

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
AMINODERIVADOS DA 1,4-NAFTOQUINONA

CARLA CRISTINA DA SILVA

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE AMINODERIVADOS DA
1,4-NAFTOQUINONA**

CARLA CRISTINA DA SILVA

Sob a Orientação da Professora

Aurea Echevarria

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica-RJ

Agosto de 2018

S586s Silva, Carla Cristina da, 1988-
Síntese e atividade antibacteriana de
aminoderivados da 1,4-naftoquinona / Carla Cristina
da Silva. - 2018.
100 f.

Orientadora: Aurea Echevarria.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Química,
2018.

1. Síntese orgânica. 2. Naftoquinonas. 3. Atividade
antibacteriana. 4. Interação com soro albumina humana.
I. Echevarria, Aurea, 1950-, orient. II Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Química III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARLA CRISTINA DA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/08/2018

Aurea Echevarria. Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Maria Raquel Garcia Vega. Dra. UENF

Rosane Nora Castro. Dra. UFRRJ

Cleber Bomfim Barreto Jr. Dr. IFRJ

Marcia Cristina Campos de Oliveira. Dra. UFRRJ

Dedico este trabalho à minha família, ao Jefferson, companheiro de todas as horas e à minha orientadora, peça fundamental para o sucesso deste trabalho.

Agradecimentos

Agradeço a meus pais, Vanda e José Carlos, que nunca pouparam esforços para que meu caminho fosse o mais belo possível.

Aos meus irmãos Ricardo, Mayara, Junior, Larissa e Hugo, por todo o companheirismo de uma vida.

Aos sobrinhos amados Breno, Felipe, Luiza, Theo e Alice, que sempre alegram minha vida.

Ao meu namorado e companheiro da jornada da vida Jefferson, pelo apoio em todas as horas e pelo amor, sincero e suave.

Aos amigos de infância Bianca, Amanda, Mariana e Davi, irmãos que a vida me deu.

Aos companheiros de alojamento Sheyla, Ana Paula, Natali, David, Iana, Romário, Diego, Ramiro e Douglas, família que a Rural me deu.

À minha orientadora Aurea, por todo ensinamento, pelas palavras amigas e por ser exemplo a ser seguido.

Aos amigos do laboratório NUSQUIMED Danilo, Natalia, João Paulo, Cristiane, Lidia e Igor, que tornaram os dias de trabalho muito mais divertidos e que levarei para sempre em meu coração.

À minha amiga Paula, companheira de estudos, comilanças e confidências.

Ao amigo Otávio Chaves, por toda ajuda e todo apoio com os ensaios biológicos.

Aos professores do grupo NUSQUIMED Marcia Cristina e Claudio Eduardo, por toda ajuda, conselho e pela amizade.

Às pesquisadoras Rojane Paiva e Gisela Costa, do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção em Fungos do Instituto Oswaldo Cruz, pelo apoio com os ensaios biológicos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Química da UFRRJ.

À UFRRJ e à CAPES, por todo apoio financeiro.

SILVA, Carla Cristina da. **Síntese e atividade antibacteriana de aminoderivados da 1,4-naftoquinona**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química, Química Orgânica). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

RESUMO: As bactérias são seres unicelulares que podem ser encontradas sozinhas ou em colônias. No século XIX, cientistas começaram a associar algumas doenças à determinadas espécies de bactérias. Desde então os pesquisadores buscam compostos capazes de atuarem sobre essas espécies de bactérias e minimizar os efeitos de processos infecciosos causados por algumas delas e considerados graves. Foram descobertas diversas classes de compostos ao longo do século XX capazes de inibir o crescimento ou até mesmo de causar a morte de bactérias patogênicas. Porém, a grande capacidade destas bactérias de sofrer mutação levou ao surgimento de cepas resistentes a estas substâncias. Assim, o desenvolvimento de novos compostos com potencial antibacteriano é necessário. Diversos grupos de pesquisa tem desenvolvido novos protótipos à fármacos antibacterianos a partir de produtos naturais que já apresentam atividade biológica satisfatória, como as quinonas. Neste trabalho de dissertação foram sintetizados 11 compostos a partir da reação da 1,4-naftoquinona e 11 aminas diferentes. Os compostos obtidos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho e RMN ^1H e ^{13}C . Foram ensaiados 6 compostos para determinação da Concentração Inibitória Mínima frente a 4 cepas de bactérias Gram-positivas e 5 cepas de bactérias Gram-negativas. Dos compostos ensaiados, três mostraram-se ativos contra diversas bactérias, em concentrações que variaram entre 31,2 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Para os compostos que apresentaram melhor atividade antibacteriana foi testada a interação com a soro albumina humana, proteína presente em grande quantidade nos mamíferos superiores e responsável pelo transporte de moléculas biologicamente ativas. Os valores de K_{sv} e K_a obtidos indicam formação de interação moderada entre a HSA e os compostos ensaiados, garantindo biodisponibilidade satisfatória dos compostos no plasma sanguíneo. Assim, os resultados obtidos neste trabalho indicam que os amino-derivados da 1,4-naftoquinona sintetizados podem ser utilizados como potenciais agentes antibacterianos contra algumas espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Palavras-chave: naftoquinonas, atividade antibacteriana, soro albumina humana

SILVA, Carla Cristina da. **Synthesis and antibacterial activity of 1,4-naphthoquinones aminoderivatives**. 2018. Dissertation (Master Science in Chemistry, Organic Chemistry). Institute of Chemistry, Federal University Rural of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

ABSTRACT: Bacteria are unicellular beings that can be found alone or in colonies. In the 19th century, scientists began to associate some diseases with certain species of bacteria. Researchers have since sought compounds capable of acting on these species of bacteria and minimizing the effects of infectious processes caused by some of them and considered serious. Several classes of compounds have been discovered throughout the 20th century capable of inhibiting the growth or even causing the death of pathogenic bacteria. However, the large capacity of these mutated bacteria led to the emergence of strains resistant to these substances. Thus, the development of new compounds with antibacterial potential is necessary. Several research groups have developed new prototypes to antibacterial drugs from natural products that already have satisfactory biological activity, such as quinones. In this work 11 compounds were synthesized from the reaction of 1,4-naphthoquinone and 11 different amines. The compounds obtained were characterized by infrared and ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. Six compounds were tested for Minimum Inhibitory Concentration against 4 strains of Gram-positive bacteria and 5 strains of Gram-negative bacteria. Of the compounds tested, three were active against various bacteria at concentrations ranging from 31.2 to 250 $\mu\text{g} / \text{ml}$. For the compounds that showed better antibacterial activity, the interaction with human serum albumin, a protein present in large numbers in the higher mammals and responsible for the transport of biologically active molecules, was tested. The K_{sv} and K_a values obtained indicate moderate interaction formation between the HSA and the compounds tested, ensuring satisfactory bioavailability of the compounds in the blood plasma. Thus, the results obtained in this work indicate that the synthesized 1,4-naphthoquinone amino derivatives can be used as potential antibacterial agents against some species of Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Key words: naphthoquinones, antibacterial activity, serum human albumin

Lista de Abreviações

23SrRNA	gene codificador do domínio 23S da subunidade 50S do RNA ribossomal
Ab	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Aminoacil-tRNA	aminoácido ligado ao RNA transportador
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASB	albumina sérica bovina
ASH	albumina sérica humana
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	reflexão total atenuada (<i>attenuated total reflectance</i>)
Bc	<i>Bacillus cereus</i>
Bs	<i>Bacillus subtilis</i>
CAS	Chemical Abstracts Service
CCBH	Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar
CCD	cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CI ₅₀	Concentração para inibição de 50% das espécies
DL ₅₀	dose letal para 50% das espécies
DNA	ácido desoxirribonucleico
Ec	<i>Escherichia coli</i>
Ef	<i>Enterococcus faecalis</i>
ERO	espécies reativas de oxigênio
FAO	Organização para Alimentação e Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
gyr A	gene codificador da subunidade gyrA da DNA girase
HIV	vírus da imunodeficiência humana (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IV	infravermelho
Kp1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kp2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> β-lactamase positiva
MCF-7	linhagem de células de câncer de mama
<i>mecA</i>	gene codificador da proteína ligadora da penicilina
NAG	<i>N</i> -acetilglucosamina
NAM	ácido <i>N</i> -acetilmutâmico
NCI-H187	linhagem de células de câncer de pulmão
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pA297-3	plasmídeo A297-3
PABA	ácido <i>p</i> -aminobenzóico
PBP	proteína ligadora da penicilina (<i>penicilin binding protein</i>)
PBS	tampão fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDB	banco de dados de proteínas (<i>protein data bank</i>)
PF	ponto de fusão
PI3K	enzima fosfatidilinositol-3-quinase
<i>p</i> -INT	cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólio
pMG 252	plasmídeos de resistência às quinolonas pMG252

<i>qnr</i>	gene de resistência à quinolona (<i>quinolone resistance gene</i>)
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
RNA	ácido ribonucleico
RPP	proteínas de proteção ribossomal (<i>ribosomal protection protein</i>)
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>tet</i>	gene que codifica proteínas desmetilase da família TET
tRNA	RNA transportador
Trp	triptofano
UFC	unidade de formação de colônias
UV	radiação ultravioleta
UV-A	radiação ultravioleta tipo A
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

Lista de Tabelas

Tabela 1: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz e 125 MHz, ppm) para a 1,4-naftoquinona.....	23
Tabela 2: Rendimentos obtidos para os derivados aminados da 1,4-naftoquinona utilizando as metodologias 1, 2, 3, e aspectos físicos para os produtos obtidos.....	27
Tabela 3: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz, CDCl_3 , ppm) para o composto NQA	29
Tabela 4: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz, CDCl_3 , ppm) para os compostos NQB e NQK , respectivamente.....	31
Tabela 5: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz, CDCl_3 , ppm) para os compostos NQC e NQG , respectivamente.....	34
Tabela 6: Aspectos físicos, rendimentos e pontos de fusão dos compostos NQD , NQH , NQI e NQJ	36
Tabela 7: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz, CDCl_3 , ppm) para o composto NQF	38
Tabela 8: Valores de CIM dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona testados frente às nove cepas de bactérias.....	39
Tabela 9: Valores das constantes de ligação Stern-Volmer e constante de ligação modificada, K_{sv} e K_a , respectivamente, para os compostos NQA , NQC e NQG	43

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura dos fármacos antibacterianos salvarsan e proflavina.....	1
Figura 2: Estruturas dos principais compostos antibacterianos comerciais.....	3
Figura 3: Estrutura dos fármacos antibacterianos linezolida (oxazolidinonas) e daptomicina (lipopeptídeos).....	4
Figura 4: Principais fluoroquinolonas comercializadas.....	5
Figura 5: Estruturas básicas das quatro subclasses de β -lactâmicos comercializados.....	6
Figura 6: Distribuição de enzimas β -lactamases em células bacterianas (A) Gram-positivas e (B) Gram-negativas (ANVISA, 2007).....	7
Figura 7: Principais antibacterianos β -lactâmicos comercializados.....	8
Figura 8: Principais antibacterianos da série dos aminoglicosídeos comercializados.....	9
Figura 9: Estrutura do composto tetraciclina, que dá nome a série de antimicrobianos derivados da tetraciclina.....	9
Figura 10: Estrutura do macrolídeo eritromicina.....	10
Figura 11: Fórmula estrutural da linezolida.....	11
Figura 12: Estrutura do antimicrobiano cloranfenicol.....	12
Figura 13: Estruturas dos principais compostos antibacterianos da série das lincosamidas.....	12
Figura 14: Estrutura da daptomicina, antibacteriano da série dos lipodepsipeptídeos.....	13
Figura 15: Estruturas de alguns dos antibacterianos pertencentes à série das sulfonamidas.....	14
Figura 16: Estrutura do ácido nalidíxico, precursor da série das quinolonas.....	15
Figura 17: Estruturas básicas das quinonas.....	16
Figura 18: Estrutura da 1,4-naftoquinona.....	16
Figura 19: Estrutura da naftoquinona lapachol.....	17
Figura 20: Estruturas das naftoquinonas naturais rinacantina S, rinacantina A e rinacantina N isoladas da planta <i>Rhinacanthus nasutus</i>	17
Figura 21: Estruturas dos derivados do lapachol e lausona com atividade contra <i>T. cruzi</i>	18
Figura 22: Esquema de reação de obtenção da 1,4-naftoquinona a partir do naftaleno.....	22
Figura 23: Mecanismo da reação de obtenção da 1,4-naftoquinona a partir do naftaleno (Adaptado de JEONG et al., 2018).....	24
Figura 24: Esquema da reação de obtenção dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona.....	24
Figura 25: Estruturas dos produtos NQA-K sintetizados neste trabalho.....	25
Figura 26: Mecanismo da reação proposto para a obtenção dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona.....	26
Figura 27: Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para HSA livre e após adições sucessivas de NQA a pH = 7,4 e 310K. [HSA] = $1,00 \times 10^{-5}$ M, [NQA] = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15 e $1,32 \times 10^{-5}$ M. Inserção: Gráficos Stern-Volmer para HSA: NQA a 296 K, 303 K e 310 K.....	41
Figura 28: Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para HSA livre e após adições sucessivas de NQC a pH = 7,4 e 310K. [HSA] = $1,00 \times 10^{-5}$ M, [NQC] = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15 e $1,32 \times 10^{-5}$ M. Inserção: Gráficos Stern-Volmer para HSA: NQC a 296 K, 303 K e 310 K.....	41
Figura 29: Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para HSA livre e após adições sucessivas de NQG a pH = 7,4 e 310K. [HSA] = $1,00 \times 10^{-5}$ M, [NQG] = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15 e $1,32 \times 10^{-5}$ M. Inserção: Gráficos Stern-Volmer para HSA: NQG a 296 K, 303 K e 310 K.....	42
Figura 30: Aminas utilizadas na síntese dos aminoderivados da 1,4-naftoquinona.....	46

ÍNDICE DE ESPECTROS

ANEXO I – Espectro de RMN ¹³ C para o composto 1,4-naftoquinona.....	55
ANEXO II – Espectro de RMN ¹ H para o composto 1,4-naftoquinona.....	56
ANEXO III – Espectro de RMN ¹³ C para o composto NQA	57
ANEXO IV – Espectro de RMN ¹ H para o composto NQA	58
ANEXO V – Espectro de RMN IV para o composto NQA	59
ANEXO VI – Espectro de RMN ¹³ C para o composto NQB	60
ANEXO VII – Espectro de RMN ¹ H para o composto NQB	61
ANEXO VIII – Espectro de RMN IV para o composto NQB	62
ANEXO IX – Espectro de RMN ¹³ C para o composto NQC	63
ANEXO X – Espectro de RMN ¹ H para o composto NQC	64
ANEXO XI – Espectro de RMN IV para o composto NQC	65
ANEXO XII – Espectro de RMN ¹³ C para o composto NQD	66
ANEXO XIII – Espectro de RMN ¹ H para o composto NQD	67
ANEXO XIV – Espectro de RMN IV para o composto NQD	68
ANEXO XV – Espectro de RMN ¹³ C para o composto NQF	69
ANEXO XVI – Espectro de RMN ¹ H para o composto NQF	70
ANEXO XVII – Espectro de RMN IV para o composto NQF	71
ANEXO XVIII – Espectro de RMN ¹³ C para o composto NQG	72
ANEXO XIX – Espectro de RMN ¹ H para o composto NQG	73
ANEXO XX – Espectro de RMN IV para o composto NQG	74
ANEXO XXI – Espectro de RMN ¹³ C para o composto NQH	75
ANEXO XXII – Espectro de RMN ¹ H para o composto NQH	76
ANEXO XXIII – Espectro de RMN IV para o composto NQH	77
ANEXO XXIV – Espectro de RMN ¹³ C para o composto NQI	78
ANEXO XXV – Espectro de RMN ¹ H para o composto NQI	79
ANEXO XXVI – Espectro de RMN IV para o composto NQI	80
ANEXO XXVII – Espectro de RMN ¹³ C para o composto NQJ	81
ANEXO XXVIII – Espectro de RMN ¹ H para o composto NQJ	82
ANEXO XXIX – Espectro de RMN IV para o composto NQJ	83
ANEXO XXX – Espectro de RMN ¹³ C para o composto NQK	84
ANEXO XXXI – Espectro de RMN ¹ H para o composto NQK	85
ANEXO XXXII – Espectro de RMN IV para o composto NQK	86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. As bactérias	4
1.2. Principais classes de agentes antimicrobianos	6
1.2.1. β -lactâmicos	6
1.2.2. Aminoglicosídeos	8
1.2.3. Tetraciclinas	9
1.2.4. Macrolídeos	10
1.2.5. Oxazolidinonas	11
1.2.6. Glicopeptídeos	11
1.2.7. Cloranfenicol	11
1.2.8. Lincosamidas	12
1.2.9. Lipodepsipeptídeos	12
1.2.10. Sulfonamidas	13
1.2.11. Quinolonas e fluoroquinolonas	14
1.3. As quinonas	15
1.3.1. Atividades biológicas atribuídas às naftoquinonas	16
1.3.2. Síntese de derivados de naftoquinonas	18
1.4. Uso da albumina sérica bovina (ASB) e humana (ASH) em ensaios biológicos	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.1. Obtenção da 1,4-naftoquinona	22
3.2. Preparação dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona	24
3.2.1. Preparação e caracterização da 2-(benzilamino)-1,4-naftoquinona (NQA).....	27
3.2.1.1. Caracterização espectroscópica do composto NQA	28
3.2.2. Preparação e caracterização da 2-(fenetilamino)-1,4-naftoquinona (NQB) e da 2-(<i>p</i> -metóxfenetilamino)-1,4-naftoquinona (NQK).....	29
3.2.2.1. Caracterização espectroscópica dos compostos NQB e NQK.....	30
3.2.3. Preparação e caracterização dos compostos 2-[(2'-hidroxipropil)amino]-1,4-naftoquinona (NQC) e 2-[(1'-hidroxietil)amino]-1,4-naftoquinona (NQG).....	32
3.2.3.1. Caracterização espectroscópica dos compostos NQC e NQG	33
3.2.4. Preparação e caracterização dos compostos 2,2''-[etano-1',2'-diildi(amino)]-di-1,4-naftoquinona (NQD), 2,2''-[butano-1',2'-diildi(amino)]-di-1,4-naftoquinona (NQH),	

2,2''-[hexano-1',2'-di-ildi(amino)]-di-1,4-naftoquinona (NQI) e 2,2''-[octano-1',2'-di-ildi(amino)]-di-1,4-naftoquinona (NQJ).....	35
3.2.4.1. Caracterização espectroscópica dos compostos NQD, NQH, NQI e NQJ	36
3.2.5. Preparação e caracterização do composto 2-[(3',3'-difetilpropil)amino]-1,4-naftoquinona (NQF).....	37
3.2.5.1. Caracterização espectroscópica do composto NQF.....	37
3.3. Ensaio para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para bactérias	38
3.4. Estudo da interação entre a albumina sérica humana (ASH) e os amino-derivados da 1,4-naftoquinona	40
3.4.1. Ensaio de Supressão por Fluorescência	40
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	44
5. MATERIAIS E MÉTODOS	45
5.1. Equipamentos.....	45
5.2. Reagentes e solventes	45
5.3. Síntese	45
5.3.1. Obtenção da 1,4-naftoquinona	45
5.3.2. Preparação dos aminoderivados da 1,4-naftoquinona	45
5.3.2.1. Caracterização dos aminoderivados da 1,4-naftoquinona.....	46
5.4. Ensaios Biológicos	48
5.4.1. Ensaio para avaliação da atividade antibacteriana	48
5.4.1.1. Preparação e padronização dos inócuos.....	48
5.4.1.2. Determinação da concentração inibitória mínima para as bactérias (CIM)	49
5.4.2. Ensaio de interação entre albumina sérica bovina (ASB) e os aminoderivados da 1,4-naftoquinona biologicamente ativos	49
5.4.2.1. Estudo de fluorescência estacionária	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
7. ANEXO DE ESPECTROS	54

1. INTRODUÇÃO

As bactérias são seres unicelulares que foram descritos pela primeira vez no final do século XVII, após a descoberta do microscópio. Porém, somente no século XIX começou-se a observar que determinadas enfermidades estavam associadas a esses microrganismos. Na segunda metade do século XIX Robert Koch identificou os agentes causadores de doenças como a cólera, tuberculose e febre tifoide e, diversos pesquisadores iniciaram a busca por agentes químicos capazes de controlar a proliferação destes e de outros microrganismos causadores de vários processos infecciosos (GUIMARAES *et al.*, 2010).

A primeira definição para estes agentes foi descrita por Vuillemin, em 1889, que denominava o processo de antagonismo entre estas substâncias e alguns seres vivos como antibiose. Cerca de meio século depois, em 1942, o termo antibiótico foi descrito pela primeira vez por Waksman, como qualquer substância produzida por microrganismos que, em altas diluições, inibem ou levam à morte outros microrganismos. Atualmente, o significado de antibiótico foi redefinido, para incorporar também as substâncias sintéticas (GUIMARAES *et al.*, 2010).

De acordo com evidências históricas, algumas misturas como mel, ervas e até fezes de alguns animais eram utilizadas por civilizações antigas para o tratamento de infecções. Documentos de povos que viveram no Egito, China, Sérvia, Grécia e Roma citam a aplicação tópica do mofo de pão e seus benefícios para o tratamento de infecções superficiais. Mesmo substâncias mais modernas podem, também, ter sido utilizadas nas civilizações antigas. Traços de tetraciclina foram encontrados em esqueletos humanos que viveram durante a ocupação do Egito pelos romanos (GOULD, 2016).

Anos depois, após a descoberta do microscópio e início dos estudos sobre bactérias, Louis Pasteur e Robert Koch conseguiram estabelecer relação entre algumas doenças infecciosas e espécies de bactérias, através de propagação em animais e em culturas artificiais, iniciando, também, os estudos de substâncias para tratamento dessas doenças. Metais como arsênico, mercúrio e bismuto também foram testados com sucesso no tratamento de gonorreia e sífilis. Porém, o alto grau de toxidez destes metais fez com que os efeitos colaterais provenientes do uso destes se apresentassem mais graves do que os sintomas das próprias doenças (GUIMARAES *et al.*, 2010).

