa intensidade na região de 826 cm^{-1} que indica, possivelmente, a ligação C-Cl assim como bandas em 1063 cm^{-1} e 1211 cm^{-1} que caracterizam a presença de metoxilas, tendo estes grupos funcionais presentes na porção acridínica. Mostra também absorbâncias entre 1500 e 1600 cm^{-1} que demonstra a presença de ligações C=C em aromáticos. Também se observa a absorbância de intensidade fraca na região 2980 cm^{-1} é caracteriza a existência de C-H de metilenos, porém bem menos significativo em relação aos outros compostos, sendo que provavelmente os anéis heterocíclicos podem influencia os sinais nessa região.

Figura 31: Estrutura do LLAC07



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 31: Espectro de Infravermelho do LLAC07

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 12: Tabela dos valores de absorbância encontrados no espectro de infravermelho do LLAC07

Absorbância de Referência	Absorbância Visualizada	Grupamento Funcional
3.450 a 3100 cm^{-1}	3245 cm^{-1}	Amina secundária
2.960 - 2.850 cm^{-1}	2999 cm^{-1}	Ligação C-H de metil
1600 – 1500	1548 cm^{-1}	Ligação C=C de aromático
1275 - 1200	1227 cm^{-1}	Ligação C-O (metoxila)
1020 – 1075 cm^{-1}	1063 cm^{-1}	Ligação C-O (metoxila)
800 – 700 cm^{-1}	826 cm^{-1}	Ligação C-Cl

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Testes Biológicos

5.4.1 Resultados dos testes microbiológicos

Os resultados da tabela 13 mostram que tanto os núcleos de partida como os derivados híbridos não apresentaram atividade antibacteriana significativa para as cepas de *E. coli* (gram negativa) e *S. Aureus* (gram-positiva). Esse resultado inesperado, contrariou a literatura, como nas revisões de Hu et al., e de SCHMIDT; LIU, 2015 que relatam atividade antibacteriana tanto de núcleos azo (tiazol e tiodiazol) e do núcleo acridínico, respectivamente.

Essa ausência de atividade pode ser explicada devido a baixa solubilidade dos compostos em água, pois mesmo com boa solubilidade em DMSO, quando as soluções entravam em contato com o meio de cultura (Agar Mueller Hinton) ocorria precipitação, então sugere que as moléculas não conseguiram exercer sua atividade.

Tabela 13: Resultados dos testes microbiológicos dos núcleos isolados e dos seus derivados híbridos.

Compostos Testados	<i>S. Aureus ATCC 25923</i> CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>E. Coli ATCC 25922</i> CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
AC	>1024	>1024
ACMO	>1024	>1024
TIOD	>1024	>1024
TIAZ	>1024	>1024
ANLA	>1024	>1024
NL	>1024	>1024
LLAC01	>1024	>1024
LLAC02	>1024	>1024
LLAC03	>1024	>1024
LLAC04	>1024	>1024

LLAC05	>1024	>1024
LLAC06	>1024	>1024
LLAC07	>1024	>1024
LLAC08	>1024	>1024

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.2 Resultado da avaliação preliminar da citotoxicidade através da atividade hemolítica

Usando o teste de hemólise foi possível ter uma avaliação preliminar da toxicidade dos compostos sintetizados. Utilizou as concentrações de $1000\mu\text{g mL}^{-1}$, $\mu\text{g mL}^{-1}$, e $250\mu\text{g mL}^{-1}$ que são relativamente altas, segundo Serafim (2014), para determinar se os compostos são capazes de quebrar as membranas celulares de forma significativa.

Tabela 14: Resultado dos testes de hemólise dos derivados sintéticos no sangue tipo A⁺.

Grau de Hemólise /Compostos	1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Hemólise (%) do LLAC01	30,40	19,80	14,33
Hemólise (%) do LLAC02	15,85	12,95	12,89
Hemólise (%) do LLAC03	17,17	14,69	14,66
Hemólise (%) do LLAC04	18,69	15,19	13,18
Hemólise (%) do LLAC05	14,58	13,66	12,75
Hemólise (%) do LLAC06	17,79	11,37	11,36
Hemólise (%) do LLAC07	13,94	13,03	11,84
Hemólise (%) do LLAC08	15,49	11,09	10,74
Liquido de Turk (Controle Positivo)	100,00	100,00	100,00

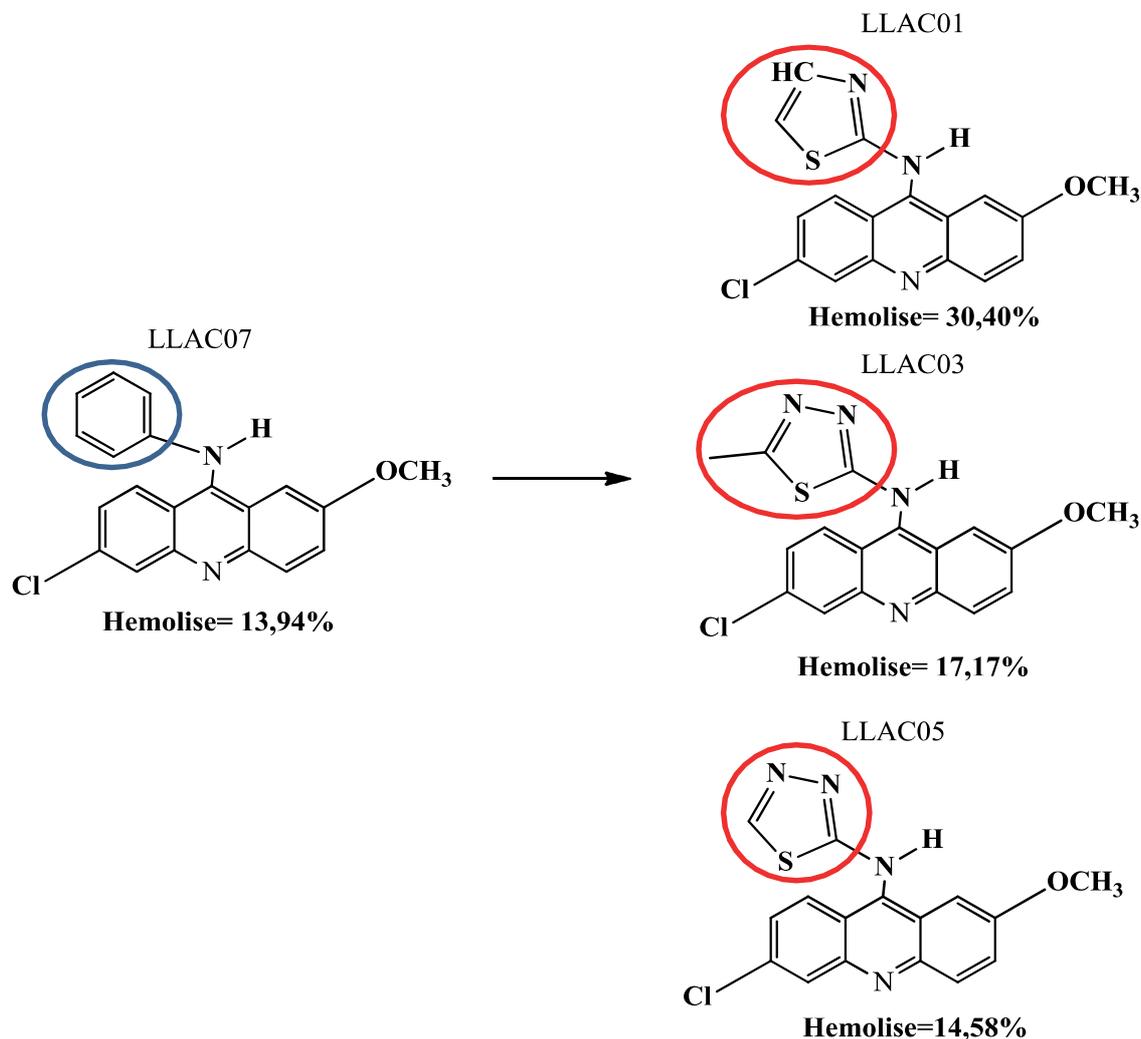
Fonte: Elaborado pelo autor.