No início do século XX, Paul Ehrlich, conhecido como o pai da quimioterapia, desenvolveu o primeiro composto sintético usado no tratamento da sífilis, o salvarsan. Nos vinte anos que se seguiram, após a síntese do salvarsan, não existiram outros compostos para o tratamento de doenças infecciosas, até que em 1934 um novo fármaco antimicrobiano foi introduzido no mercado: a proflavina.

A proflavina, agente antibacteriano muito utilizado em ferimentos durante a Segunda Guerra Mundial, era muito tóxica e não podia ser utilizada em caso de infecções sistêmicas, o que evidenciou a necessidade de novos estudos, na tentativa de encontrar novas substâncias que pudessem combater esses microrganismos e que fossem menos agressivas ao hospedeiro. A figura 1 mostra a estrutura do fármaco proflavina.

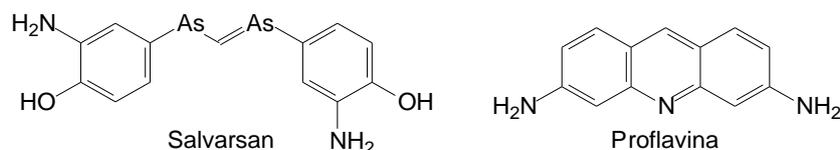


Figura 1: Estrutura dos fármacos antibacterianos salvarsan e proflavina.

Em 1935 o corante vermelho prontossil foi testado para infecções causadas por espécies de *Streptococcus* e apresentou resultados muito satisfatórios, dando início à síntese de uma classe de pró-fármacos que foi utilizada durante muitos anos: as sulfonamidas ou sulfas. Porém, as sulfonamidas tinham um espectro de ação limitado e abriram espaço para uma substância que já era conhecida desde 1929, mas que só foi incorporada à classe dos antimicrobianos em 1940: a penicilina. A maior efetividade da penicilina no tratamento de infecções bacterianas quando comparada às sulfas e o fato desta substância ser obtida a partir de fungos e isto motivou as pesquisas em torno de novos antimicrobianos (AMINOV, 2017).

Nos vinte anos que se seguiram, após a incorporação da penicilina como antimicrobiano, foram sintetizadas diversas classes de compostos para tratamento de doenças infecciosas a partir da triagem de produtos naturais oriundos de fungos, sendo a maioria deles eficientes contra bactérias Gram-positivas. São estas β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos e peptídeos, além de mais quatro compostos que não se enquadram nas classes citadas anteriormente (cloranfenicol, rifamicina, clindamicina e polimixina) e, três derivados sintéticos (isoniazida, trimetropim e metronidazol), como mostrado na figura 2 (AMINOV, 2017).

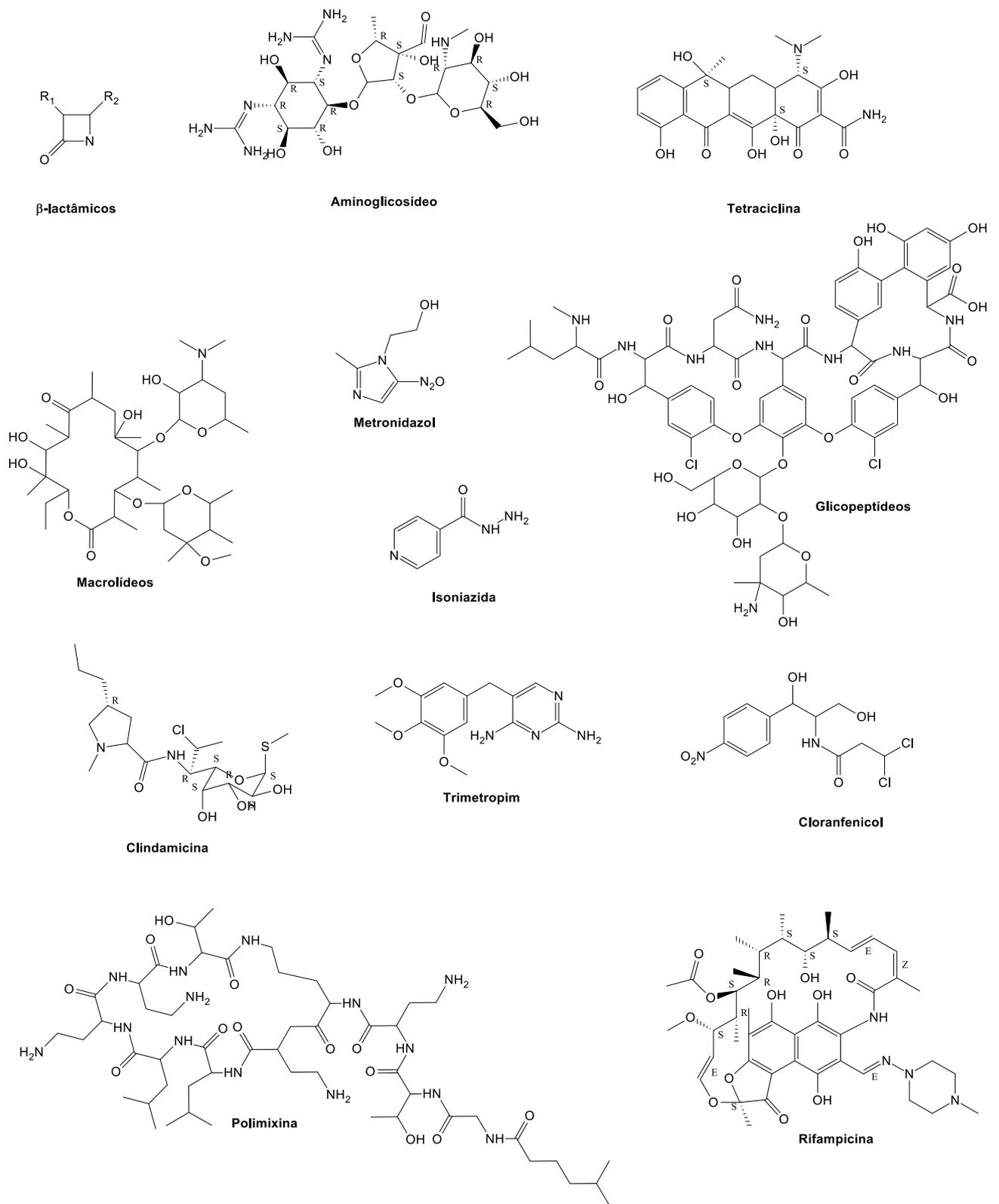


Figura 2: Estruturas dos principais compostos antibacterianos comerciais

Nos anos seguintes, os antimicrobianos desenvolvidos foram substâncias semissintéticas, obtidas principalmente a partir de modificações nas estruturas dos β -lactâmicos, tetraciclina e aminoglicosídeos.

O período entre 1980 e 2000 foi onde as bactérias adquiriram resistência à maioria dos fármacos tradicionalmente utilizados. Alguns autores afirmam que os antibióticos foram os fármacos mais utilizados e, também, os que foram empregados da pior forma. A consequência disto foi a emergência de bactérias resistentes aos fármacos antibióticos existentes, tornando necessário o desenvolvimento de novos compostos com atividade antibacteriana. Neste período foi desenvolvida uma nova classe de compostos sintéticos, as fluoroquinolonas, de grande importância para o tratamento de doenças infecciosas. A partir do ano 2000 somente dois compostos foram incorporados no mercado farmacêutico sendo um composto sintético, a linezolida, da classe das oxazolidinonas, e um composto de origem natural, a daptomicina, um lipopeptídeo (Figura 3) (GUIMARAES *et al.*, 2010).

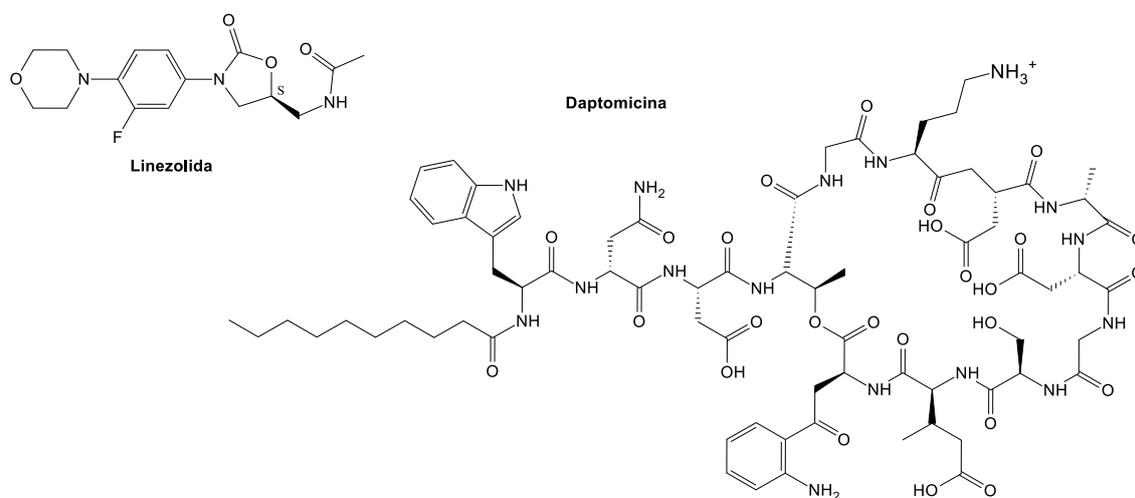


Figura 3: Estrutura dos fármacos antibacterianos linezolida (oxazolidinonas) e daptomicina (lipopeptídeos)

1.1. As bactérias

Bactérias são organismos unicelulares que podem ser encontrados sozinhos ou em colônias. São organismos procariontes que não possuem organelas membranosas e que apresentam parede celular composta por cadeias poliméricas formadas a partir de ligações cruzadas denominadas peptidoglicanos, que conferem alta rigidez e protegem a célula bacteriana de possíveis ataques de agentes físicos e químicos. Dependendo da composição e organização de suas paredes celulares, as bactérias podem ser classificadas como Gram-positivas ou Gram-negativas. A complexidade da organização das cadeias de peptidoglicanos e de outras moléculas presentes na estrutura da parede celular, resulta na fixação ou não-fixação do corante violeta cristal. Os agentes quimioterápicos interferem na atividade de enzimas transpeptidases e transglicosilases, interferindo na formação de ligações cruzadas entre os peptidoglicanos e comprometendo a rigidez da parede celular. Gale e Brown (2015) mapearam a biossíntese de peptidoglicanos e das cadeias de ácido tecóico, constituintes da parede celular bacteriana, identificando diversas enzimas envolvidas na polimerização destas cadeias que podem ser potenciais alvos para o desenvolvimento de novos compostos com atividade antimicrobiana.

O resíduo terminal D-alanina-D-alanina presente, sítio muito importante na formação da cadeia de peptidoglicanos, também é um alvo de grande interesse no desenvolvimento de potenciais agentes antimicrobianos. Interações com este resíduo

permitem a transferência do lipídio II do citoplasma para o espaço entre a parede celular e o glicocálice, onde proteínas transpeptidases irão polimerizar o lipídio II para formação dos peptidoglicanos. Além disso, a despolarização da membrana celular bacteriana, modo como a daptomicina atua, é um evento de mecanismo ainda pouco conhecido, mas que também tem se mostrado um potencial alvo para atividade antimicrobiana (SHARMA *et al.*, 2017).

As organelas não-membranosas presentes na célula bacteriana são compostas por diversos sítios que podem ser potenciais alvos para a ação de agentes antimicrobianos. Os ribossomos são estruturas essenciais para a célula bacteriana pois são responsáveis pela síntese de proteínas, mostrando-se um excelente alvo para o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos. Fármacos comerciais como das classes dos macrolídeos (atuam sobre a subunidade 50S ribossomal) e dos aminoglicosídeos (atuam sobre a subunidade 30S ribossomal), por exemplo, modificam a conformação destas subunidades, inibindo a síntese de proteínas bacterianas, levando a célula à apoptose (SINGH *et al.*, 2017).

Enzimas envolvidas na transcrição do DNA bacteriano também podem apresentar-se como ótimos alvos. As quinolonas e fluoroquinolonas são classes de compostos mais modernas utilizadas em clínica e inibem a atividade de enzimas topoisomerases, impedindo a replicação do DNA bacteriano. A figura 4 apresenta as estruturas dos principais antibacterianos comerciais da classe das fluoroquinolonas,

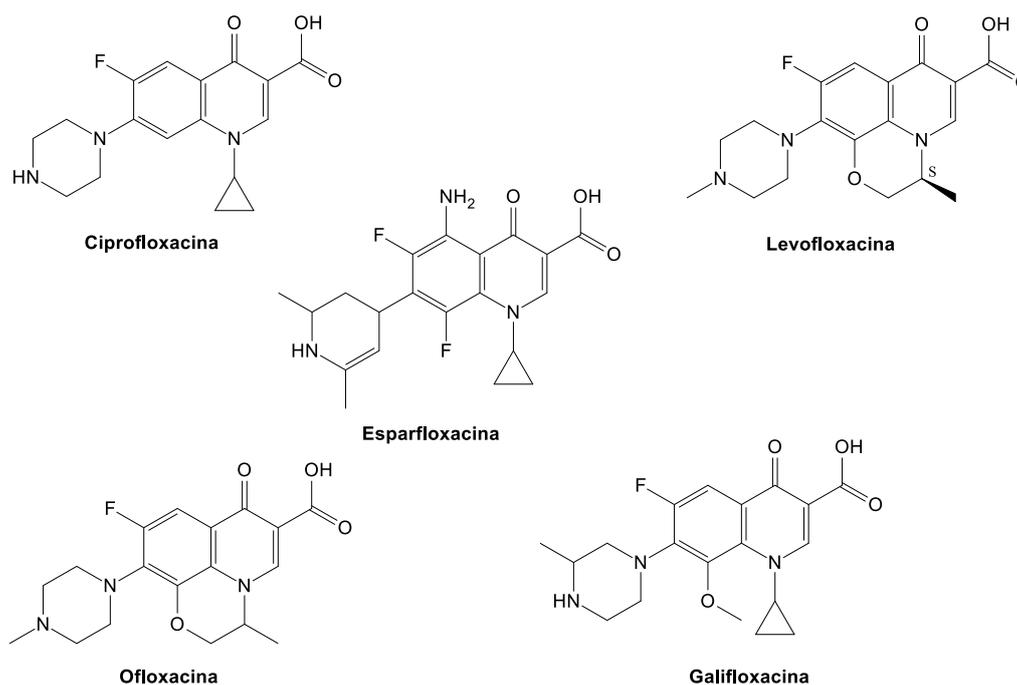


Figura 4: Principais fluoroquinolonas comercializadas

Atualmente existem diversas classes de agentes antimicrobianos comerciais que atuam por diferentes mecanismos. Estes compostos são classificados como bactericidas, que levam à morte a bactéria, ou bacteriostático, que inibe o crescimento da colônia de bactérias. Porém, a grande capacidade das bactérias de adquirir resistência aos fármacos comerciais faz com que haja necessidade de desenvolvimento de novos compostos com potencial atividade antibacteriana, que possam atuar principalmente sobre cepas de bactérias resistentes à fármacos atualmente utilizados e que apresentam grande potencial patogênico.

1.2. Principais classes de agentes antimicrobianos

1.2.1. β -lactâmicos

Os compostos β -lactâmicos são os antimicrobianos mais comercializados e estão divididos em quatro subclasses: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas e monobactamas. A figura 6 mostra as estruturas das quatro subclasses de β -lactâmicos utilizadas nos tratamentos clínicos.

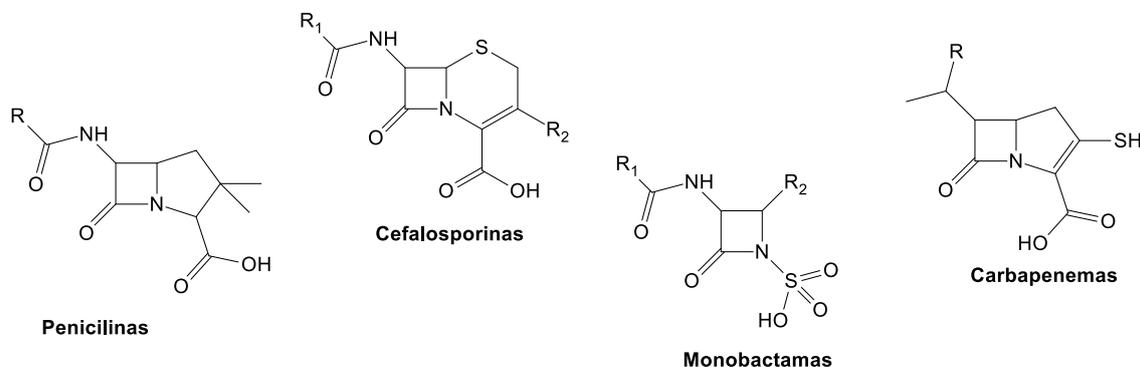


Figura 5: Estruturas básicas das quatro subclasses de β -lactâmicos comercializados

São compostos que apresentam um anel β -lactâmico em sua estrutura que podem estar fundidos a outro anel de cinco ou seis membros, formando as penicilinas ou cefalosporinas, respectivamente. Em geral atuam na inibição da síntese da parede celular da bactéria, através da inibição da biossíntese de peptidoglicanos, pois o anel β -lactâmico fundido a um outro ciclo mimetizam o substrato da enzima transpeptidase, responsável pela formação das ligações cruzadas entre os peptidoglicanos. Tanto as bactérias Gram-positivas quanto as Gram-negativas apresentam peptidoglicanos na estrutura da parede celular (embora essa camada seja mais espessa na parede celular de bactérias Gram-positivas) que são sintetizados, principalmente, a partir da *N*-acetilglicosamina (NAG) e ácido *N*-acetilmurâmico, catalisados pela atividade da transpeptidase proteína ligadora de penicilina (PBP – *penicillin binding protein*). O anel β -lactâmico liga-se à PBP, inativando a enzima e, conseqüentemente, inibindo a síntese de peptidoglicanos para a parede celular da bactéria. Os compostos β -lactâmicos atuam, também, nas transpeptidases, responsáveis pelo cruzamento das ligações dos peptidoglicanos e fortalecimento da parede celular. Por atuarem sobre a síntese da parede celular da bactéria apresentam baixa toxidez ao organismo do hospedeiro (GUIMARAES *et al.*, 2010).

Os compostos β -lactâmicos são incorporados às células bacterianas através de porinas e atualmente são conhecidos três mecanismos de resistência das bactérias para os β -lactâmicos. O primeiro é a produção de β -lactamases, que possuem grupos nucleofílicos como resíduos de serina, por exemplo, capazes de hidrolisar o anel lactâmico, sendo o meio mais comum e eficiente pelo qual as bactérias adquirem resistência aos compostos β -lactâmicos. As bactérias Gram-positivas excretam as β -lactamases para o meio extracelular, tornando menos eficiente a atuação destas enzimas e tornando as bactérias Gram-positivas mais suscetíveis à atividade dos compostos β -lactâmicos. Em contrapartida, as bactérias Gram-negativas concentram as β -lactamases no espaço periplasmático, fazendo com que a atuação destas enzimas seja mais eficiente, diminuindo a ação dos medicamentos β -lactâmicos (ANVISA, 2007). A figura 6 mostra a distribuição das enzimas β -lactamases nos dois tipos de bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas.

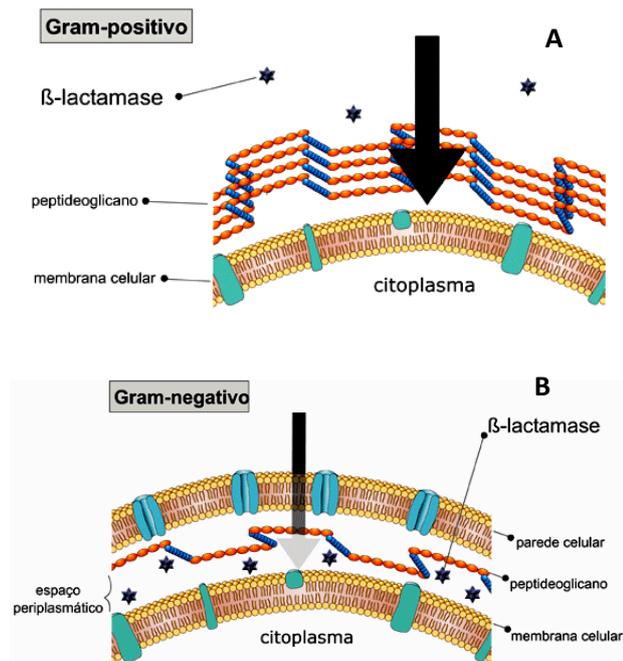


Figura 6: Distribuição de enzimas β -lactamases em células bacterianas (A) Gram-positivas e (B) Gram-negativas (ANVISA, 2007)

Normalmente os genes codificadores para a síntese de enzimas β -lactamases estão presentes em plasmídios, que podem ser transferidos entre bactérias de mesma espécie ou de espécies diferentes.

O segundo mecanismo consiste em modificações estruturais da proteína PBP da bactéria, codificada pelo gene *mecA*. Na tentativa de diminuir ou eliminar as interações entre a PBP e o sítio farmacofórico dos compostos β -lactâmicos, o terceiro mecanismo de resistência consiste na modificação estrutural das porinas, proteínas responsáveis pela permeabilidade dos β -lactâmicos nas células das bactérias, diminuindo a permeabilidade destas. A figura 7 mostra os principais fármacos β -lactâmicos comercializados (SINGH *et al.*, 2017).