Já se sabe pela literatura que acridinas e seus derivados tem um grande potencial antitumoral, por ser estruturas planares capazes de intercalar o DNA (ALMEIDA, 2015). Os testes de citotoxicidade *in vitro*, os quais direcionam a pesquisa para moléculas com potencial de matar células tumorais em cultura, são os mais amplamente utilizados. Esse tipo de análise, por ter condições de avaliar grande número de substâncias em pouco tempo, é uma técnica relativamente simples, barata, reprodutível e, ainda, auxilia na elucidação de um provável mecanismo de ação da droga (SOUZA, 2013).

Sobre a avaliação da citotoxicidade dos compostos foi possível verificar que as moléculas demonstraram atividade hemolítica, na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, variando de 15,49% a 30,40% (tabela 14 e 15). Sendo que todos os compostos, exceto o LLAC01, tiveram hemólise mediana mesmo em concentrações altas comparadas a outros estudos. Pois segundo o estudo, também utilizando derivados acridínicos, realizado por Serafim, 2014, que usou a concentração de $50\mu\text{g/mL}$, tiveram resultados semelhantes. Pelo fato das moléculas não causarem hemólise tão significantes (abaixo de 30%) demonstra que a atividade hemolítica das mesmas não é devido a danos de membrana.

Os resultados mostraram que os híbridos com heterocíclicos tiveram maior atividade hemolítica, no sangue A⁺ na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, em relação aos compostos com a anilina, sendo que híbrido com anel tiazol conjugado com a acridina clorada e metoxilada (LLAC01) teve maior citotoxicidade com 30,40%, seguido dos seus bioisosteres 5-metil-Tiodiazol (LLAC05) com 17,17% e Tiodiazol (LLAC03) com 14,58% como demonstrado na figura 32. Esse sugere que a atividade pode também associada a grupamentos de alquilícos pelo fato do LLAC01 ter um alceno e o LLAC05 ter um grupamento metil em suas estruturas.

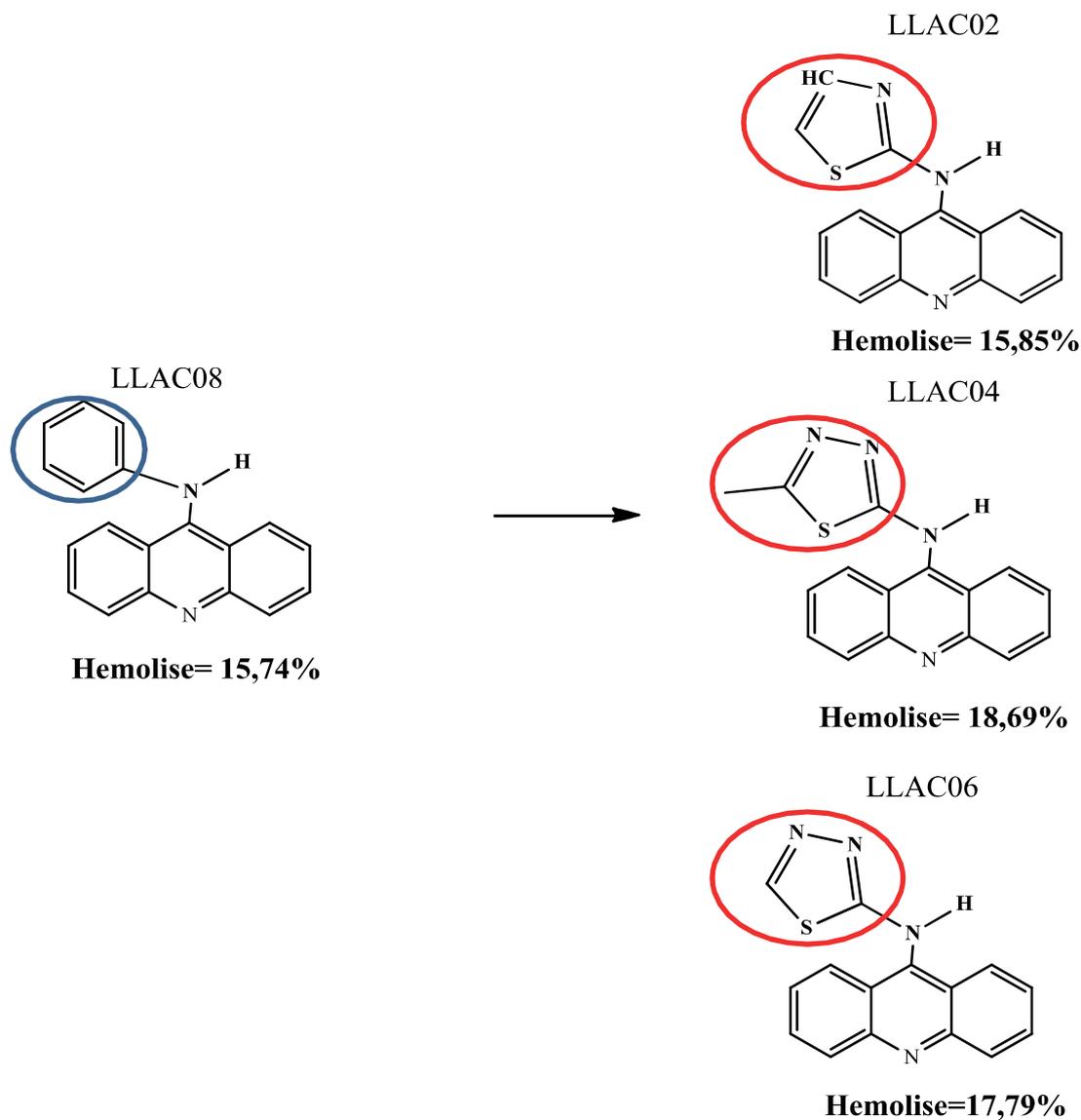
Figura 32: Ilustração da interferência da troca de anéis bioisosteres, na acridina clorada e metoxilada, na atividade hemolítica na tipagem A⁺.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como é ilustrada na figura 33, a atividade hemolítica no sangue A⁺ também na maior concentração (1000 µg mL⁻¹) dos derivados com porção acridínica sem o cloro e a metoxila tendo que híbrido com anel 5-metil-tiodiazol conjugado com a acridina teve maior citotoxicidade com 18,69%, seguido dos seus bioisosteres tiodiazol com 17,79% e tiazol com 15,85% apontando que a atividade esta associada com o aumento do coeficiente de partição. Também se nota os átomos de cloro e a metoxila podem favorecer uma maior hemólise do o bioisóstero tiazol, pelo fato de praticamente teve sua atividade dobrada, partindo de 15,85% para 30,40%.