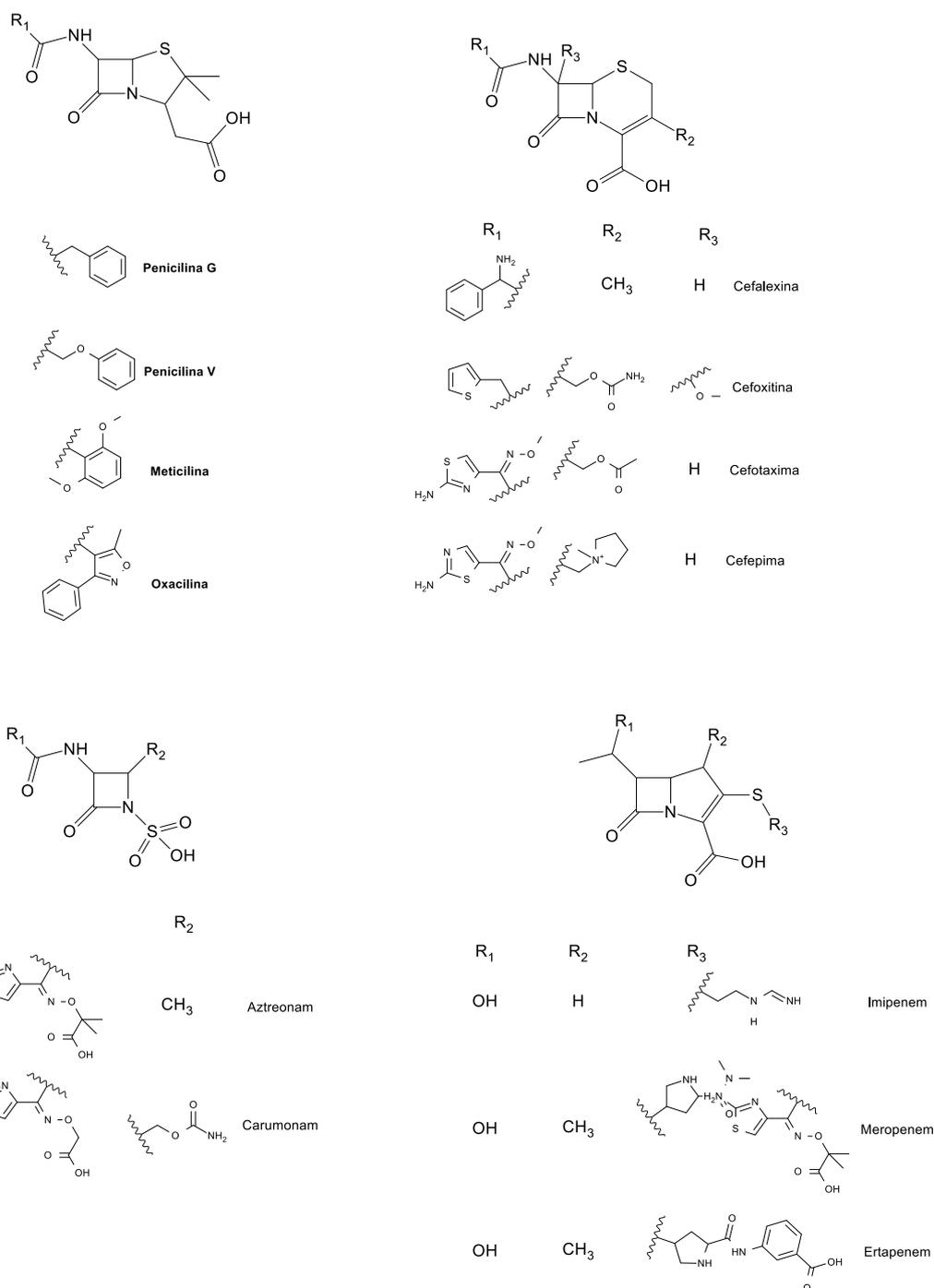


Figura 7: Principais antibacterianos β -lactâmicos comercializados

1.2.2. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são compostos que possuem grupamentos amino ligados a uma unidade de açúcar e que apresentam maior atividade antimicrobiana quando em meio levemente básico ($\text{pH} \approx 7,4$). Estes compostos atuam principalmente sobre bactérias Gram-negativas aeróbias inibindo a síntese proteica ao ligar-se à subunidade 30s do ribossomo bacteriano e impedir que este consiga deslocar-se pelo RNA mensageiro (GUIMARAES *et al.*, 2010).

A principal forma de resistência das bactérias aos aminoglicosídeos é através de modificações genéticas que produzem enzimas *N*-acetiltransferases, *O*-adeniltransferases e *O*-fosfotransferases, que modificam os grupamentos amino e hidroxila presentes em

suas estruturas. Após modificados, os aminoglicosídeos não conseguem mais ligar-se à subunidade 30s do RNA ribossomal. Os genes codificadores da síntese destas proteínas são encontrados em plasmídios ou transposons. Outro tipo de resistência aos aminoglicosídeos é oriundo de modificações na membrana, diminuindo a permeabilidade da bactéria aos aminoglicosídeos protonados (HE *et al.*, 2013). A figura 8 mostra as estruturas dos principais agentes antibacterianos da classe dos aminoglicosídeos.

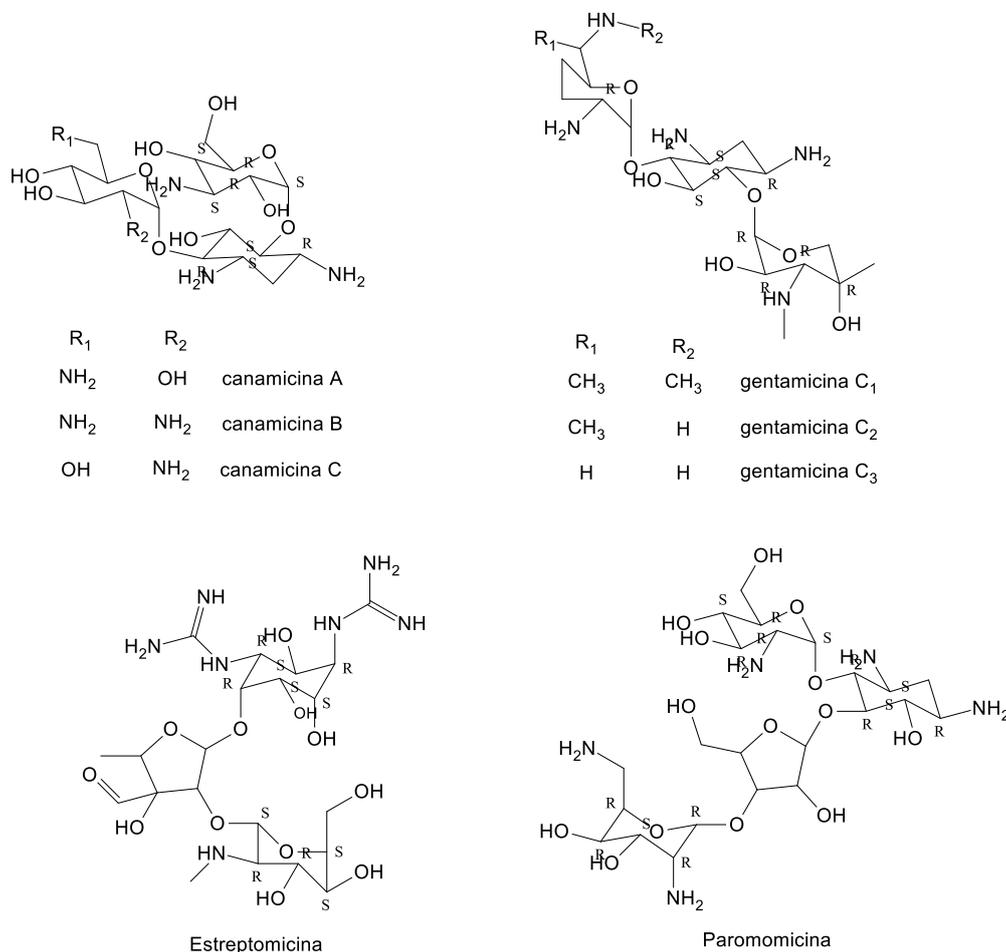


Figura 8: Principais antibacterianos da série dos aminoglicosídeos comercializados

1.2.3. Tetraciclínas

São compostos formados por um núcleo de quatro anéis fundidos e um grupamento dimetilamino na posição 4, necessário para a atividade antimicrobiana destes compostos (figura 9).

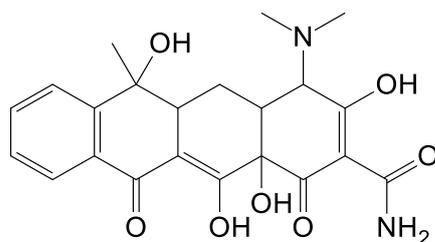


Figura 9: Estrutura do composto tetraciclina, que dá nome a série de antimicrobianos derivados da tetraciclina.

São incorporados à célula bacteriana por transporte ativo e inibem a síntese proteica da bactéria. Estas substâncias ligam-se ao RNA transportador impedindo a formação de aminoacil-tRNA, comprometendo a incorporação de novos aminoácidos ao peptídeo e, conseqüentemente, a formação de proteínas bacterianas (MOFFA e BROOK, 2015).

São conhecidas três estratégias de resistência às tetraciclinas desenvolvidas pelas bactérias, que envolvem a expulsão da tetraciclina da célula bacteriana através de bombas de efluxo, modificações na estrutura do ribossomo, principal sítio ativo das tetraciclinas, e através de mecanismo enzimático, produzindo proteínas capazes de inativar as tetraciclinas (MOFFA e BROOK, 2015).

Em geral, modificações no gene *tet* da bactéria levam à codificação de proteínas que irão formar bombas de efluxo seletivas às tetraciclinas, levando à diminuição da concentração deste medicamento no interior da célula bacteriana. Estes genes estão presentes tanto em células bacterianas Gram-positivas quanto Gram-negativas. Outro mecanismo de resistência das bactérias às tetraciclinas é através de proteínas de proteção ribossômicas (RPP – *ribosomal protection proteins*). Quando as tetraciclinas se ligam à subunidade 30S ribossomal bacteriana a conformação deste é alterada e a síntese proteica da bactéria é comprometida. As proteínas de proteção ribossômica ligam-se a uma proteína no interior do ribossomo, desligando o sítio de ligação das tetraciclinas. Essas proteínas também são codificadas por 12 genes *tet*. O terceiro mecanismo de resistência às tetraciclinas conhecido, mecanismo enzimático, é menos comum, mas atua da mesma maneira, levando as tetraciclinas à modificações que a impedem de ligar-se ao sítio no ribossomo (GUIMARAES *et al.*, 2010).

1.2.4. Macrolídeos

Os macrolídeos são agentes bacteriostáticos que possuem uma lactona macrocíclica que pode estar ligada a uma ou mais unidades de açúcar e são amplamente utilizados em infecções respiratórias. A substância mais conhecida desta classe é a eritromicina e, também, é considerada a substância mais segura para uso clínico (figura 10).

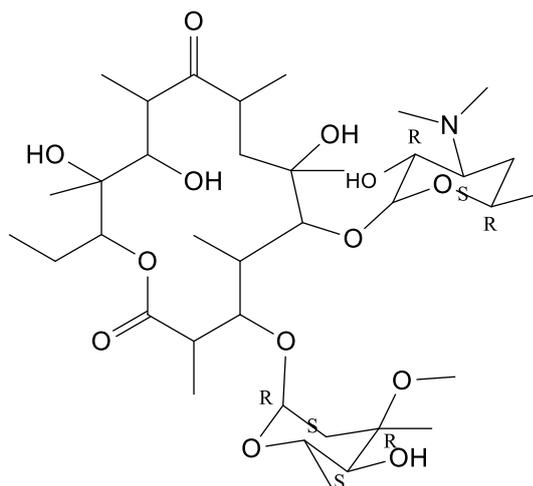


Figura 10: Estrutura do macrolídeo eritromicina

Os compostos desta série de antimicrobianos atuam na síntese de proteínas bacterianas, ligando-se ao RNA ribossomal 23S da subunidade 50S, comprometendo a transferência de novos aminoácidos pelo tRNA e impedindo a síntese de proteínas (AMINOV, 2017).

Os macrolídeos são antibióticos muito seguros e que atuam sobre diversas bactérias que causam infecções respiratórias. Um ponto negativo é que a lactona é pouco estável em meio ácido devido à hidrólise, diminuindo sua biodisponibilidade quando administrado oralmente (AMINOV, 2017).

Os mecanismos de resistência bacteriana aos macrolídeos podem dar-se através de modificação da porção 23S da subunidade 50S do ribossomo, por mecanismo enzimático de modificação do macrolídeo ou através da diminuição da permeabilidade celular a esses compostos (NILSSON *et al.*, 2014).

1.2.5. Oxazolidinonas

São moléculas que apresentam um anel heterocíclico que possui oxigênio e nitrogênio. São agentes bacteriostáticos de amplo espectro de ação, sendo a linezolida o primeiro e único fármaco da série a ser comercializado. A figura 11 mostra a estrutura da linezolida.

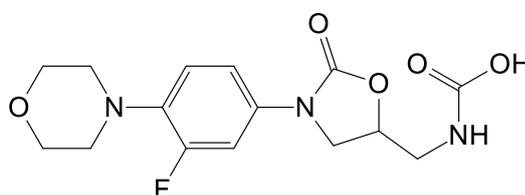


Figura 11: Fórmula estrutural da linezolida

Os compostos da série das oxazolidinonas atuam sobre a síntese proteica bacteriana e são ativos contra diversas bactérias Gram-positivas e não atuam sobre bactérias Gram-negativas. Essa diferença na atividade se deve a maior complexidade da membrana das bactérias Gram-negativas, que lhes conferem uma menor permeabilidade. Estes compostos atuam na subunidade 50S do ribossomo bacteriano, inibindo a síntese de proteínas essenciais para o desenvolvimento destas bactérias (PAULEN *et al.*, 2017).

O mecanismo pelo qual as bactérias adquirem resistência aos compostos desta série envolve mutações no gene 23SrRNA, que codifica a formação do RNA ribossomal bacteriano 23S localizado na subunidade 50S, que é o sítio de ligação das oxazolidinonas (PAULEN *et al.*, 2017).

1.2.6. Glicopeptídeos

São moléculas complexas que possuem em suas estruturas unidades de açúcares e aminoácidos. Os compostos mais conhecidos desta série são a vancomicina e a teicoplanina. As moléculas desta série inibem a síntese da cadeia de peptidoglicanos, essencial para formação da parede celular das bactérias, diminuindo a rigidez desta parede. A inibição se dá pela ligação dos glicopeptídeos à porção *N*-ácido acetilmurâmico e *N*-acetilglucosamina da proteína responsável pela formação das ligações cruzadas na cadeia dos peptidoglicanos. Para os compostos da série dos glicopeptídeos o principal mecanismo de resistência das bactérias ocorre pela substituição de um aminoácido (alanina) por outros resíduos de aminoácido que apresentam cadeia lateral polar, como a serina, por exemplo, diminuindo a afinidade de ligação deste sítio com os glicopeptídeos (SANTOS-BENEIT *et al.*, 2017).

1.2.7. Cloranfenicol

O cloranfenicol é um composto antimicrobiano que tem amplo espectro antibacteriano, ótima penetrabilidade celular e é muito empregado no tratamento de

infecções oculares. Possui um grupo nitro e dois grupos hidroxila responsável pela interação deste composto com o sítio alvo (WEI e YANG, 2017). A figura 12 mostra a estrutura da molécula do cloranfenicol.

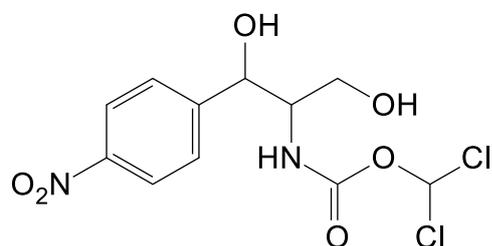


Figura 12: Estrutura do antimicrobiano cloranfenicol

O mecanismo de ação do cloranfenicol envolve a ligação deste a um sítio receptor localizado na subunidade 50S do ribossomo bacteriano, mudando a conformação deste e inibindo a síntese proteica da bactéria (KIKUCHI *et al.*, 2017).

A resistência bacteriana ao cloranfenicol normalmente ocorre por modificações genéticas na bactéria que levam à diminuição da permeabilidade do cloranfenicol pela bactéria ou através de mecanismo enzimático. As bactérias sintetizam proteínas acetiltransferases e nitroreduases que modificam os grupamentos do cloranfenicol que se ligam ao sítio de ação localizado no ribossomo. Devido seu efeito genotóxico e de induzir anemia aplástica, seu uso para tratamento de animais destinados à alimentação humana foi banido no Japão, União Européia e Estados Unidos (KIKUCHI *et al.*, 2017).

1.2.8. Lincosamidas

A série das lincosamidas são formadas pela união de um aminoácido e uma unidade de açúcar. O grupo carboxilato da prolina se liga ao grupamento amino de uma unidade de açúcar através de uma ligação peptídica para formar essa série de compostos antimicrobianos. Substituições na unidade de açúcar formam derivados com maior atividade, como o derivado clorado clindamicina, por exemplo, que apresenta atividade biológica satisfatória contra diversos tipos de infecções. São consideradas substâncias bacteriostáticas, pois inibem a síntese proteica bacteriana ao ligar-se à subunidade 50S do ribossomo bacteriano, impedindo a elongação da cadeia peptídica das bactérias. Através de mutações, as bactérias modificam os sítios receptores destes compostos na subunidade 50S do ribossomo bacteriano, diminuindo a afinidade da ligação entre as lincosamidas e os sítios receptores (SPIZEK & REZANKA, 2017).

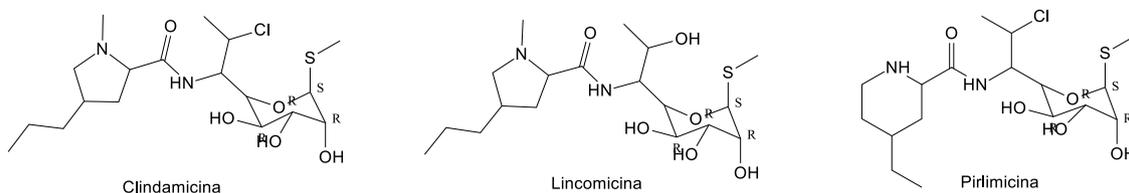


Figura 13: Estruturas dos principais compostos antibacterianos da série das lincosamidas

1.2.9. Lipopeptídeos

São metabólitos secundários produzidos por espécies de *Streptomyces* e o mais conhecido é o fármaco daptomicina. Alguns destes metabólitos podem ser utilizados,

também, como inibidores de histonas-deacetilase no tratamento de linfomas cutâneos (KISHIMOTO *et al.*, 2012).

A daptomicina, figura 14, é um dos produtos da fermentação do *Streptomyces roseosporus* e foi o precursor da série de antimicrobianos denominada lipodepsipeptídeos. São utilizados no tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas. O mecanismo de ação da daptomicina é cálcio-dependente, ou seja, para conseguir penetrar na membrana celular da bactéria liga-se ao cálcio. Dentro da célula bacteriana esse complexo causa rápida despolarização e diminuição do potencial de membrana, levando a célula à morte (SHARMA *et al.*, 2017). De acordo com a ANVISA foi documentado cerca de 0,2% de resistência dos pacientes à daptomicina, porém os mecanismos ainda são desconhecidos. Foi detectado que este composto se inativa na presença de surfactantes pulmonares, não sendo indicados para infecções neste órgão.

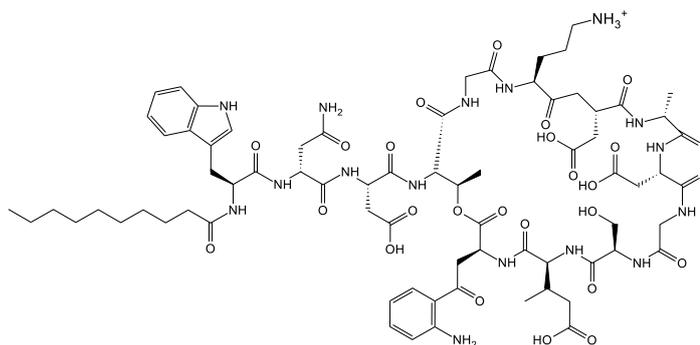


Figura 14: Estrutura da daptomicina, antibacteriano da série dos lipodepsipeptídeos

1.2.10. Sulfonamidas

As sulfonamidas (ou sulfas) pertencem a primeira classe de compostos sintéticos utilizados para o tratamento de infecções bacterianas. Com o grande aumento na produção de corantes no início do século XX e sabendo que estes poderiam interagir com bactérias, pesquisadores começaram a testar estes corantes contra diversas bactérias, buscando um composto com potencial atividade antibacteriana. No início da década de 1930 o composto sulfonamidacrisoidina, comercialmente conhecido como Prontosil, apresentou atividade antibacteriana contra infecções causadas por algumas espécies de *Streptococcus*. Entre os anos de 1937 e 1943 obteve-se diminuição considerável no número de mortes por algumas doenças infecciosas decorrente do uso das sulfas, inclusive por pneumonia. Atualmente, as sulfas são utilizadas contra infecções do trato urinário e, em associação com o trimetoprim, contra infecções por *Pneumocystis carinii* em pessoas portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV – Human Immunodeficiency Virus) (AMINOV, 2017).

Também tem sido estudada a atividade de sulfas como inibidores de metaloproteinases e sua aplicação contra doenças de obstrução pulmonar crônicas, úlceras, artrites e câncer (JAIN *et al.*, 2013). Complexos usando sulfas como ligantes tem apresentado sua aplicação contra infecções micobacterianas, como a tuberculose (AGERTT *et al.*, 2013).

As sulfas são consideradas bacteriostáticos e inibem a síntese de DNA bacteriano. Estes compostos inibem importantes enzimas que atuam na rota biossintética do *N,N*-metileno-tetraidrofolato, importante cofator na síntese de bases pirimidínicas que irão compor o DNA da bactéria. As sulfas inibem a enzima metileno-tetraidrofolato redutase, catalisadora da reação de metilação onde a molécula 5,10-

metilenotetraidrofolato é transformada em 5-metiltetraidrofolato e transfere um grupo metila para a homocisteína, convertendo-a em metionina. A metionina, substrato para formação da 5-adenosilmetionina, é o principal doador de grupos metila para formação das bases nitrogenadas que irão compor o DNA. A eficiência das sulfas consiste na capacidade dos seres humanos de aproveitamento do folato exógeno, oriundo da alimentação, para síntese das bases nitrogenadas, característica ausente em bactérias (GUIMARAES *et al.*, 2010). A figura 15 mostra alguns exemplos de sulfonamidas com atividade antibacteriana.

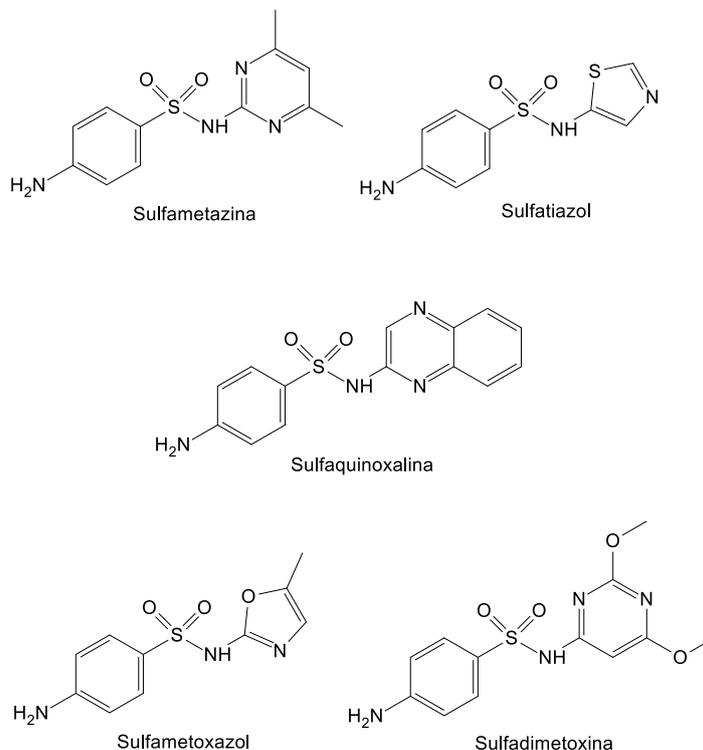


Figura 15: Estruturas de alguns dos antibacterianos pertencentes à série das sulfonamidas

O principal mecanismo de resistência de bactérias às sulfas ocorre por mutação genética. Estes genes podem ser encontrados em plasmídeos ou transposons e modificam proteínas responsáveis pelo efluxo das sulfas pela célula bacteriana. Hamidian e colaboradores (2016) identificaram um plasmídeo, denominado pA297-3, em cepas de *Acinetobacter baumannii*, responsáveis por transferir genes de resistência à sulfonamidas a esta bactéria. O mecanismo de resistência mais comum ocorre pela elevação da produção de ácido *p*-aminobenzóico (PABA), molécula que compete reversivelmente com as sulfonamidas e é substrato na síntese de folatos.

1.2.11. Quinolonas e fluoroquinolonas

No início da década de 1960, tendo em vista as taxas de resistência das bactérias que cresciam desenfreadamente, iniciou-se o uso do ácido nalidíxico (figura 16) como potencial agente antimicrobiano devido a sua atividade bactericida sobre espécies Gram-negativas e Gram-positivas. As quinolonas inibem a atividade de topoisomerases, impedindo a replicação do DNA da bactéria, e apresentam alta seletividade à células bacterianas.

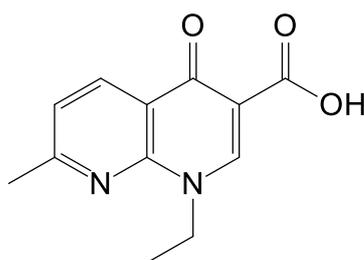


Figura 16: Estrutura do ácido nalidíxico, precursor da série das quinolonas

Porém, as bactérias adquirem resistência a estes compostos rapidamente e modificações estruturais na estrutura da quinolona foram necessárias para obtenção de novos compostos. Em vista disso, um átomo de flúor foi adicionado na posição 6, criando uma nova série: as fluoroquinolonas.

Semelhante às quinolonas, as fluoroquinolonas atuam sobre as topoisomerase II (em bactérias Gram-negativas) e IV (em bactérias Gram-positivas) e sobre a DNA girase, inibindo a replicação do DNA bacteriano e são mil vezes mais seletivas para topoisomerasas bacterianas quando comparada às enzimas topoisomerase humanas (MUSTAEV *et al.*, 2014).

São conhecidos quatro mecanismos de resistência das bactérias às quinolonas e fluoroquinolonas, sendo o mais frequente a modificação genética espontânea das topoisomerasas, principal sítio de ação dessa série de antimicrobianos. Em *E. coli* e *P. aeruginosa* essa mutação ocorre no gene *gyrA*, denominada região determinante de resistência às quinolonas. Em 1998 foi descoberto um tipo de resistência às quinolonas mediado por plasmídios. O plasmídeo, pMG252 encontrado em uma cepa de *K. pneumoniae*, apresenta o gene *qnr*, que sintetiza uma proteína que protege a DNA girase da ação das quinolonas. Este mecanismo é pouco frequente em bactérias e, mesmo quando presente, não confere alta resistência, pois não protege as topoisomerasas, alvos principais das quinolonas (MUSTAEV *et al.*, 2014).

1.3. As quinonas

As quinonas são substâncias presentes em fungos, bactérias, líquens e em diversas espécies de plantas e, são consideradas hidrocarbonetos policíclicos aromáticos oxigenados, possuindo duas carbonilas que podem estar dispostas *orto* ou *para* uma à outra. As quinonas encontradas em plantas podem ser classificadas em benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e fenantraquinonas, dependendo do tipo de sistema aromático que as compõem (figura 17). No reino animal, quinonas podem ser encontradas em animais do grupo dos equinodermos (filo *Echinodermata*), em ouriços do mar e em artrópodes. Normalmente as quinonas são formadas pela combustão incompleta de combustíveis fósseis, por oxidação química ou fotoquímica de hidrocarbonetos aromáticos ou, nas plantas, através de metabolismo oxidativo de compostos como catecolaminas, estrógenos e xenobióticos (SOUSA *et al.*, 2015).

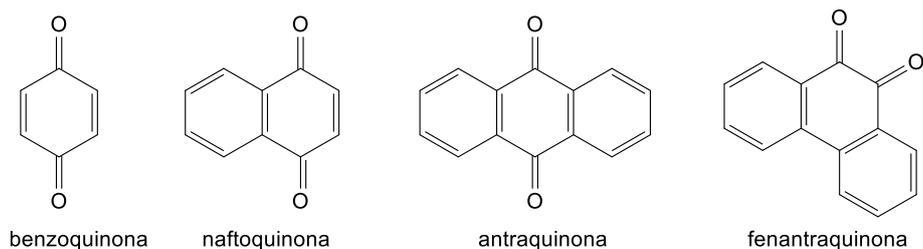


Figura 17: Estruturas básicas das quinonas

As quinonas tem se mostrado uma classe de compostos de grande interesse nos últimos anos, principalmente como potenciais candidatos a novos fármacos, devido ao amplo espectro de atividades biológicas que podem apresentar. As principais atividades biológicas atribuídas às naftoquinonas são: antineoplásica, anti-inflamatória e antiviral (Martines & Benito, 2005), antifúngica (KEHELPANNALA *et al.*, 2017), antibacteriana, protozoocida e moluscicida (WANG *et al.*, 2015). Além disso, o potencial anticâncer das naftoquinonas também tem sido amplamente estudado.

1.3.1. Atividades biológicas atribuídas às naftoquinonas

Diversos compostos que possuem esqueleto da 1,4-naftoquinona são amplamente estudados, principalmente no desenvolvimento de novos fármacos (OGATA *et al.*, 2016). As naftoquinonas geralmente são metabólitos de plantas e são obtidas a partir da oxidação de compostos fenólicos.

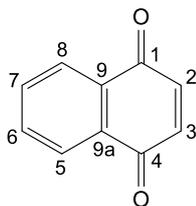


Figura 18: Estrutura da 1,4-naftoquinona

Sua atividade biológica é atribuída a sua capacidade de atuar no transporte de elétrons e, a partir da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e ânions radicais superóxido, e induzir o estresse oxidativo em células. Este processo é irreversível, pois causa danos permanentes em ácidos nucleicos e proteínas essenciais.

O composto 2-hidróxi,3-(3-metil,2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol) é uma quinona natural que pode ser isolada com bons rendimentos do cerne da madeira de árvores de diversas espécies de *Bignoniaceae* encontradas por quase todo o território brasileiro (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Este rendimento pode variar de 1 a 7% em massa bruta, dependendo da espécie de árvore e de fatores como a região e a sazonalidade. Como apresenta características ácidas (pKa = 6,0), pode ser facilmente extraído quando em contato com solução alcalina, como carbonatos e bicarbonatos, por exemplo (BARBOSA e NETO, 2013). Diversos estudos continuam sendo realizados com o lapachol (figura 18) devido à sua diversificada atividade biológica. Sua atividade anticâncer, antiviral, antimicrobiana, analgésica, antimalarial e anti-inflamatória já é conhecida há muitos anos (OLIVEIRA e NETO, 2013). Estudos mais recentes mostram o uso do lapachol e de seus derivados como larvicida, principalmente aplicados a larvas de *Aedes aegypt*, contra *Trypanosoma cruzi* (SILVA JR. *et al.*, 2012), antitumoral (DELARMELINA *et al.*, 2015) e moluscicida (SILVA *et al.*, 2005).

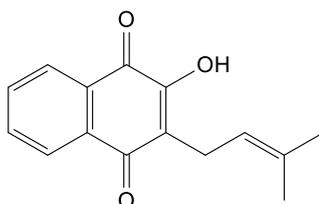


Figura 19: Estrutura da naftoquinona lapachol

No caso da atividade antitumoral, pode estar associada a seu potencial redox (OGATA *et al.*, 2016), pois núcleos quinoídicos geram espécies reativas de oxigênio, principalmente superóxidos, levando a célula à estresse oxidativo. Sugere-se, também, que os núcleos tipo quinona podem atuar por diversos mecanismos antineoplásicos, inclusive na inibição da atividade da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que está presente em diversas linhagens de câncer humano (CERQUEIRA *et al.*, 2014). Ogata e colaboradores (2016) ainda afirmaram que a capacidade de fármacos atuarem em diversos mecanismos pode ser uma estratégia eficiente para evitar-se a quimioresistência.

Devido a sua ampla aplicação, derivados das naftoquinonas vêm sendo desenvolvidos por diversos grupos de pesquisa, em busca de novos candidatos à fármacos. O composto 2,3-ditiocarbamato-1,4-naftoquinona foi testado contra seis linhagens de células tumorais, apresentando valores de CI_{50} entre 50 nM e 150 nM. Além disso, foi capaz de suprimir significativamente o crescimento de carcinoma de mama e de melanoma B16 transplantados em camundongos (NING *et al.*, 2018).

Em outro estudo, dezessete naftoquinonas foram extraídas e isoladas da planta *Rhinacanthus nasutus*, e três delas apresentaram atividade biológica satisfatória. A naftoquinona denominada rinacantina S apresentou inibição da enzima acetilcolinesterase com percentual de inibição de 48%. A rinacantina A apresentou citotoxicidade contra linhagem de células de câncer de mama MCF-7, com valor de CI_{50} de 8,79 μ M e a rinacantina N apresentou citotoxicidade contra linhagens celulares de câncer de pulmão NCI-H187, com valor de CI_{50} de 2,24 μ M (BOONYAKETGOSON *et al.*, 2018). A figura 19 mostra as estruturas das naftoquinonas rinacantina A, S e N.

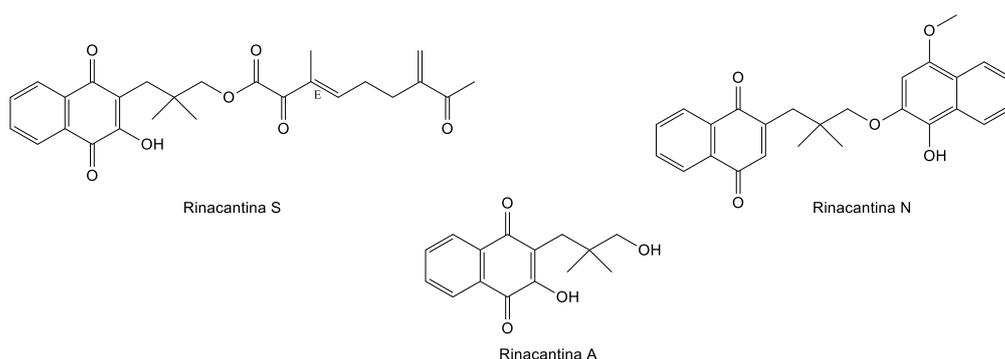


Figura 20: Estruturas das naftoquinonas naturais rinacantina S, rinacantina A e rinacantina N isoladas da planta *Rhinacanthus nasutus*

Diversos grupos de pesquisa têm buscado novos compostos com atividade antimicrobiana devido à resistência adquirida por vários microorganismos patogênicos. A resistência do *Staphylococcus aureus*, por exemplo, a diversos antibióticos comerciais

tem aumentado os casos de infecções, desde as mais simples até as mais graves, tornando-se um sério problema de saúde pública (CHUA *et al.*, 2013).

1.3.2. Síntese de derivados de naftoquinonas

As naftoquinonas, devido à diversidade de aplicações biológicas, tem sido bastantes estudadas, apresentando-se como ótima opção na obtenção de novos candidatos à agentes antimicrobianos.

Na maioria dos trabalhos recentes sobre derivados da naftoquinona são realizadas modificações na posição 2 da porção quinoídica, na tentativa de desenvolver novos compostos, mais eficientes e menos tóxicos (SILVA JR. *et al.*, 2012). A formação de derivados das naftoquinonas e de conjugados destas com outras moléculas com atividade biológica também tem sido muito utilizada.

A literatura apresenta grande quantidade de modificações na posição 2 da porção quinoídica, pela reação do grupamento hidroxila com aminas diversas. O grupo de trabalho do professor Celso A. Câmara, da Universidade Federal Rural do Pernambuco (UFRPE) vem, há anos, sintetizando diversos derivados nitrogenados do lapachol e avaliando a atividade biológica destes. A esses derivados foram associados diversos resultados de atividade biológica interessantes. Em 2012, foram publicados resultados de uma série de derivados de naftoquinonas contra a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*. Neste trabalho foram testadas 33 moléculas sintetizadas a partir das naftoquinonas lapachol e lausona, sendo que 15 destas (figura 20) apresentaram valores de IC₅₀ menores que o padrão benzonidazol (SILVA-JUNIOR *et al.*, 2012).

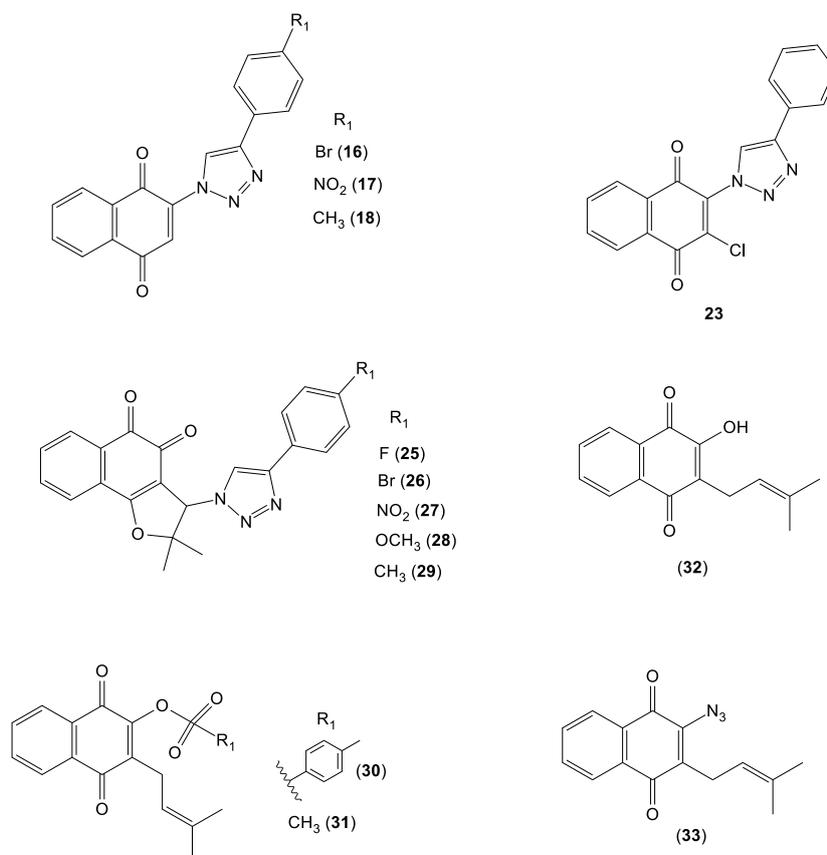


Figura 21: Estruturas dos derivados do lapachol e lausona com atividade contra *T. cruzi*

Além da síntese dos compostos com potencial ação biológica, a farmacocinética também é de grande importância para ação efetiva da substância no organismo. Como normalmente as substâncias orgânicas tem baixa solubilidade em fase aquosa, a interação entre moléculas biologicamente ativas e proteínas transportadoras presentes no sangue é essencial. Proteínas séricas têm sido amplamente estudadas devido a sua interação com moléculas biologicamente ativas que apresentam efeitos benéficos aos organismos (fármacos) ou não (toxinas e venenos) (CHAVES, 2017).

1.4. Uso da albumina sérica bovina (ASB) e humana (ASH) em ensaios biológicos

As albuminas são proteínas existentes no sangue, clara do ovo e no leite. Pertencentes à classe das proteínas globulares, as albuminas séricas são muito abundantes no sangue dos mamíferos e têm sido amplamente estudadas devido a sua interação com compostos endógenos (como ácidos graxos não esterificados, hormônios, ácidos biliares, aminoácidos e cátions) e exógenos (fármacos e toxinas) que apresentam potencial atividade biológica (POÓR *et al.*, 2017).

Diversos trabalhos reportam a interação da albumina sérica humana (ASH) com fármacos antimalariais (MARKOVIC *et al.*, 2018), antirretrovirais (PIRNÁU *et al.*, 2018), para tratamento do câncer (GUN'KO *et al.*, 2018) e para tratamento de distúrbios cardiovasculares (ZHANG *et al.*, 2018) como responsável pela biodistribuição destes no organismo humano. Além disso, glicocorticóides e derivados da progesterona também tem sua biodistribuição associada à interação com a ASH (ABBOUD *et al.*, 2017).

A proteína ASH possui 585 resíduos de aminoácidos e peso de 66,5 kDa, divididos em três domínios α -helicoidais, denominados I, II e III, e cada um dos domínios possui dois subdomínios, A e B, que são responsáveis pela interação da ASH com moléculas biologicamente ativas (MARKOVIC *et al.*, 2018).

Para se estudar as interações entre as albuminas séricas e moléculas biologicamente ativas são utilizadas diversas técnicas, dentre elas a espectroscopia de fluorescência estacionária, por ser uma técnica muito empregada no estudo de interações moleculares que envolvem proteínas. Medindo a variação de emissão de fluorescência da proteína, pode-se verificar a acessibilidade de moléculas supressoras ao grupo fluoróforo. No caso da albumina, a emissão de fluorescência está associada, principalmente, ao resíduo de triptofano, que pode ser encontrado tanto na ASH quanto na ASB. Na ASH, o resíduo de triptofano encontra-se no subdomínio IIA (Trp-214). Na ASB são encontrados dois resíduos de triptofano, localizados nos subdomínios IB (Trp-134) e IIA (Trp-212) (CURRY, 2011).

A albumina sérica humana (ASH), experimentalmente, pode ser substituída pela albumina sérica bovina (ASB), devido a fatores financeiros (já que a ASB apresenta menor custo se comparada a ASH) e à maior disponibilidade da ASB. Os resultados obtidos para ASB também são muito próximos dos obtidos para ASH. Isso ocorre, pois, a ASH apresenta 76% de identidade e 88% de similaridade de sequência com a ASB (CURRY, 2011).

Outras técnicas espectroscópicas também podem ser utilizadas no estudo da interação entre albuminas séricas e compostos biologicamente ativos. A técnica de fluorescência resolvida no tempo ajuda a definir o mecanismo de supressão de fluorescência e a ressonância magnética nuclear também pode ser utilizada para estudar interações de moléculas com proteínas (CHAVES *et al.*, 2016). Porém, estas técnicas não foram utilizadas neste trabalho de dissertação.

A técnica de ancoragem molecular também é de grande importância no estudo das interações entre as albuminas séricas, já que permite definir o sítio alvo em que ocorre a interação do composto com a albumina. Essa técnica, também é utilizada para definir

os resíduos de aminoácidos envolvidos na interação proteína-ligante e o tipo de interação intermolecular envolvida, complementando assim os estudos espectroscópicos (CHAVES *et al.*, 2016).

Assim, diante do exposto a necessidade de buscar novas substâncias com atividade antibacteriana tem sido cada vez mais premente, bem como investigar a possível interação com as biomoléculas, como por exemplo, a soro albumina humana, visando a possível descoberta de um novo protótipo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Sintetizar uma série de amino-derivados da 1,4-naftoquinona e avaliar sua atividade antibacteriana.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Sintetizar a 1,4-naftoquinona a partir da oxidação do naftaleno;
- b) Sintetizar 11 amino-derivados a partir da 1,4-naftoquinona e aminas diferentes por três metodologias;
- c) Caracterizar os amino-derivados da 1,4-naftoquinona sintetizados por técnicas espectroscópicas de IV, RMN de ^{13}C e RMN de ^1H ;
- d) Avaliar a atividade antibacteriana dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona sintetizados frente a quatro cepas de bactérias Gram-positivas padrão e cinco cepas de bactéria Gram-negativas padrão;
- e) Avaliar a interação dos amino-derivados que apresentaram melhor atividade frente às bactérias com a proteína soro albumina humana.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho de Dissertação foram preparados 11 (onze) amino-derivados da 1,4-naftoquinona (NQ A-K), sendo 9 (nove) inéditos na literatura. A preparação foi realizada a partir da 1,4-naftoquinona e as aminas correspondentes utilizando metodologias alternativas via irradiação em banho de ultrassom e irradiação em reator de micro-ondas. Os derivados 2-amino-1,4-naftoquinonas (NQ A-K) foram avaliados quanto a ação antibacteriana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo as mais ativas investigadas quanto a interação com a soro albumina humana.