Figura 33: Ilustração da interferência da troca de anéis bioisosteres, na acridina não substituída, na atividade hemolítica na tipagem A⁺.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6. CONCLUSÕES

Portanto, nessa pesquisa cumpriu o objetivo sintetizar nove moléculas, um intermediário e oito finais. Tendo todos os compostos rendimentos satisfatórios (acima de 50%) o que viabiliza as rotas sintéticas. Determinou-se suas características físico-químicas básicas como Log P, faixa de fusão, Rf, peso molecular, fórmula molecular e solubilidade em água e nos principais solventes orgânicos.

Foi possível analisar oito moléculas (NL, LLAC01, LLAC02, LLAC03, LLAC04, LLAC05, LLAC06, LLAC07,) através espectro de infravermelho onde percebeu a existências de absorbâncias características de grupos funcionais específicos. Na análise do espectro de RMN ^1H do LLAC02, observou a existências de multipletos em campo baixo que sugerem as ligações CH das estruturas aromáticas no RMN ^{13}C do mesmo composto, notou a presença de todos os dezesseis carbonos da estrutura desejada, destacando o carbono amínico que é resultante da ligação formada na reação. Porém ainda é necessário a realização as técnicas de espectrometria de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, dos outros compostos, para a caracterização total das estruturas.

Como também avaliar sua atividade citotoxicidade através dos testes de hemólise e atividade bactericida. Os testes de hemólise sugeriram que os compostos não apresentam citotoxicidade significativa, ou seja, não são capazes de romper as membranas plasmáticas das hemácias de forma significativa. Os testes antibactericidas mostraram que não teve atividade bactericida, provavelmente devido à dificuldade desolubilização dos compostos.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, E; MEYERS, A. I. Reinvestigation of a modified Hantzsch thiazole synthesis. **Tetrahedron letters**, v. 35, n. 16, p. 2473-2476, 1994.
- ALMEIDA, S. M. V. de. Síntese, elucidação estrutural, avaliação da interação com DNA, atividades antiproliferativa e anti-topoisomerase de novos derivados de Acridina. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE. 2015.
- ALVES, E. G. et al. 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.
- APAROY, P.; KUMAR REDDY, K.; REDDANNA, P. Structure and ligand based drug design strategies in the development of novel 5-LOX inhibitors. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 22, p. 3763-3778, 2012.
- ARANTES, F. S. **Comparação das duas principais rotas de obtenção do megazol**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2007.
- ARAÚJO, C. R. M. et al. Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual Scifinder®. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. S1-S9, 2015.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal-: As bases moleculares da ação dos fármacos. **Artmed Editora**, 2014.
- BAUMANN, M.; BAXENDALE, Ian R. A continuous flow synthesis and derivatization of 1, 2, 4-thiadiazoles. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n. 23, p. 6218-6223, 2017.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Guia para Avaliação e Segurança de Produtos Cosméticos. Brasília-DF, 2003.
- BrCAST. **Tabelas de ponto de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**; Norma aprovada. Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos, versão válida a partir de 13-03-2017. Documento baseado no EUCAST. 2017.

BURGER, A. **A guide to the chemical basis of drug design**. John Wiley & Sons Inc, 1983.

CARAMORI, G. F.; DE OLIVEIRA, K. T. Aromaticidade–Evolução histórica do conceito e critérios quantitativos. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1871-1884, 2009.

CERA, T. P.; PANCOTE, C. G. Planejamento de Fármacos. **Revista Científica Unilago**, p. 137-148, 2012.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grown Aerobically**; Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

DAI, Yujie et al. Computational study on fused five membered heterocyclic compounds containing tertiary oxygen. **Journal of Molecular Structure**, v. 1129, p. 98-104, 2017.

DAS, D.; SIKDAR, P.; BAIRAGI, M. Recent developments of 2-aminothiazoles in medicinal chemistry. **European journal of medicinal chemistry**, v. 109, p. 89-98, 2016.

DE BONA, E.a et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

DOS SANTOS, A. L. et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

EL-BEHAIRY, M. F. et al. Design, synthesis, and biological profile of novel N-(5-aryl-1, 3, 4-thiadiazol-2-yl) hydrazinecarboxamides. **European Journal of Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 488-496, 2014.

ERLANSON, D. A. Introduction to fragment-based drug discovery. In: **Fragment-based drug discovery and X-ray crystallography**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 1-32.

ERLANSON, D. A.; MCDOWELL, R. S.; O'BRIEN, T. Fragment-based drug discovery. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 14, p. 3463-3482, 2004.

FRIJA, L. MT; POMBEIRO, A. JL; KOPYLOVICH, M. N. Coordination chemistry of thiazoles, isothiazoles and thiadiazoles. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 308, p. 32-55, 2016.

GUERRERO, P. P. et al. Infecciones por enterobacterias. **Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 11, n. 55, p. 3276-3282, 2014.

GUIDO, R. VC; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GUIMARÃES, D. O. et al. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GÜR, M. et al. Synthesis, characterization, quantum chemical calculations and evaluation of antioxidant properties of 1, 3, 4-thiadiazole derivatives including 2-and 3-methoxy cinnamic acids. **Journal of Molecular Structure**, v. 1134, p. 40-50, 2017.

HU, Y. et al. 1, 3, 4-Thiadiazole: synthesis, reactions, and applications in medicinal, agricultural, and materials chemistry. **Chemical reviews**, v. 114, n. 10, p. 5572-5610, 2014.

HUANG, HJ. et al. Current developments of computer-aided drug design. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 41, n. 6, p. 623-635, 2010.

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

LIMA, Lídia M. Modern medicinal chemistry: Challenges and Brazilian contribution. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

MACHADO, R.I C.. Síntese, caracterização e avaliações biológicas de 4-piridinil, 7-cloro-4-quinolinil e 9-acridinil, semicarbazidas e tiosemicarbazidas. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora-Rj, 2016.

MAKHAEVA, G. F. et al. 9-Substituted acridinederivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors possessing antioxidant activity for Alzheimer's disease treatment. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2017.