3.1. Obtenção da 1,4-naftoquinona

A 1,4-naftoquinona foi obtida com baixo rendimento (19%) ao ser sintetizada pela metodologia descrita na literatura (ORGANIC SYNTHESIS COLLECTIVE, 1963), que informava um rendimento esperado entre 18 a 22%. O baixo rendimento na obtenção do produto, nesta preparação, estava associado à etapa da filtração. Utilizando-se o papel de filtro comum haviam grandes perdas do produto, observado através da formação de sólido amarelo pálido na solução mãe. Na tentativa de minimizar essas perdas, o papel de filtro comum foi substituído por papel de filtro quantitativo para filtrações médias e o rendimento na obtenção do produto subiu para 49%. A literatura indicava que a mistura da reação deveria ser mantida em agitação em banho de gelo por 18 horas. No entanto, não foram observadas diferenças significativas com a diminuição do tempo de agitação nessas condições. Em vista disso, a metodologia descrita na referência foi adaptada, diminuindo o tempo da reação de 18 para 4 horas. A cromatografia em camada delgada (CCD) do sólido amarelo pálido obtido apresentou a formação de um único produto e este foi caracterizado por RMN ^{13}C e ^1H . A figura 22 mostra o esquema de reação de obtenção da 1,4-naftoquinona a partir da oxidação do naftaleno.

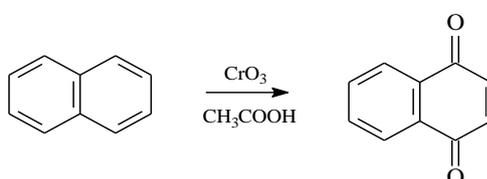
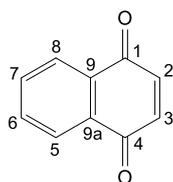


Figura 22: Esquema de reação de obtenção da 1,4-naftoquinona a partir do naftaleno

A tabela 1 mostra os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C para a 1,4-naftoquinona. O ponto de fusão para o composto sintetizado foi de $123,3\text{ }^\circ\text{C}$, semelhante ao da literatura ($123\text{-}124\text{ }^\circ\text{C}$, PERIASAMY e BHATT, 1977).

Tabela 1: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz e 125 MHz, ppm) para a 1,4-naftoquinona



C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1 e 4	184,7	-
2 e 3	138,4	7,00 (s, 2H)
5 e 8	133,6	8,11 (sl, 2H)
6 e 7	126,1	7,87 (sl, 2H)
9 e 9a	131,6	-

A oxidação do naftaleno à 1,4-naftoquinona ocorreu em duas etapas. Na primeira etapa de oxidação, o naftaleno foi transformado em 1-naftol. Em seguida, o 1-naftol foi oxidado para obtenção da naftaleno-1,4-diol, como mostrado na proposta de mecanismo apresentada na figura 1. Como o meio reacional era fortemente oxidante, o naftaleno-1,4-diol foi convertido em 1,4-naftoquinona. Meios oxidantes mais brandos, como meios onde há presença de oxigênio molecular, também são capazes de oxidar o naftaleno-1,4-diol a 1,4-naftoquinona (JEONG *et al.*, 2018). A figura 23 apresenta a proposta de mecanismo para obtenção da 1,4-naftoquinona.

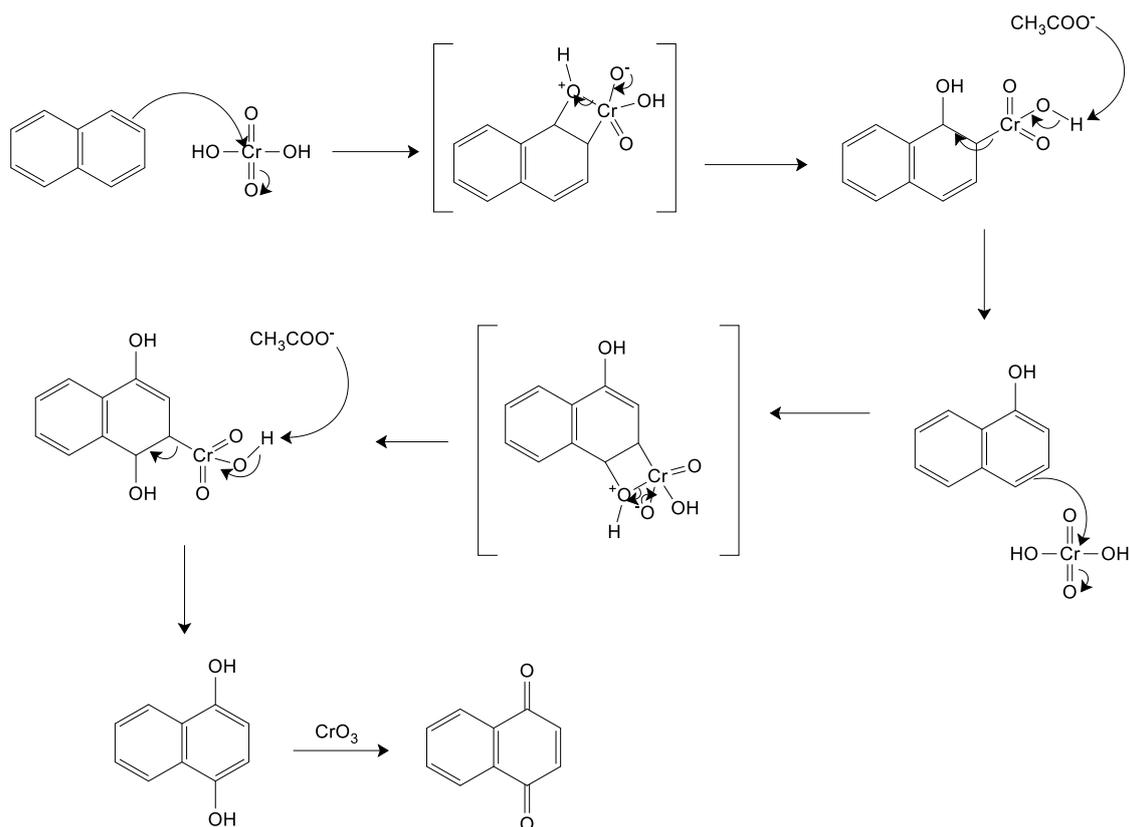


Figura 23: Mecanismo da reação de obtenção da 1,4-naftoquinona a partir do naftaleno (Adaptado de JEONG *et al.*, 2018)

3.2. Preparação dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona

Os amino-derivados da 1,4-naftoquinona foram preparados, por três metodologias diferentes, a partir da 1,4-naftoquinona e as aminas **A** (benzilamina), **B** (fenetilamina), **C** (2-hidroxi-1-aminopropano), **D** (etilenodiamina), **E** [2-(2-aminoetoxi) etanol], **F** (3,3-difenil-1-propanamina), **G** (etanolamina), **H** (1,4-diaminobutano), **I** (1,6-diaminoexano), **J** (1,8-diaminoctano) e **K** (*p*-metóxfenetilamina). Os compostos obtidos receberam os seguintes códigos: **NQA**, **NQB**, **NQC**, **NQD**, **NQE**, **NQF**, **NQG**, **NQH**, **NQI**, **NQJ** e **NQK**, sendo a última letra referente a amina utilizada. A figura 24 mostra o esquema da reação de obtenção dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona.

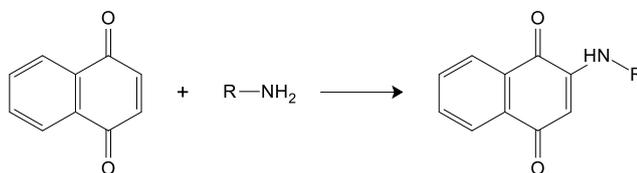


Figura 24: Esquema da reação de obtenção dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona

A caracterização dos produtos obtidos foi realizada através dos espectros de infravermelho, RMN ^1H , ^{13}C , e dos pontos de fusão quando já descritos na literatura, possibilitando confirmar as estruturas apresentadas na figura 25.

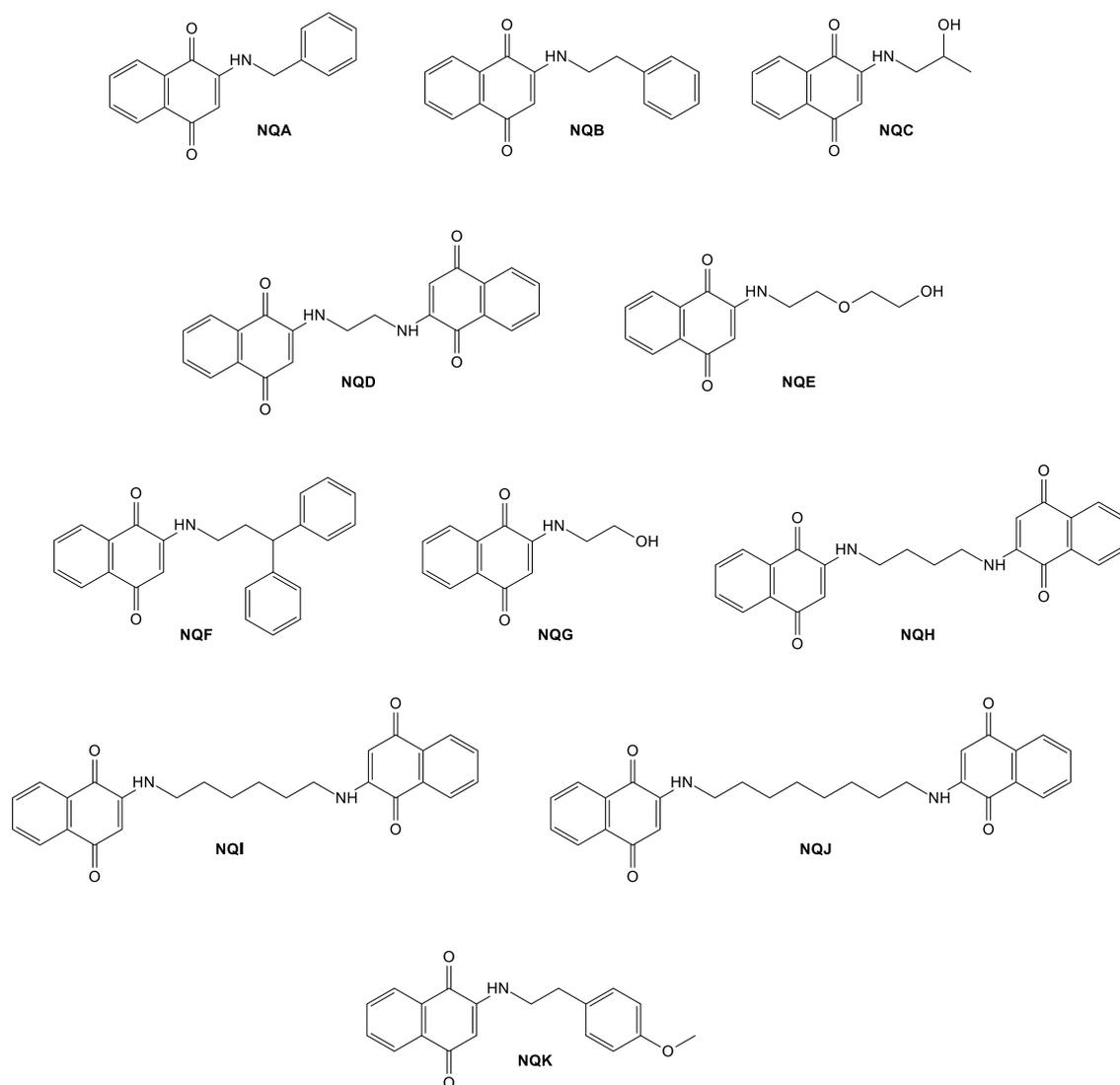


Figura 25: Estruturas dos produtos **NQA-K** sintetizados neste trabalho

O carbono α -carbonílico presente na estrutura da 1,4-naftoquinona, devido ao efeito de ressonância da ligação dupla com a carbonila, apresenta caráter eletrofílico, ficando sujeito a ataques de grupos nucleofílicos como os grupamentos amino, por exemplo. A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C ainda indicaram que a ligação dupla presente no carbono que sofre o ataque nucleofílico foi mantida. A partir dessas observações experimentais, foi proposto o mecanismo de reação para formação dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona, apresentado na figura 26.

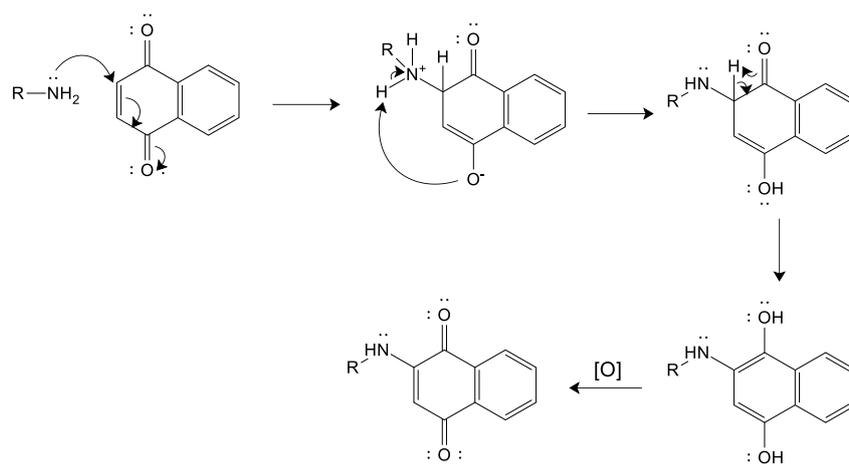


Figura 26: Mecanismo da reação proposto para a obtenção dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona

A síntese dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona foi feita, conforme mencionado, através de três metodologias: a primeira utilizando etanol como solvente e irradiação em banho de ultrassom (1); a segunda utilizando acetonitrila como solvente e irradiação em banho de ultrassom (2); e a terceira utilizando etanol como solvente e reator de micro-ondas científico (3). As metodologias 2 e 3 foram propostas no intuito de melhorar os rendimentos apresentados pela metodologia 1. Notou-se que os rendimentos baixos apresentados na metodologia 1 eram, em grande parte, oriundos da solubilidade do produto formado em etanol. Assim, na metodologia 2, o etanol foi substituído por acetonitrila, na tentativa de melhorar os rendimentos. O solvente acetonitrila foi escolhido por ser mais polar que o etanol, o que conseqüentemente diminuiria a solubilidade dos produtos formados, que apresentam, em sua maioria, caráter menos polar. A volatilidade do solvente também foi considerada para sua escolha. Também foi testada a fonte de irradiação, buscando-se melhorar o rendimento. A tabela 2 mostra os rendimentos para cada um dos produtos obtidos em cada metodologia utilizada.

Tabela 2: Rendimentos obtidos para os derivados aminados da 1,4-naftoquinona utilizando as metodologias 1, 2, 3, e aspectos físicos para os produtos obtidos

Amostra	Aspecto Físico	Rendimento (%)		
		Metodologia 1 ^a	Metodologia 2 ^b	Metodologia 3 ^c
NQA	Sólido laranja	47	75	71
NQB	Sólido vermelho	32	52	53
NQC	Sólido marrom	37	15	71
NQD	Sólido marrom	27	47	71
NQE	Líquido espesso marrom	65	52	29
NQF	Sólido marrom	58	44	67
NQG	Sólido marrom	20	42	39
NQH	Sólido vermelho escuro	93	85	53
NQI	Sólido vermelho escuro	60	70	79
NQJ	Sólido laranja escuro	56	77	84
NQK	Sólido vermelho	44	59	64

^aEtOH como solvente e irradiação em banho de ultrassom; ^bacetonitrila como solvente e banho de ultrassom; ^cEtOH como solvente e irradiação de micro-ondas.

3.2.1. Preparação e caracterização da 2-(benzilamino)-1,4-naftoquinona (NQA)

Os aminoderivados da 1,4-naftoquinona foram sintetizados a partir da 1,4-naftoquinona e aminas diversas. No caso do composto NQA, foi utilizada a benzilamina. O produto formado foi filtrado em papel quantitativo de filtração média e lavado com etanol gelado. Após seco, o sólido laranja obtido foi pesado, determinado o ponto de fusão e analisado por espectroscopia de IV, RMN ¹H e ¹³C.

Observando-se os rendimentos apresentados na síntese do composto NQA (tabela 2) pode-se observar que ao trocar o etanol por um solvente mais polar, no caso a acetonitrila, conseguiu-se um aumento significativo no rendimento, oriundo da diferença de solubilidade do produto formado nos dois solventes (47% em etanol e 75% em acetonitrila). O caráter menos polar do produto fez com que fosse menos solúvel em solventes polares apróticos como a acetonitrila, por exemplo. Também foi observado uma variação no rendimento da reação quando se modificou a fonte de irradiação. Mantendo-se o solvente e variando a fonte de irradiação, observou-se que a utilização do reator de micro-ondas (3), que fornece mais energia ao sistema reacional, garantiu um incremento no rendimento da obtenção do produto (71%) quando comparado ao banho de ultrassom (1).

O ponto de fusão obtido experimentalmente, 156 °C, foi comparado com o ponto de fusão descrito na literatura (PF=156–157 °C, LOHMANN, 1984), no intuito de auxiliar na confirmação do produto obtido.

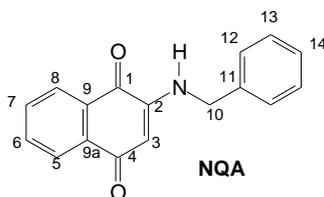
3.2.1.1. Caracterização espectroscópica do composto **NQA**

Os espectros de IV foram obtidos em ATR e observaram-se as bandas de absorção da ligação C–H de carbono aromático na região de 3062 – 3002 cm^{-1} , bandas de absorção da ligação C=O em 1680 cm^{-1} e 1592 cm^{-1} , referentes às duas carbonilas presentes na porção da 1,4-naftoquinona, além de banda de absorção em 3330 cm^{-1} atribuída à ligação N-H.

Nos espectros de RMN ^1H foram observados sinais atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos na estrutura da 1,4-naftoquinona, na região entre 7,64 (H-6) e 8,12 ppm (H-8), além do sinal em 5,81 ppm (H-3), atribuído ao hidrogênio presente no carbono α -carbonílico não substituído.

O espectro de RMN ^{13}C apresentou dois sinais, em 181,9 ppm (C-1) e em 183,1 ppm (C-4), atribuídos aos deslocamentos químicos dos carbonos carbonílicos. Além disso, apresentou um sinal em 101,8 ppm, atribuído ao carbono α -carbonílico (C-3), sinais na região entre 126,3 ppm (C-5) e 147,7 ppm (C-2), atribuídos aos carbonos aromáticos presentes na porção quinoídica. A tabela 3 mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

Tabela 3: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz, CDCl_3 , ppm) para o composto **NQA**



NQA			
H	δ (ppm)	C	δ (ppm)
3	5,81 (s, 1H)	1	181,9
5	8,07 (d, $J=7,57$ Hz, 1H)	2	147,7
6	7,75 (t, $J=7,57$ Hz, 1H)	3	101,8
7	7,64 (t, $J=7,57$ Hz, 1H)	4	183,1
8	8,11 (d, $J=7,57$ Hz, 1H)	5	126,2
10	4,40 (d, $J=5,67$ Hz, 2H)	6	134,8
12 e 14	7,35 (t, $J=6,78$ Hz, 3H)	7	132,1
13	7,40 (t, 1H)	8	127,6
N-H	6,25 (sl, 1H)	9	135,6
		9a	130,5
		10	46,8
		11	135,9
		12	129,0
		13	128,0
		14	126,3

3.2.2. Preparação e caracterização da 2-(fenetilamino)-1,4-naftoquinona (**NQB**) e da 2-(*p*-metóxfenetilamino)-1,4-naftoquinona (**NQK**)

Os aminoderivados **NQB** e **NQK** foram sintetizados de acordo com as três metodologias indicadas anteriormente. Os sólidos obtidos foram filtrados em papel quantitativo de filtração média e lavados com os respectivos solventes. Após secos, os compostos foram pesados, seus pontos de fusão foram determinados sendo obtido o valor de 145,1 °C para **NQB**. O composto **NQK** não fundiu, mas carbonizou. Assim, como para o derivado **NQA**, as metodologias utilizando irradiação por ultrassom ou irradiação de micro-ondas possibilitaram um significativo aumento nos rendimentos. A utilização de reator de micro-ondas garantiu um aumento no rendimento da reação, quando

comparado ao método que utiliza irradiação por banho de ultrassom. Esse aumento de rendimento se deve a maior energia disponibilizada ao meio reacional quando se usa o reator de micro-ondas, aumentando a efetividade da reação. Os produtos foram analisados através das técnicas espectroscópicas de IV, RMN ^1H e ^{13}C , sendo inéditos na literatura.

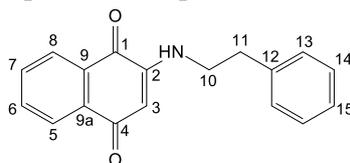
3.2.2.1. Caracterização espectroscópica dos compostos **NQB** e **NQK**

Nos espectros de IV obtidos em ATR foram observados sinais na região de 3031 cm^{-1} a 3060 cm^{-1} , atribuídos aos estiramentos da ligação C–H; 2867 a 2962 cm^{-1} , atribuídos às bandas de absorção da ligação C–H de carbono alifático, dois sinais, o primeiro em 1671 cm^{-1} e o segundo em 1575 cm^{-1} , atribuídos às duas carbonilas presentes na porção quinoídica dos compostos **NQB** e **NQK** e um sinal em 3337 cm^{-1} , atribuído à banda de absorção da ligação N–H.

O espectro de RMN ^1H apresentou sinais na região entre 7,63 ppm (H-6) e 8,12 ppm (H-8), atribuídos aos deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos na porção quinoídica da molécula, um deslocamento em 5,80 ppm, atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono α -carbonílico (H-3), dois sinais, o primeiro em 3,01 ppm (H-11) e o segundo em 3,48 ppm (H-10), atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos alifáticos e um sinal em 7,36 ppm, atribuído ao deslocamento químico dos hidrogênios ligados aos outros carbonos aromáticos do grupo fenetila (H-13, H-14 e H-15).

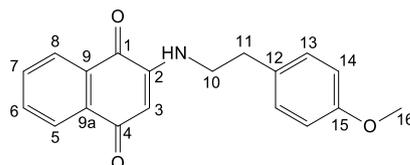
O espectro de RMN ^{13}C apresentou dois sinais, o primeiro em 181,8 ppm (C-1) e o segundo em 183,0 ppm (C-4), atribuídos às duas carbonilas presentes na porção quinoídica do composto. Foram observados, também, os deslocamentos químicos atribuídos aos carbonos alifáticos, em 34,3 ppm (C-11) e em 43,7 ppm (C-10), o deslocamento químico atribuído ao carbono α -carbonílico, em 101,0 ppm (C-3), e os deslocamentos químicos dos carbonos aromáticos, cujos sinais apresentaram-se na região entre 126,3 ppm e 147,7 ppm. A tabela 4 apresenta os deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios dos compostos **NQB** e **NQK**.

Tabela 4: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz, CDCl_3 , ppm) para os compostos **NQB** e **NQK**, respectivamente



NQB			
H	δ (ppm)	C	δ (ppm)
3	5,80 (s, 1H)	1	181,7
5	8,03 (s, 1H)	2	147,7
6	7,74 (m, 1H)	3	101,0
7	7,62 (m, 1H)	4	183,0
8	8,11 (s, 1H)	5	n.o.*
10	3,48 (sl, 2H)	6	134,8
11	3,01 (sl, 2H)	7	132,0
13, 14 e 15	7,36 (m, 3H)	8	126,3
N-H	5,98 (sl, 1H)	9	133,6
		9a	130,5
		10	43,6
		11	34,3
		12	137,8
		13	128,9
		14	128,6
		15	127,0

*n.o. – não observado



NQC

H	δ (ppm)	C	δ (ppm)
3	5,80 (s, 1H)	1	181,7
5	8,03 (d, $J=7,57$ Hz, 1H)	2	147,9
6	7,74 (t, $J=7,41$ Hz, 1H)	3	100,9
7	7,62 (t, $J=7,41$ Hz, 1H)	4	182,9
8	8,02 (d, $J=7,57$ Hz, 1H)	5	126,2
10	3,44 (q, $J=6,73$ Hz, 2H)	6	134,8
11	2,94 (t, $J=7,09$ Hz, 2H)	7	132,0
13	7,15 (d, $J=8,51$ Hz, 2H)	8	126,3
14	6,90 (d, $J=8,51$ Hz, 2H)	9	133,6
16	3,81 (s, 3H)	9a	130,5
N-H	5,98 (sl, 1H)	10	43,9
		11	33,5
		12	129,7
		13	129,6
		14	114,3
		15	158,6
		16	55,3

3.2.3. Preparação e caracterização dos compostos 2-[(2'-hidroxipropil)amino]-1,4-naftoquinona (NQC) e 2-[(1'-hidroxietil)amino]-1,4-naftoquinona (NQG)

Os compostos **NQC** e **NQG** foram sintetizados via as três metodologias já indicadas. Os sólidos obtidos foram filtrados em papel quantitativo de filtração média e, após secos, analisados pelas técnicas espectroscópicas de IV, RMN ^1H e ^{13}C . Os pontos de fusão para os dois compostos foram: 159 °C e 156 °C para **NQC** e **NQG**, respectivamente, sendo inéditos na literatura.

Os rendimentos para obtenção do composto **NQC** mostraram que a modificação do solvente de etanol (metodologia 1) para acetonitrila (metodologia 2) levou à diminuição do rendimento, no entanto houve um aumento significativo quando usou-se a irradiação de micro-ondas.

A utilização de reator de micro-ondas (metodologia 3), como esperado, possibilitou o aumento do rendimento da reação se comparado com a irradiação por banho de ultrassom (metodologia 1).

3.2.3.1. Caracterização espectroscópica dos compostos **NQC** e **NQG**

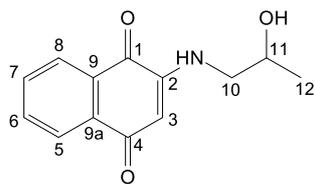
Nos espectros de IV obtidos em ATR para o composto **NQC** foi observado sinal em 3292 cm^{-1} , referente à banda de absorção da ligação O–H, sinais na região entre 2884 e 2971 cm^{-1} , referente a estiramento de ligação C–H de carbono alifático. As bandas de absorção da ligação C=O de carbonila de cetona também foram observados, nos sinais apresentados em 1598 e 1692 cm^{-1} . Para o composto **NQG** foram observados sinais em 3341 cm^{-1} , referente à banda de absorção da ligação O–H, na região entre 2886 e 2978 cm^{-1} , referente às bandas de absorção das ligações C–H características de carbono alifático, além de dois sinais, em 1593 cm^{-1} e 1674 cm^{-1} , atribuídos às bandas de absorção da ligação C=O de cetona.

O espectro de RMN ^1H do composto **NQC** apresenta sinais entre $7,63$ ppm e $8,09$ ppm, atribuídos aos deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos, um sinal em $5,77$ ppm atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono α -carbonílico (H-3) e sinais em $4,16$ ppm (H-11), $3,28$ ppm, $3,15$ ppm (H-10) e $1,35$ ppm (H-12), atribuídos aos carbonos alifáticos. O espectro de RMN ^1H do composto **NQG** apresentou sinais entre $7,64$ ppm e $8,11$ ppm, atribuídos aos deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, um sinal em $5,79$ ppm, atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono α -carbonílico (H-3), além dos sinais atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos alifáticos, em $3,40$ ppm (H-10) e $3,95$ ppm (H-11).

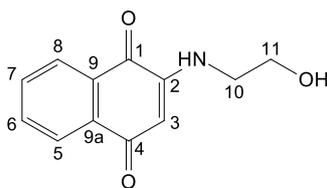
O espectro de RMN ^{13}C do composto **NQC** apresentou dois sinais, em $183,2$ ppm (C-4) e $181,7$ ppm (C-1), atribuídos aos deslocamentos químicos das carbonilas de cetona, um sinal em $101,1$ ppm, atribuído ao carbono α -carbonílico (C-3), além dos sinais na região entre $126,2$ e $148,2$ ppm, atribuídos aos carbonos aromáticos e sinais em $21,4$ ppm (C-12), $49,4$ ppm (C-10) e $65,7$ ppm (C-11), atribuídos aos carbonos alifáticos. Para o composto **NQG** foram observados os sinais atribuídos aos deslocamentos químicos dos carbonos aromáticos, na região entre $126,2$ e $148,2$ ppm e os sinais atribuídos aos carbonos alifáticos, em $44,4$ ppm (C-10) e $60,0$ ppm (C-11). Não foram observados os sinais referentes às carbonilas, possivelmente devido ao pouco tempo de acumulação, que suprimiu a visualização dos carbonos quaternários. Porém, os sinais das carbonilas presentes no espectro de IV permite confirmar a presença das carbonilas características da estrutura da 1,4-naftoquinona.

A tabela 5 apresenta os deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios presentes nas estruturas dos compostos **NQC** e **NQG**.

Tabela 5: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz, CDCl_3 , ppm) para os compostos **NQC** e **NQG**, respectivamente



NQC			
H	δ (ppm)	C	δ (ppm)
3	5,77 (s, 1H)	1	181,7
5	8,09 (d, $J=7,5$ Hz, 1H)	2	148,2
6	7,74 (t, 1H)	3	101,1
7	7,63 (t, 1H)	4	183,2
8	8,04 (d, $J=7,5$ Hz, 1H)	5	126,2
10	3,15 (t, 1H) 3,28 (t, 1H)	6	132,1
11	4,16 (m, 1H)	7	134,8
12	1,35 (d, 3H)	8	126,3
N-H	6,29 (sl, 1H)	9	133,5
		9a	130,5
		10	49,4
		11	65,7
		12	21,4



NQJ			
H	δ (ppm)	C	δ (ppm)
3	5,79 (s, 1H)	1	n.o.*
5	8,11 (d, $J=6,25$ Hz, 1H)	2	148,2
6	7,75 (t, 1H)	3	101,1
7	7,64 (t, 1H)	4	n.o.*
8	8,07 (d, $J=6,25$ Hz, 1H)	5	126,2
10	3,40 (q, $J=5,36$ Hz, 2H)	6	132,1
11	3,95 (q, $J=5,36$ Hz, 2H)	7	134,8
N-H	6,29 (sl, 1H)	8	126,4
		9	n.o.*
		9a	n.o.*
		10	44,4
		11	60,0

n.o.* - não observado

3.2.4. Preparação e caracterização dos compostos 2,2''-[etano-1',2'-di-ildi(amino)]-di-1,4-naftoquinona (**NQD**), 2,2''-[butano-1',2'-di-ildi(amino)]-di-1,4-naftoquinona (**NQH**), 2,2''-[hexano-1',2'-di-ildi(amino)]-di-1,4-naftoquinona (**NQI**) e 2,2''-[octano-1',2'-di-ildi(amino)]-di-1,4-naftoquinona (**NQJ**)

A síntese dos compostos **NQD**, **NQH**, **NQI** e **NQJ** foi realizada através das três metodologias, já indicadas, utilizando a 1,4-naftoquinona e a respectiva diamina. O sólido obtido foi filtrado utilizando papel quantitativo de filtração média e lavado com o solvente gelado utilizado na respectiva metodologia. Após seco, o sólido foi pesado para cálculo do rendimento, foram feitos os ensaios espectroscópicos para caracterização do produto e foi determinado o ponto de fusão. A tabela 6 apresenta as características físicas, os rendimentos e os pontos de fusão para os compostos sintetizados, sendo todos ainda não descritos na literatura.

Tabela 6: Aspectos físicos, rendimentos e pontos de fusão dos compostos **NQD**, **NQH**, **NQI** e **NQJ**

Composto	Metodologia (%)			Ponto de fusão (°C)
	1	2	3	
NQD	27	47	71	144
NQH	93	85	53	165
NQI	60	70	79	126
NQJ	56	77	84	130

Como esperado e observado nas sínteses dos demais compostos, a troca do solvente etanol (metodologia 1) por um solvente mais polar, como a acetonitrila (metodologia 2) diminui a solubilidade do produto, melhorando o rendimento na obtenção dos compostos **NQD**, **NQI** e **NQJ**. Somente o composto **NQH** apresentou valores de rendimento contrários ao esperado. Como esperado também, a substituição da irradiação por banho de ultrassom pela irradiação de micro-ondas aumentou o rendimento das reações de obtenção dos compostos **NQD**, **NQI** e **NQJ**, devido ao aumento da energia incorporada ao meio reacional, aumentando a efetividade da reação. Novamente, para o composto **NQH** observou-se comportamento contrário ao esperado, sendo a única diferença o tamanho da cadeia carbônica, ou seja, com um grupo CH₂ a menos do que para os outros compostos.

3.2.4.1. Caracterização espectroscópica dos compostos **NQD**, **NQH**, **NQI** e **NQJ**

Os compostos foram caracterizados por espectroscopia de IV, RMN ¹H e ¹³C. O espectro de IV mostrou sinais na região entre 2936 e 2958 cm⁻¹, atribuídos às bandas de absorção da ligação C–H de carbonos alifáticos e sinais em 1591 cm⁻¹ e em 1682 cm⁻¹, atribuídos às bandas de absorção da ligação C=O de cetona.

Diferente dos demais amino-derivados da 1,4-naftoquinona, os compostos **NQH**, **NQI** e **NQJ** apresentaram baixa solubilidade em clorofórmio deuterado (CDCl₃) e, por isso, os espectros desses compostos foram obtidos em DMSO deuterado (DMSO-d₆). O espectro de RMN ¹H para o composto **NQD** apresentou sinais entre 7,57 ppm e 8,11 ppm, referentes aos deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos, um sinal em 5,65 ppm, característico do hidrogênio ligado ao carbono α-carbonílico (H-3) e um sinal em 3,75 ppm (H-10), referente aos carbonos alifáticos.

O espectro de RMN ¹H do composto **NQH** apresentou sinais que possibilitaram confirmar a estrutura do produto proposto. O deslocamento químico referente ao hidrogênio ligado ao carbono α-carbonílico pode ser observado em 5,67 ppm (H-3). Além dos sinais referentes aos deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos foram observados na região entre 7,58 ppm e 7,96 ppm.

O espectro de RMN ¹H para o composto **NQI** apresentou sinais na região entre 7,65 ppm e 8,02 ppm, referentes aos deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos, além de apresentar um sinal em 5,74 ppm, deslocamento químico característico do hidrogênio ligado ao carbono α-carbonílico (H-3). Também são observados os sinais 3,36 ppm (H-10), 1,41 ppm (H-11) e 1,24 ppm (H-12) atribuídos aos deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados aos carbonos alifáticos.

O espectro de RMN ¹H do composto **NQJ** apresentou sinais na região entre 7,55 ppm e 7,96 ppm, atribuídos aos deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos, um sinal em 5,65 ppm, atribuído ao deslocamento químico atribuído ao carbono α-carbonílico (H-3).

Os espectros de ^{13}C para os quatro compostos apresentaram sinais que permitiram confirmar as estruturas propostas para os produtos. Porém, também foram identificados outros sinais nos espectros dos compostos **NQH**, **NQI** e **NQJ** que, pela intensidade e valores de deslocamento químico, foram atribuídos às impurezas. A recristalização dos produtos utilizando etanol ou acetonitrila como solventes foi realizada, na tentativa de eliminar as impurezas que contaminavam os produtos. Como não se obteve sucesso na purificação dos três compostos, estes não foram submetidos aos ensaios biológicos, até que se determine uma metodologia eficiente de purificação destes.

3.2.5. Preparação e caracterização do composto 2-[(3',3'-difetilpropil)amino]-1,4-naftoquinona (**NQF**)

A síntese do composto **NQF** foi realizada a partir da 1,4-naftoquinona e a 3,3-difenilpropilamina pelas três metodologias já indicadas. O sólido obtido foi filtrado em papel quantitativo de filtração média e lavado com o solvente utilizado na respectiva metodologia. Após seco, o material foi pesado para cálculo do rendimento, foi determinado o ponto de fusão em 152 °C e, foi feita a caracterização espectroscópica através das técnicas de infravermelho IV, RMN ^1H e ^{13}C . Este composto, também ainda não foi descrito na literatura.

3.2.5.1. Caracterização espectroscópica do composto **NQF**

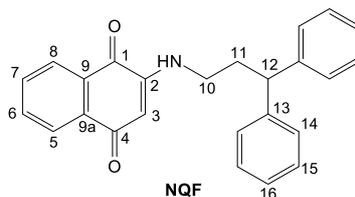
O composto **NQF** foi caracterizado pelas técnicas espectroscópicas de infravermelho IV, RMN ^1H e ^{13}C .

O espectro de IV apresentou sinais na região entre 2885 e 3060 cm^{-1} , referentes às bandas de absorção das ligações C–H de carbonos alifáticos e aromáticos. Além destas, foram observados dois sinais, em 1591 cm^{-1} e 1676 cm^{-1} , atribuídos à banda de absorção da ligação C=O de quinonas.

O espectro de RMN ^1H mostrou sinais na região entre 7,65 ppm e 8,12 ppm, atribuídos aos deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados aos carbonos aromáticos da porção quinoídica. Além destes, foi observado um singlete em 5,65 ppm, atribuído ao deslocamento químico do hidrogênio ligado ao carbono α -carbonílico (H-3) e um multiplete em 7,33 ppm, com integração para oito hidrogênios, atribuído aos demais hidrogênios ligados aos dois anéis aromáticos pertencentes à porção da molécula proveniente da amina (H-13, H-14, H-15 e H-16). Os hidrogênios ligados aos carbonos alifáticos também foram observados no espectro de hidrogênio, com sinais em 2,47 ppm (quarteto, H-11), 3,18 ppm (quarteto, H-12) e em 4,03 ppm (triplete, H-10).

O RMN ^{13}C permitiu observar a presença de sinais atribuídos aos deslocamentos químicos das duas carbonilas presentes na porção quinoídica da molécula, em 181,9 ppm (C-4) e 182,9 ppm (C-1). Na região entre 126,2 ppm e 147,8 ppm foram observados os sinais referentes aos carbonos aromáticos presentes na porção quinoídica e na porção proveniente da amina. O sinal atribuído ao carbono α -carbonílico (C-3), em 101,0 ppm, também pode ser observado no espectro de RMN ^{13}C . Os deslocamentos químicos atribuídos aos carbonos alifáticos também foram observados, com sinais em 33,8 ppm (C-11), 41,2 ppm (C-12) e 48,9 ppm (C-10). A tabela 7 apresenta todos os deslocamentos químicos para o composto **NQF**.

Tabela 7: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz, CDCl_3 , ppm) para o composto **NQF**



NQF			
H	δ (ppm)	C	δ (ppm)
3	5,65 (s, 1H)	1	181,9
5	8,11 (d, $J=7,57$ Hz, 1H)	2	147,8
6	7,74 (t, $J=7,57$ Hz, 1H)	3	101,0
7	7,62 (t, $J=7,57$ Hz, 1H)	4	182,9
8	8,05 (d, $J=7,57$ Hz, 1H)	5	126,7
10	3,18 (dd, $J=6,62$ Hz, 2H)	6	134,8
11	2,47 (dd, $J=7,46$ Hz, 2H)	7	132,0
12	4,03 (t, $J=8,04$ Hz, 1H)	8	127,6
14	7,33 (t, $J=7,57$ Hz, 4H)	9	133,6
15	7,27 (sl, 4H)	9a	130,5
16	7,23 (t, $J=7,25$ Hz, 2H)	10	41,2
N-H	5,93 (sl, 1H)	11	33,8
		12	48,9
		13	143,6
		14 e 15	128,8
		16	126,3

3.3. Ensaio para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para bactérias

A concentração inibitória mínima foi determinada através de ensaios em microplacas utilizando o revelador cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (*p*-INT). A revelação consiste na redução do grupamento nitro presente no cloreto de *p*-INT por enzimas nitroreduases presentes em bactérias viáveis. O surgimento de coloração vermelha nos poços indica que há atividade bacteriana. Se a cor não se alterar com a adição do *p*-INT, pode-se afirmar que houve inibição da atividade bacteriana. Para este ensaio foi utilizado o antibiótico

padrão cloranfenicol como controle positivo. Além disso, ainda foi feito um controle de viabilidade das culturas utilizadas, um controle de esterilidade, para garantir que não havia culturas competidoras no ensaio e um controle com DMSO, para investigar a interferência do solvente no crescimento bacteriano. Foram escolhidos seis dos 11 amino-derivados sintetizados e, estes compostos foram testados frente a 9 cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A tabela 8 mostra os valores de CIM, em $\mu\text{g/mL}$, para os compostos ensaiados.

Tabela 8: Valores de CIM dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona testados frente às nove cepas de bactérias

Amostra	Bactérias CIM ($\mu\text{g/mL}$)								
	Gram-positivas				Gram-negativas				
	Bs	Sa	Ef	Bc	Pa	Ec	Ab	Kp1	Kp2
NQA	125	31,2	250	31,2	500	31,2	500	NI	250
NQB	NI	62,5	NI	125	NI	NI	500	NI	250
NQC	62,5	62,5	62,5	62,5	500	62,5	250	NI	62,5
NQD	NI	500	NI	NI	500	NI	500	NI	500
NQF	NI	250	NI	NI	NI	NI	500	NI	NI
NQG	62,5	62,5	62,5	62,5	250	62,5	125	250	31,2
Cloranfenicol	8	8	16	8	64	16	NI	64	16
DMSO	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Crescimento	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esterilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Bs: *Bacillus subtilis*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ef: *Enterococcus faecalis*;
 Bc: *Bacillus cereus*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Ec: *Escherichia coli*;
 Ab: *Acinetobacter baumannii*; Kp1: *Klebsiella pneumoniae*;
 Kp2: *Klebsiella pneumoniae* β -lactamase positiva

Observando-se os valores de CIM apresentados na tabela 8, pode-se destacar quatro dos seis compostos ensaiados. O composto NQA apresentou valores de CIM satisfatórios frente às cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, com CIM=31,2 $\mu\text{g/mL}$. Apesar dos valores de CIM para NQA terem se apresentado maiores do que para o cloranfenicol, esse composto pode ser considerado um potencial protótipo para agente antibacteriano considerando-se que o cloranfenicol apresenta sérios efeitos colaterais. A Organização para Alimentação e Agricultura da Organização Mundial da Saúde (*Food and Agriculture Organization/ World Health Organization - FAO/WHO*) em estudos desenvolvidos sobre o cloranfenicol, declarou que a ingestão deste fármaco pode levar ao desenvolvimento de anemia aplástica, além de apresentar efeitos genotóxicos aos seres humanos, não sendo determinado nem o valor de ingestão diária aceitável para esse composto (KIKUCHI *et al.*, 2017).

O composto NQB, apesar de não apresentar atividade contra a maioria das cepas ensaiadas, apresentou um resultado interessante para *S. aureus*, com valor de CIM de 62,5

µg/mL, podendo também ser considerado um potencial candidato à agente antibacteriano com atividade específica para tratamento de *S. aureus*.

O composto **NQC** mostrou-se um dos mais ativos, apresentando valores de CIM satisfatórios frente a cepas de bactérias Gram-positivas (*B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus*) e Gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae* β-lactamase positiva). Deve-se destacar o valor de CIM apresentado pelo composto **NQC** frente à cepa de *K. pneumoniae* β-lactamase resistente, que são espécies causadoras de infecções em unidades de terapia intensiva e que, normalmente, apresenta resistência à fármacos antibacterianos da classe dos β-lactâmicos, medicamentos muito utilizados para tratamento de bactérias do gênero *Klebsiella spp.* Além disso, bactérias deste gênero podem ainda desenvolver resistências aos fármacos da série dos aminoglicosídeos e também ao cloranfenicol (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Em vista disso, o desenvolvimento de novos candidatos à fármacos para substituição dos fármacos comerciais ou complementação dos tratamentos já conhecidos é de grande importância nas circunstâncias atuais.

O composto **NQG** também apresentou valores de CIM satisfatórios, mostrando atividade para todas as cepas com valores de CIM entre 250-31,2 µg/mL, podendo-se destacar o CIM de 31,2 µg/mL frente à cepa *K. pneumoniae* β-lactamase positiva, sendo também um excelente candidato à complementação dos tratamentos convencionais ou ainda a substituir os fármacos comerciais já existentes.

Embora os compostos **NQA** e **NQG** já tenham sido descritos na literatura, suas aplicações como potenciais agentes antibacterianos ainda não foram relatadas. Ensaio de toxicidade também devem ser realizados para determinar os valores de DL₅₀ para todos os compostos que apresentaram atividade antibacteriana satisfatória.