MARIA, R. S. et al. Frequência de Escherichia coli e sua sensibilidade aos antimicrobianos em menores de cinco anos hospitalizados por diarreia aguda. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 12, n. 2, p. 173-182, 2012.

MELLO, J. et al. Heterociclos 1, 2, 3- triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 569-579, 2006

MENEGATTI, Ricardo; FRAGA, Carlos Alberto Manssour; BARREIRO, Eliezer J. A importância da síntese de fármacos. **Química Nova na Escola**, v. 3, p. 16, 2001.

MISHRA, C. B.; KUMARI, S.; TIWARI, M. Thiazole: a promising heterocycle for the development of potent CNS active agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 92, p. 1-34, 2015.

MONAIM, S. AH. A. et al. Teixobactin as a scaffold for unlimited new antimicrobial peptides: SAR study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2017.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología médica**. Elsevier Brasil, 2015.

OLIVEIRA, L. et al. Planejamento, síntese e atividade contra Trichomonas vaginalis de hidroxichalconas e ferrocenilchalconas. 2017.

PALOMINO, JC. et al. 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.

PANDEY, A. et al. Synthesis of Schiff bases of 2-amino-5-aryl-1, 3, 4-thiadiazole and its analgesic, anti-inflammatory and anti-bacterial activity. **Journal of Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 2524-2531, 2012.

PITA, J.C.L.R. Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do trachylobano-360 de Xilopia langsdorffiana St. Hil. & Tul.(Annonaceae). **Tese de Doutorado**. Programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João pessoa-PB. 2010

PUERTA-GARCÍA, A.; MATEOS-RODRÍGUEZ, F. Enterobacterias. **Medicine-Programa de Formação Médica Continuada Acreditado**, v. 10, n. 51, p. 3426-3431, 2010.

RADCHENKO, O. S. et al. Abnormal reactions of 2-methoxy-4, 9-dimethyl-1-nitroacridine with selenous acid and selenium (IV) oxide. Synthesis of 1H-selenopheno [2, 3, 4-k, l] acridine-1-one: A new seleno-containing ring system. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 209-214, 2011.

RICARDO, J. Substituição Nucleofílica Aromática em 1, 2-dicloro-4, 5-dinitrobenzeno com aminas. Trabalho de conclusão de curso submetido ao curso de Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina. 2006.

RIOS, Alessandra C. et al. Alternatives to overcoming bacterial resistances: state-of-the-art. **Microbiological research**, v. 191, p. 51-80, 2016.

SANGI, D. Estratégias De Síntese Na Descoberta De Fármacos: O Emprego Da Síntese Orientada Pela Diversidade Estrutural. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 995-1006, 2016.

SCHMIDT, A.; LIU, M. Recent advances in the chemistry of acridines. In: **Advances in Heterocyclic Chemistry**. v. 215. p. 287-353. 2015.

SERAFIM, V. L. Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica de potenciais fármacos antitumorais e antimaláricos de Derivados Acilidrazônicos-acridínicos. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, 2014.

SHAHCHERAGH, S. M; HABIBI, A; KHOSRAVI, S. Straight forward synthesis of novel substituted 1, 3, 4-thiadiazole derivatives in choline chloride-based deep eutectic solvent. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 9, p. 855-859, 2017.

SILVA, S. M. M. Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma Cerrado. **Dissertação de Mestrado** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade pela Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2014.

SOUSA, T. K. G. Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das folhas de *Croton grewoides* (Euphorbiaceae). **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Farmácia) da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2014.

SOUZA, M. V. N. et al. Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. **Química nova**, v. 28, n. 1, p. 78-83, 2005.

SVITKOVÁ, V. et al. Behaviour and detection of acridine-type DNA intercalators in urine using an electrochemical DNA-based biosensor with the protective polyvinyl alcohol membrane. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 2017.

YU, B. et al. Efficient synthesis of new antiproliferative steroidal hybrids using the molecular hybridization approach. **European journal of medicinal chemistry**, v. 117, p. 241-255, 2016.

ZHANG, J. et al. Synthesis and characterization of oxadisilole-fused acridines, dioxatrissilole-fused acridines and benzo [b] acridines. **Tetrahedron**, v. 70, n. 35, p. 5820-5827, 2014.