Os experimentos envolvendo a avaliação antibacteriana dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona foram realizados pelas pesquisadoras da FIOCRUZ, Dra. Rojane de Oliveira Paiva e Dra. Gisela Lara da Costa.

3.4. Estudo da interação entre a albumina sérica humana (ASH) e os amino-derivados da 1,4-naftoquinona

3.4.1. Ensaio de Supressão por Fluorescência

A supressão por fluorescência é uma técnica muito empregada no estudo da interação entre proteínas e moléculas biologicamente ativas. A soro albumina humana (ASH - Albumin Serum Human) tem sido frequentemente utilizada nestes estudos devido à sua comprovada participação na biodisponibilidade de fármacos e demais moléculas que apresentam algum tipo de ação sobre o organismo humano (PÓOR *et al.*, 2017). Este ensaio baseia-se na supressão de fluorescência do resíduo do aminoácido triptofano (Trp) presente no domínio IIA da proteína ASH que ocorre em decorrência de interações de moléculas com este sítio receptor.

Para este ensaio foram selecionados os três amino-derivados da 1,4-naftoquinona, **NQA**, **NQC** e **NQG**, que apresentaram melhores valores de CIM nos ensaios de atividade anti-bacteriana. Às soluções contendo tampão PBS e ASH foram adicionadas alíquotas sucessivas de solução dos compostos ensaiados e a emissão foi medida. As figuras 24, 25 e 26 apresentam os gráficos de fluorescência em estado estacionário para os três compostos ensaiados.

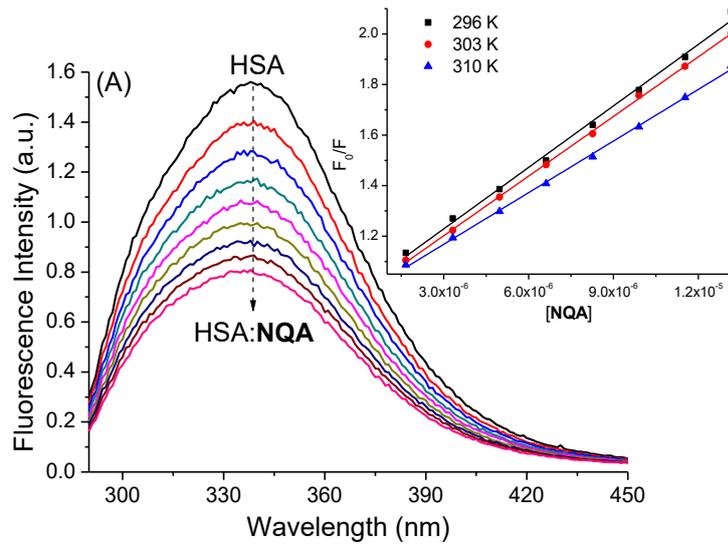


Figura 27: Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para HSA livre e após adições sucessivas de **NQA** a pH = 7,4 e 310K. $[HSA] = 1,00 \times 10^{-5}$ M, $[NQA] = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15$ e $1,32 \times 10^{-5}$ M. Inserção: Gráficos Stern-Volmer para HSA:NQA a 296 K, 303 K e 310 K.

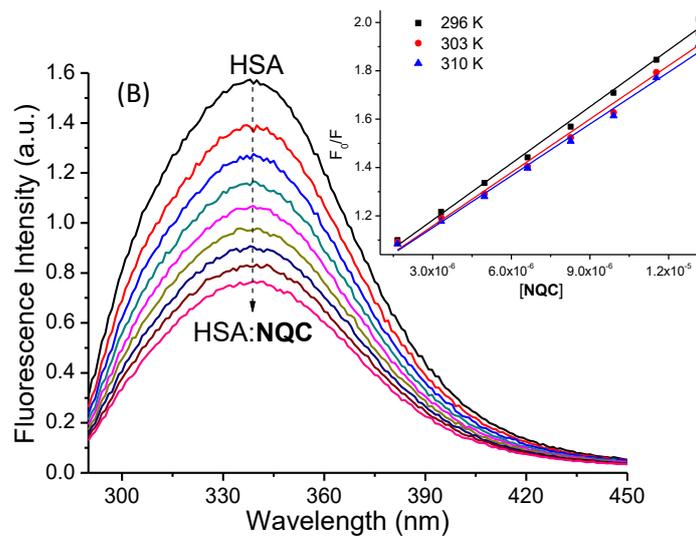


Figura 28: Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para HSA livre e após adições sucessivas de **NQC** a pH = 7,4 e 310K. $[HSA] = 1,00 \times 10^{-5}$ M, $[NQC] = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15$ e $1,32 \times 10^{-5}$ M. Inserção: Gráficos Stern-Volmer para HSA:NQC a 296 K, 303 K e 310 K.

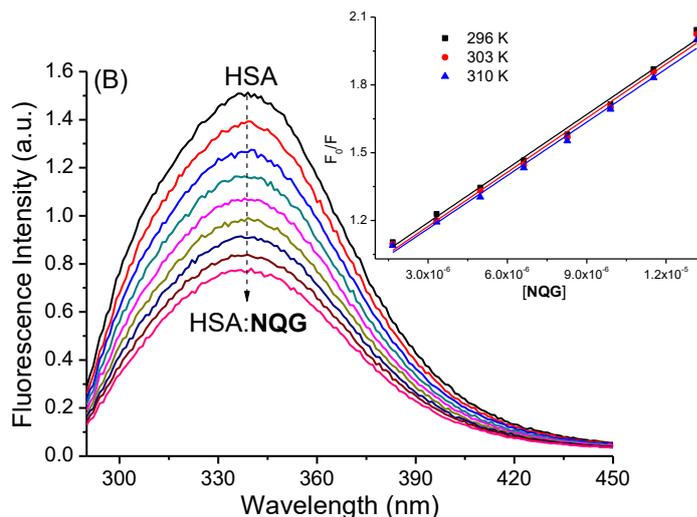


Figura 29: Espectros de emissão de fluorescência em estado estacionário para HSA livre e após adições sucessivas de **NQG** a pH = 7,4 e 310K. $[HSA] = 1,00 \times 10^{-5}$ M, $[NQG] = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15$ e $1,32 \times 10^{-5}$ M. Inserção: Gráficos Stern-Volmer para HSA:NQG a 296 K, 303 K e 310 K.

Observando as figuras 24, 25 e 26, pode-se verificar que após sucessivas adições de solução dos três compostos ensaiados há uma diminuição na intensidade da fluorescência do resíduo de triptofano presente na ASH, indicando que os compostos **NQA**, **NQC** e **NQG** formam interações com a proteína ASH ou que, de alguma maneira, estão próximos do resíduo de Trp, modificando a conformação da proteína e, conseqüentemente, diminuindo a fluorescência final medida.

Também foi estudada a variação da fluorescência do resíduo de Trp com a temperatura, em diversas concentrações (gráficos de Stern-Volmer). Os gráficos foram construídos utilizando a equação

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q]$$

Onde, F_0 e F são as medidas da intensidade de fluorescência da proteína ASH na ausência e na presença dos compostos ensaiados; K_{sv} é coeficiente de extinção de Stern-Volmer; e $[Q]$ é a concentração molar da espécie ensaiada nas temperaturas de 296, 303 e 310 K. A temperatura de 310 K foi escolhida como temperatura limite por ser a temperatura de funcionamento ideal média do corpo humano (36,5 °C). Também foram determinados os valores da constante de Stern-Volmer ajustada (K_a), através da equação:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{fK_a[Q]} + \frac{1}{f}$$

onde, F_0 e F são as intensidades de fluorescência de ASH na ausência e na presença do ligante a 340 nm, respectivamente; K_a é a constante de ligação de Stern-Volmer modificada; f é a fração da fluorescência inicial que é acessível ao inibidor e $[Q]$ é a

concentração do ligante. A tabela 9 apresenta os valores de K_{sv} e K_a obtidos a partir dos dados experimentais.

Tabela 9: Valores das constantes de ligação Stern-Volmer e constante de ligação modificada, K_{sv} e K_a , respectivamente, para os compostos **NQA**, **NQC** e **NQG**

Composto	Temperatura (K)	K_{sv} ($\times 10^4$) (mol.L ⁻¹)	K_a ($\times 10^4$) (mol.L ⁻¹)
NQA	296	8,11±0,02	8,98±0,26
	303	7,86±0,07	4,54±0,26
	310	6,81±0,09	2,76±0,26
NQC	296	7,82±0,02	3,83±0,26
	303	7,37±0,03	2,88±0,26
	310	7,15±0,02	2,14±0,26
NQG	296	7,98±0,02	4,66±0,26
	303	7,95±0,02	3,25±0,26
	310	7,86±0,02	2,33±0,26

Os valores obtidos para as constantes de Stern-Volmer ficaram na faixa de $2,14 \times 10^4$ a $7,98 \times 10^4$ considerada uma interação moderada entre os compostos avaliados e a albumina sérica (CHAVES *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2005). Esses valores indicaram uma interação molecular moderada importante, pois favoreceria a candidatura desses compostos a novos fármacos para a quimioterapia antibiótica, uma vez que, interações fracas levam a metabolização muito rápida do fármaco prejudicando sua atuação e, interações fortes levam a efeitos colaterais indesejáveis (BARROS *et al.*, 2016).

A supressão de uma espécie fluorescente pode acontecer via dois mecanismos distintos: o estático e o dinâmico e o gráfico de Stern-Volmer nos permite compreender qual o mecanismo envolvido na extinção da fluorescência. Avaliando a inclinação da reta no gráfico de Stern-Volmer para o composto **NQA** podemos observar uma diminuição no valor de K_{sv} com a temperatura, também observado nos dados obtidos experimentalmente e apresentados na tabela 9, mostrando que o provável mecanismo de extinção da fluorescência é estático, que se dá pela formação de interação no estado fundamental entre a ASH (fluoróforo) e o composto **NQA** (inibidor de fluorescência). A confirmação do mecanismo estático pode ser feita através do ensaio de fluorescência resolvida no tempo (CHAVES, 2017).

Para o composto **NQC** também foi observada diminuição dos valores de K_{sv} com a temperatura, como mostrado pela inclinação da reta do gráfico de Stern-Volmer para a interação ASH:**NQC**, também mostrando que o mecanismo de extinção da fluorescência é estático.

Para o composto **NQG**, observa-se, tanto pela inclinação do gráfico de Stern-Volmer, quanto pelos valores de K_{sv} observados na tabela 9, que não houve variação significativa nos valores da constante de Stern-Volmer, excluindo-se assim, o mecanismo estático.

Os experimentos envolvendo a interação dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona com a HSA foram realizados em colaboração com os professores Otávio Augusto Chaves e José Carlos Ferreira Netto da UFRRJ.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As metodologias empregadas na síntese dos amino-derivados da 1,4-naftoquinona apresentaram rendimentos e pureza satisfatórios. As metodologias 2 e 3 apresentaram os melhores rendimentos, com destaque para a metodologia 3, com emprego de reator de micro-ondas, que apresentou, de modo geral, melhores rendimentos. Os espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H confirmam as estruturas propostas para os produtos obtidos.

Para a purificação dos compostos **NQH**, **NQI** e **NQJ** será estudado o melhor método, uma vez que a recristalização não foi eficiente.

Os compostos **NQA**, **NQB**, **NQC** e **NQG** apresentaram bons resultados contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, podendo ser protótipos de fármacos antibacterianos.

Os valores de interação entre os compostos **NQA**, **NQC** e **NQG** e a soro albumina humana mostram que estes compostos apresentariam boa biodisponibilidade no organismo humano.

Na continuidade deste trabalho serão avaliadas as atividades antibacterianas dos compostos não ensaiados. A toxidez geral dos compostos também será determinada através do ensaio de toxidez da *Artemia salina* Leach.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados foram:

- Banho de ultrassom SPLabor
- Reator de micro-ondas CEM Discover System (0-300 W, magneto de 2.450 MHz)
- Balança de precisão Shimadzu ATX224 de quatro casas decimais
- Câmara de UV Boitton 365 UV-A para revelação de placas cromatográficas
- Aparelho de ponto de fusão Gehaka PF 1500 Farma
- Espectrômetro Bruker Vertex 70
- Espectrômetro Bruker Ultrashield Plus 500 (^1H , 500 MHz e ^{13}C , 125 MHz)

5.2. Reagentes e solventes

Para a síntese da 1,4-naftoquinona e dos aminoderivados da 1,4-naftoquinona foram utilizados: naftaleno (CAS 91-20-3), trióxido de cromo (CAS 1333-82-0) e ácido acético glacial Dinâmica (CAS 64-19-7), benzilamina Cambridge Isotopes Laboratories Inc. (CAS 100-46-9), fenetilamina (CAS 64-04-0), etilenodiamina (CAS 107-15-3), 3,3-difenil-1-propanamina (CAS 5586-73-2), etanolamina (CAS 141-43-5), todas Sigma Aldrich. A amina 2-hidróxi-1-propanamina foi doada pela empresa Quaker.

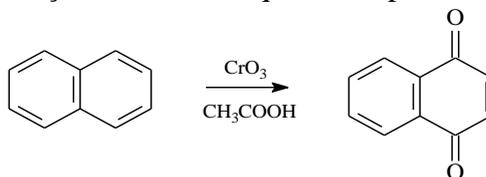
As reações foram monitoradas utilizando-se CCD em placas da Merck (Silica Gel 60 F₂₅₄) e, reveladas através da fluorescência com irradiação em $\lambda = 365$ nm.

Na caracterização dos compostos foram utilizados clorofórmio deuterado Sigma Aldrich (CAS 865-49-6) e dimetilsulfóxido deuterado Sigma Aldrich (CAS 2206-27-1).

5.3. Síntese

5.3.1. Obtenção da 1,4-naftoquinona

A obtenção da 1,4-naftoquinona foi realizada de acordo com metodologia proposta na literatura (Organic Synthesis Collective, volume IV), onde a uma solução de 2,0 g de trióxido de cromo (VI) em 2,5 mL de ácido acético glacial foram adicionados 10 mL de uma solução preparada a partir de 1 g de naftaleno em ácido acético 80% (v/v). A reação foi mantida sob agitação magnética por 24 h e, em banho de gelo. Após esse tempo, a mistura reacional, de coloração verde, foi adicionada em água destilada, para obtenção de um precipitado amarelo, que foi filtrado, lavado com água gelada, para remoção do excesso de ácido acético e, após seco, foi caracterizado por ponto de fusão. O Esquema 1 mostra a reação para a obtenção da 1,4-naftoquinona a partir do naftaleno.



Esquema 1: Reação para a obtenção da 1,4-naftoquinona

5.3.2. Preparação dos aminoderivados da 1,4-naftoquinona

Foram sintetizados dez aminoderivados da 1,4-naftoquinona utilizando-se três metodologias diferentes, usando-se as aminas mostradas no Esquema 2.

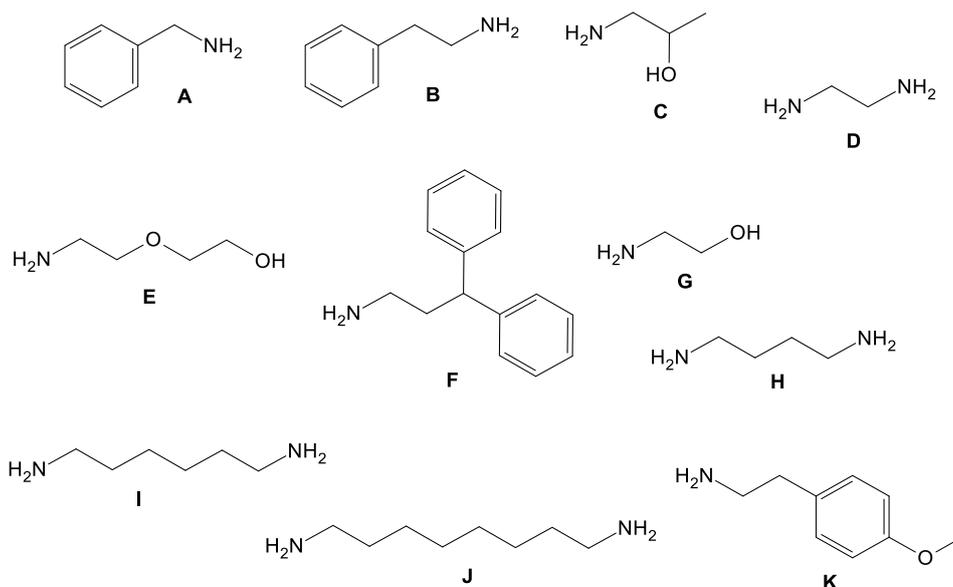


Figura 30: Aminas utilizadas na síntese dos aminoderivados da 1,4-naftoquinona

Metodologia 1

1 mmol da 1,4-naftoquinona foi solubilizado em 2 mL de etanol e a solução obtida colocada em banho de ultrassom. Logo após, adicionou-se 1,5 mmol da amina correspondente e a mistura da reação foi mantida em banho de ultrassom, a temperatura ambiente, por 1 hora. A formação do produto foi acompanhada por cromatografia em camada delgada utilizando como eluente solução de hexano:acetato de etila (70:30). O sólido obtido foi filtrado em papel de filtro quantitativo de filtração média e lavado com etanol PA.

Metodologia 2

1 mmol de 1,4-naftoquinona foi solubilizado em 2 mL de acetonitrila e a solução obtida colocada em banho de ultrassom. Em seguida, foi adicionado 1,5 mmol da amina correspondente e a mistura da reação foi mantida em banho de ultrassom, a temperatura ambiente, por 1 hora. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada utilizando solução de hexano:acetato de etila (70:30) como eluente. O sólido obtido foi filtrado em papel de filtro quantitativo de filtração média e lavado com acetonitrila PA.

Metodologia 3

Nesta metodologia foi usado reator de microondas científico, onde 1 mmol de 1,4-naftoquinona e 1,5 mmol da amina correspondente foram solubilizados em 2 mL de etanol e mantidos por 1 hora sob a irradiação de microondas. O sólido obtido foi filtrado em papel de filtro quantitativo de filtração média e lavado com etanol PA.

5.3.2.1. Caracterização dos aminoderivados da 1,4-naftoquinona

¹rendimento obtido pela metodologia 1

²rendimento obtido pela metodologia 2

³rendimento obtido pela metodologia 3

2-(benzilamino)-1,4-naftoquinona (NQA)

sólido laranja brilhante; rendimento: 47%¹, 75%², 71%³; ponto de fusão: 156 °C (154,7-155,7 °C, CUNHA *et al.*, 2010); IV (ATR cm⁻¹): ν 3061; 3032; 3002 (N-H), 1680; 1592 (C=O), 2360; 2341 (C-N), 1558; 1440 (C=C); RMN ¹H (CDCl₃): δ 8,12 (d, J = 5,00 Hz,

1H, H-8), 8,08 (d, $J = 5,00$ Hz, 1H, H-5), 7,75 (t, $J = 7,57$ Hz, 1H, H-6), 7,64 (t, $J = 7,57$ Hz, 1H, H-7), 7,35 (m, 5H, H-12, H-13 e H-14), 5,81 (s, 1H, H-3), 4,40 (d, $J = 5,67$ Hz, 2H, H-10); RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 183,1 C-4, 181,9 C-1, 147,7 C-2, 135,9 C-11, 134,8 C-6, 133,5 C-9, 132,1 C-7, 130,5 C-9a, 129,0 C-12 e C-13, 128,2 C-14, 127,6 C-8, 126,3 C-5, 101,8 C-3, 46,8 C-10.

2-(fenetilamino)-1,4-naftoquinona (NQB)

sólido vermelho brilhante; rendimento: 32%¹, 52%², 40%³; ponto de fusão: 145,1 °C; IV (ATR cm^{-1}): ν 3060; 3036; 3031 (N-H), 2962; 2919; 2867 (C-H), 2360; 2341 (C-N), 1671; 1595 (C=O), 1618; 1567; 1465 (C=C); RMN ^1H (CDCl_3): δ 8,12 (sl, 1H, H-8), 8,04 (sl, 1H, H-5), 7,74 (sl, 1H, H-6), 7,63 (sl, 1H, H-7), 7,36 (m, 5H, H-13, H-14, H-15), 5,80 (sl, 1H, H-3), 3,48 (sl, 2H, H-10), 3,01 (sl, 2H, H-11); RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 183,1 C-4, 181,7 C-1, 147,7 C-2, 137,8 C-12, 134,8 C-6, 133,6 C-9, 132,0 C-7, 130,5 C-9a, 128,9 C-13 e C-14, 128,6 C-15, 127,0 C-8, 101,0 C-3, 43,6 C-10, 34,3 C-11.

2-[(2'-hidroxipropil)amino]-1,4-naftoquinona (NQC)

sólido marrom; rendimento: 37%¹, 15%², 71%³; ponto de fusão: 159 °C; IV (ATR cm^{-1}): ν 3292 (O-H), 2971; 2936; 2907; 2884 (C-H), 2359; 2342 (C-N), 1682; 1598 (C=O), 1623; 1564; 1470 (C=C); RMN ^1H (CDCl_3): δ 8,10 (d, $J = 7,57$ Hz, 1H, H-8), 8,04 (d, $J = 7,57$ Hz, 1H, H-5), 7,74 (t, $J = 7,25$ Hz, 1H, H-6), 7,63 (t, $J = 7,25$ Hz, 1H, H-7), 6,29 (sl, 1H, N-H), 5,77 (s, 1H, H-3), 4,16 (m, 1H), 3,28 (m, 1H), 3,15 (m, 1H), 1,34 (d, $J = 5,99$ Hz, 3H); RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 183,2 C-4, 181,7 C-1, 148,2 C-2, 134,8 C-6, 133,5 C-9, 132,1 C-7, 130,5 C-9a, 126,3 C-8, 126,2 C-5, 101,1 C-3, 65,7 C-11, 49,4 C-10, 21,4 C-12.

2,2''-[etano-1',2'-di-ildi(amino)]-di-1,4-naftoquinona (NQD)

sólido marrom; rendimento: 27%¹, 47%², 71%³; ponto de fusão: 144 °C; IV (ATR cm^{-1}): ν 3052 (N-H), 2958; 2936 (C-H), 2359; 2342 (C-N), 1682; 1591 (C=O), 1613; 1561; 1455 (C=C); RMN ^1H (CDCl_3): δ 8,11 (d, $J = 5,67$ Hz, 1H, H-8), 7,79 (d, $J = 5,99$ Hz, 1H, H-6), 7,55 (sl, 1H, H-7), 6,70 (s, 1H, N-H), 5,65 (s, 1H, H-3), 3,74 (q, $J = 7,04$ Hz, 2H, H-10); RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 138,7 C-6, 131,6 C-7, 127,1 C-8, 126,4 C-5, 102,3 C-3.

2-[(3',3'-difenilpropil)amino]-1,4-naftoquinona (NQF)

sólido marrom brilhante; rendimento: 58%¹, 44%², 67%³; ponto de fusão: 152 °C; IV (ATR cm^{-1}): ν 3060; 3025; 2974; 2885 (C-H), 2360; 2342 (C-N), 1676; 1591 (C=O), 1620; 1566; 1466 (C=C); RMN ^1H (CDCl_3): δ 8,11 (d, $J = 7,57$ Hz, 1H, H-5), 8,05 (d, $J = 7,57$ Hz, 1H, H-8), 7,74 (t, $J = 7,57$ Hz, 1H, H-6), 7,62 (t, $J = 7,57$ Hz, 1H, H-6), 7,33 (t, $J = 7,57$ Hz, 4H, H-14), 7,27 (sl, 4H, H-15), 7,23 (t, $J = 7,57$ Hz, 2H, H-16), 5,93 (sl, 1H, N-H), 5,65 (s, 1H, H-3), 4,03 (t, $J = 8,04$ Hz, 1H, H-12), 3,18 (dd, $J = 6,62$ Hz, 2H, H-10), 2,47 (dd, $J = 7,46$ Hz, 2H, H-11); RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 182,9 C-4, 181,9 C-1, 147,8 C-2, 143,6 C-12, 134,8 C-6, 133,6 C-9, 132,0 C-7, 130,5 C-9a, 128,8 C-15, 127,6 C-14, 126,7 C-16, 126,3 C-8, 126,2 C-5, 100,9 C-3, 46,9 C-10, 41,2 C-12, 33,8 C-11.

2-[(2'-hidroxietil)amino]-1,4-naftoquinona (NQG)

sólido marrom brilhante; rendimento: 20%¹, 42%², 39%³; ponto de fusão: 156 °C (159,5-160,2 °C, FIESER *et al.*, 1948); IV (ATR cm^{-1}): ν 3341 (O-H), 3058 (N-H), 2978; 2935; 2886 (C-H), 2360; 2342 (C-N), 1674; 1593 (C=O), 1553; 1467 (C=O); RMN ^1H (CDCl_3): δ 8,11 (d, $J = 6,60$ Hz, 1H, H-8), 8,06 (d, $J = 6,60$ Hz, 1H, H-5), 7,75 (t, $J = 7,70$ Hz, 1H, H-6), 7,64 (t, $J = 7,70$ Hz, 1H, H-7), 6,26 (sl, 1H), 5,79 (s, 1H, H-3), 3,95 (t, $J = 5,00$ Hz,

2H, H-11), 3,40 (q, $J = 5,00$ Hz, 2H, H-10); RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 148,2 C-2, 134,8 C-6, 132,1 C-7, 126,4 C-8, 126,2 C-5, 101,1 C-3, 60,0 C-11, 44,4 C-10.

2,2''-[butano-1',4'-di-ildi(amino)]-di-1,4-naftoquinona (NQH)

sólido vermelho escuro; rendimento: 93%¹, 85%², 95%³; ponto de fusão: 165 °C; IV (ATR cm^{-1}): ν 3281 (N-H), 2937 (C-H), 2853 (C-H), 1675; 1603 (C=O); RMN ^1H (DMSO-d_6): δ 7,96 (d, $J = 7,25$ Hz, 1H, H-2), 7,93 (d, $J = 7,25$ Hz, 1H, H-5), 7,71 (t, $J = 7,09$ Hz, 1H, H-3), 7,58 (t, $J = 5,99$ Hz, 1H, H-4), 5,67 (s, 1H), 3,17 (m, 2H), 1,35 (m, 2H); RMN ^{13}C (DMSO-d_6): δ 182,1 C-4, 181,7 C-1, 149,0 C-2, 135,3 C-6, 133,7 C-9, 132,6 C-7, 130,9 C-9a, 126,3 C-8, 125,8 C-5, 99,6 C-3, 42,3 C-10, 27,7 C-11.

2,2''-[hexano-1',6'-di-ildi(amino)]-di-1,4-naftoquinona (NQI)

sólido laranja escuro; rendimento: 60%¹, 70%², 84%³; ponto de fusão: 126 °C; IV (ATR cm^{-1}): ν 3267 (N-H), 2937 (C-H), 2852 (C-H), 1675; 1603 (C=O); RMN ^1H (DMSO-d_6): δ 7,95 (d, $J = 6,94$ Hz, 1H, H-8), 7,92 (d, $J = 7,88$ Hz, H-5), 7,70 (m, 1H, H-6), 7,60 (m, 1H, H-7), 5,72 (s, 1H, H-3), 3,21 (sl, 2H, H-10), 1,65 (sl, 4H, H-11 e H-12); RMN ^{13}C (DMSO-d_6): δ 181,7 C-1; 133,6 C-9; 126,3 C-8; 132,6 C-7; 135,3 C-6; 125,8 C-5; 130,8 C-9a; 182,1 C-4; 99,8 C-3; 149,0 C-2; 42,0 C-10; 39,1 C-11; 25,2 C-12.

2,2''-[octano-1',8'-di-ildi(amino)]-di-1,4-naftoquinona (NQJ)

Sólido marrom claro; rendimento: 56%¹, 77%², 90%³; ponto de fusão: 130 °C; IV (ATR cm^{-1}): ν 3355 (N-H), 2952 (C-H), 1674; 1598 (C=O); RMN ^1H (DMSO-d_6): δ 7,96 (d, $J = 7,25$ Hz, 1H, H-8), 7,70 (m, 1H, H-6), 7,55 (m, 1H, H-7), 7,93 (d, $J = 7,57$ Hz, 1H, H-5), 5,65 (s, 1H, H-3), 3,14 (sl, 2H, H-10), 1,28 (sl, 6H, H-11, H-12, H-13); RMN ^{13}C (DMSO-d_6): δ 181,6 C-1, 133,7 C-9, 126,3 C-8, 132,5 C-7, 135,3 C-6, 125,8 C-5, 130,8 C-9a, 182,0 C-4, 99,6 C-3, 148,9 C-2, 42,3 C-10, 29,2 C-11, 27,7 C-12, 26,9 C-13.

2-(4'-metóxilfenetilamino)-1,4-naftoquinona (NQK)

Sólido vermelho escuro; rendimento: 44%¹, 59%², 64%³; ponto de fusão: não obtido; IV (ATR cm^{-1}): ν 3339 (N-H), 3044; 3005; 2946; 2908 (C-H), 2866; 2831 (C-H), 1670; 1595 (C=O); RMN ^1H (CDCl_3): δ 8,03 (d, $J = 7,57$ Hz, 1H, H-5), 8,02 (d, $J = 7,57$ Hz, 1H, H-8), 7,74 (t, $J = 7,41$ Hz, 1H, H-6), 7,62 (t, $J = 7,41$ Hz, 1H, H-7), 7,15 (d, $J = 8,51$ Hz, 2H, H-13), 6,90 (d, $J = 8,51$ Hz, 2H, H-14), 5,98 (sl, 1H, N-H), 5,80 (s, 1H, H-3), 3,81 (s, 3H, H-16), 3,44 (q, $J = 6,73$ Hz, 2H, H-10), 2,94 (t, $J = 7,09$ Hz, 2H, H-11); RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 182,9 C-4, 181,7 C-1, 158,6 C-15, 147,9 C-2, 134,8 C-6, 133,6 C-9, 132,0 C-7, 130,5 C-9a, 129,7 C-12, 128,6 C-13, 126,3 C-8, 126,2 C-5, 114,3 C-14, 100,9 C-3, 55,3 C-16, 43,9 C-10, 33,5 C-11.

5.4. Ensaios Biológicos

5.4.1. Ensaio para avaliação da atividade antibacteriana

Os ensaios para determinação da atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção em Fungos, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pela Dra. Rojane de Oliveira Paiva e Dra. Gisela Lara da Costa.

5.4.1.1. Preparação e padronização dos inócuos

Neste ensaio os aminoderivados da naftoquinona sintetizados neste trabalho foram testados contra 9 bactérias padrão: 4 gram-positivas (*Bacillus subtilis* INCQS

00001, *Enterococcus faecalis* CCBH 5069, *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 e *Bacillus cereus* INCQS 00304) e 5 gram-negativas (*Escherichia coli* CCBH 3860, *Klebsiella pneumoniae* INCQS 000532, *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00099, *Acinetobacter baumannii* CCBH 24360 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 β -lactamase positiva).

Um fragmento da bactéria foi transferido para placa de Petri contendo meio de cultura Mueller Hinton Agar e incubadas por 24 horas. Após o período de incubação, as culturas foram padronizadas em $3,4 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida foi feita uma diluição de forma que a concentração final fosse de 10^7 UFC/mL e a solução foi inoculada em placa de Petri contendo meio de cultura e incubada por 24 horas, a 37°C .

5.4.1.2. Determinação da concentração inibitória mínima para as bactérias (CIM)

A determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi realizada através de ensaios em microplacas.

Os aminoderivados da 1,4-naftoquinona foram solubilizados em DMSO e em seguida diluídas com água destilada, para obtenção de uma solução de concentração 1,0 mg/mL. As soluções foram aplicadas, em diluição seriada, em placa de micropoços contendo a cultura bacteriana. Foram testadas 8 concentrações diferentes, que variaram de 500 – 3,9 $\mu\text{g/mL}$.

Como controle positivo foi utilizado o antibiótico padrão cloranfenicol, em diluição seriada, e sua concentração variou de 64 – 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Além do controle positivo foram feitos um controle com DMSO, para testar a influência do solvente sobre a cultura de bactérias, um controle de crescimento, para verificar a viabilidade das bactérias testadas e um teste de esterilidade, para controle da não-contaminação por outros microrganismos.

As microplacas foram incubadas a 37°C , durante a noite. No dia seguinte foram aplicados 20 μL de solução de cloreto de *p*-iodonitrotetrazolio (*p*-INT) em todos os poços das microplacas e incubadas por 1 – 2 horas, a 37°C , para revelação. O crescimento bacteriano foi indicado pela coloração vermelha. Se a coloração dos poços permanecer inalterada após adição do revelador *p*-INT significa que houve inibição do crescimento bacteriano naquela concentração.

5.4.2. Ensaio de interação entre albumina sérica bovina (ASB) e os aminoderivados da 1,4-naftoquinona biologicamente ativos

5.4.2.1. Estudo de fluorescência estacionária

Em uma cubeta de quartzo foi adicionado um volume de 3,0 mL de solução de ASB (concentração $1,0 \times 10^{-5}$ M em tampão PBS – pH = 7,4). O espectro de emissão para albumina foi obtido utilizando fluorímetro Jasco J-815 e comprimento de onda de excitação de 280 nm. Foi utilizada no ensaio de fluorescência solução estoque dos compostos **NQA**, **NQC** e **NQG** de concentração $1,0 \times 10^{-3}$ M. Foram adicionadas à cubeta alíquotas sucessivas de solução dos compostos, obtendo concentrações de 0,17, 0,33, 0,50, 0,66, 0,83, 0,99, 1,15 e $1,32 \times 10^{-5}$ M e foram feitas as leituras, observando se há supressão da fluorescência da proteína pelos compostos. Os dados obtidos foram tratados no programa Origin 8.1, para obtenção dos gráficos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOUD, R.; AKIL, M.; CHARCOSSET, C.; GREIGE-GERGES, H. Interaction of glucocorticoids and progesterone derivatives with human serum albumin. *Chemistry and Physics of Lipids*, 207, 2017, p. 271-278.
- AGERTT, V. A.; MARQUES, L. L.; BONEZ, P. C.; DALMOLIN, T. V.; OLIVEIRA, G. N. M. de.; CAMPOS, M. M. A. de. Evaluation of antimycobacterial activity of a sulphonamide derivative. *Tuberculosis*, 93, 2013, p. 318-321.
- AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: major classes and health impacts. *Biochemical Pharmacology*, 133, 2017, p. 4-19.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agentes antimicrobianos: bases teóricas e usos clínicos. 2007. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/conceitos.htm. Acessado em fevereiro de 2018.
- BARBOSA, T. P.; DINIZ-NETO, H. Preparação de derivados do lapachol em meio ácido e em meio básico: uma proposta de experimentos para a disciplina de química orgânica experimental. *Química Nova*, 36(2), 2013, p. 331-334.
- BARROS, L. S.; CHAVES, O. A.; SCHAEFFER, E.; SANT'ANNA, C. M. R.; FERREIRA, A. B. B.; CESARIN-SOBRINHO, D.; DA SILVA, F. A.; NETTO-FERREIRA, J. C. Evaluating the interaction between difluorinated chalcones and plasmatic albumin, *Journal of Fluorine Chemistry*, v. 190, 2016, p. 81-88.
- BOONYAKETGOSON, S.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; TRISUWAN, K. Naphthoquinones from the leaves of *Rhinacanthus nasutus* having acetylcholinesterase inhibitory and cytotoxic activities. *Fitoterapia*, 124, 2018, p. 206-210.
- CERQUEIRA, E. C.; NETZ, P. A.; CANTO, V. P.; PINTO, A. C.; FOLLMER, C.; Beyond Topoisomerase Inhibition: Antitumor 1,4-Naphthoquinones as Potential Inhibitors of Human Monoamine Oxidase. *Chemical and Biological Drugs Diseases*, 83, 2014, p. 401-410.
- CHAVES, O. A.; JESUS, C. S. H.; HENRIQUES, E. S.; BRITO, R. M. M.; SERPA, C. In situ ultra-fast heat deposition does not perturb the structure of serum albumin. *Photochemical Photobiological Science*, v. 15, 2016, p. 1524-1535.
- CHAVES, O. A. Estudo da interação entre albuminas séricas e moléculas biologicamente ativas. *Química*, 41 (146), 2017, p. 147-154.
- CHAVES, O. A.; SCHAEFFER, E.; SANT'ANNA, C. M. R.; NETTO-FERREIRA, J. C.; CESARIN-SOBRINHO, D.; FERREIRA, A. B. B. Insight into the interaction between a-lapachone and bovine serum albumin employing spectroscopic and computational approach. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 5, 2016, p. 331-339.
- CHUA, K. Y. L.; STINEAR, T. P.; HOWDEN, B. P. Functional genomics of *Staphylococcus aureus*. *Briefings in Functional Genomics*, 12 (4), 2013, p. 305-315.
- CURRY, S. X-ray crystallography of albumin. In. *Human Serum Albumin – New insights on its structural dynamics, functional impacts and pharmaceutical applications*. Ed. M. Otagiri, Sojo University Publications, Kumamoto, 2011, p. 1-29.

- DELARMELINA, M.; DALTOÉ, R. D.; CERRI, M. F.; MADEIRA, K. P.; RANGEL, L. B. A.; LACERDA-JUNIOR, V.; ROMÃO, W.; TARANTO, A. G.; GRECO, S. J. Synthesis, antitumor activity and docking of 2,3-(substituted)-1,4-naphthoquinone derivatives containing nitrogen, oxygen and sulfur. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 26(9), 2015, p. 1804-1816.
- GALE, R. T.; BROWN, E. D. New chemical tools to probe cell wall biosynthesis in bacteria. *Current Opinion on Microbiology*, 27, 2015, p. 69-77.
- GUIMARAES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Revista Química Nova*, 33 (3), 2010, p. 667-679.
- GUN'KO, V. M.; KRUPSKA, T. V.; ANDRIYKO, L. S.; KLYMENKO, N. Y.; SIORA, I. V.; NOVIKOVA, O. A.; MARYNIN, A. I.; UKRAINETZ, A. I.; CHARMAS, B.; SHEKHUONOVA, S. B.; TUROV, V. V. Bonding of doxorubicin to nanosilica and human serum albumin in various media. *Journal of Colloid and Interface Science*, 513, 2018, p. 809-819.
- HAMIDIAN, M.; AMBROSE, S. J.; HALL, R. M. A large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid carrying the *sul2* sulphonamide and *strAB* streptomycin resistance genes. *Plasmid*, 87-88, 2016, p. 43-50.
- HE, W.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; JIA, X.; ZHANG, J.; SUN, W.; JIANG, H.; CHEN, D.; MURCHIE, A. I. H. Riboswitch control of induction of aminoglycoside resistance acetyl and adenylyl-transferases. *RNA Biology*, 10 (8), 2013, p. 1266-1273.
- HORNING, E. C. *Organic Synthesis Collective*, Vol. 4, 1963, p. 698-699.
- JAIN, P.; SARAVANAN, C.; SINGH, S. K. Sulphonamides: Deserving class as MMP inhibitors? *European Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 2013, p. 89-100.
- JEONG, D.; YAN, J. J.; NOH, H.; HEDMAN, B.; HODGSON, A. O.; SOLOMON, E. I.; CHO, J. Naphthalene oxidation of a manganese(IV)-bis(hydroxo) complex on the presence of acid. *Angewandte Chemie International Edition*, 57 (26), 2018, p. 7764-7768.
- KEHELPANNALA, C.; KUMAR, N. S.; JAYASINGHE, L.; ARAYA, H.; FUJIMOTO, Y. Naphthoquinone metabolites produced by *Monacrosporium ambrosium*, the Ectosymbiotic fungus of tea shot-hole borer, *Euwallacea fornicates*, in stems of tea, *Camellia sinensis*. *Journal of Chemical Ecology*, 44(1), 2017, p. 95-101.
- KHAMENEH, B., DIAB, R., GHAZVINI, K., BAZZAZ, B. S. F. Breakthroughs in bacterial resistances mechanisms and the potential ways to combat them. *Microbial Pathogenesis*, 95, 2016, p. 32-42.
- KIKUCHI, H.; SAKAI, T.; TESHIMA, R.; NEMOTU, S.; AKIYAMA, H. Total determination of chloramphenicol residues in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 230, 2017, p. 589-593.
- KISHIMOTO, S.; TSUNEMATSU, Y.; NISHIMURA, S.; HAYASHI, Y.; HATTORI, A.; KAKEYA, H. Tumescenamides C, an antimicrobial cyclic lipodepsipeptide from *Streptomyces* sp. *Tetrahedron*, 68, 2012, p. 5572-5578.
- LOHMANN, U. Independent synthesis of the violet dyes from 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid and primary aliphatic amines as well as a byproduct. *Archiv der Pharmazie*, 317 (4), 1984, p. 313-323.

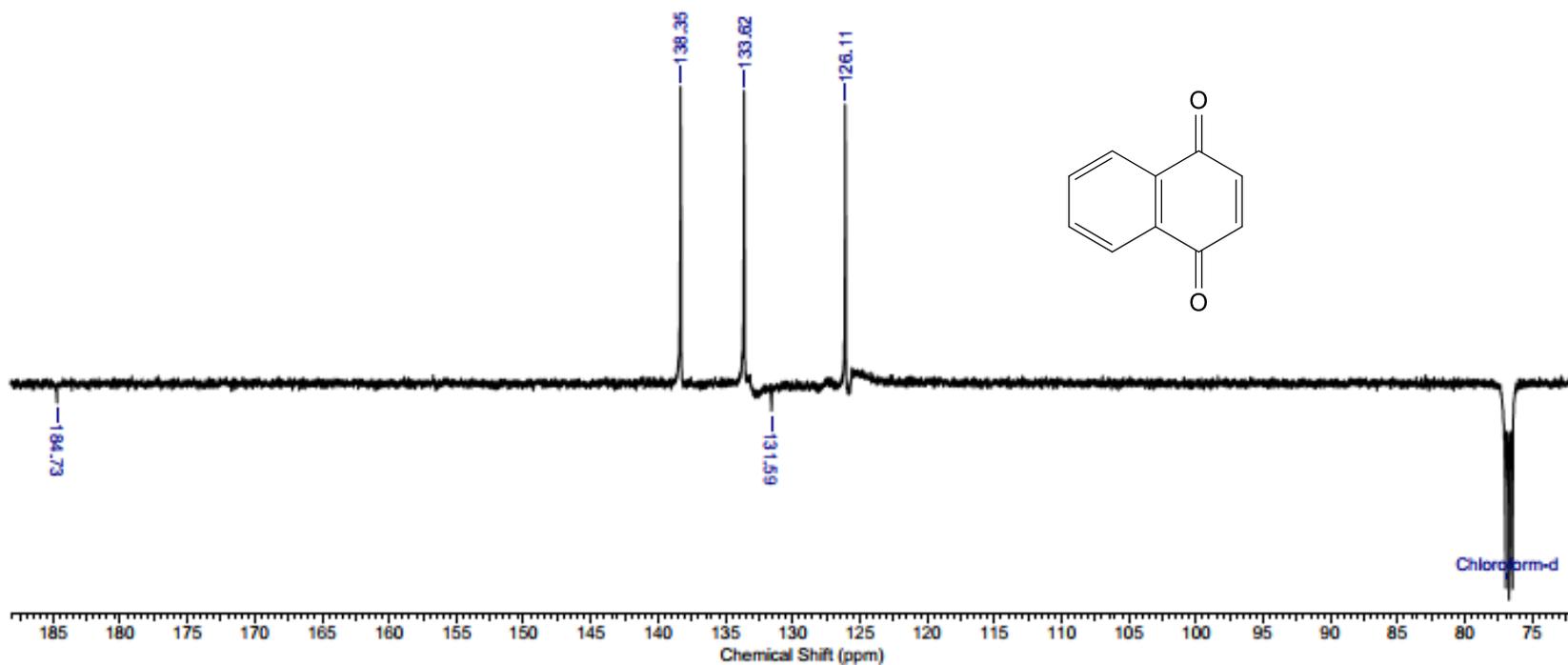
- MARKOVIC, O. S.; CVIJETIC, I. N.; ZLATOVIC, M. V.; OPSENICA, I. M.; KONSTANTINOVIC, J. M.; JOVANOVIC, N. V. T.; SOLAJA, B. A.; VERBIC, T. Z. Human serum albumin binding os certain antimalarials. *Spectrochimica acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 192, 2018, p. 128-139.
- MARTINEZ, M. J. A.; BENITO, P. B. Biological activity of quinones. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 2005, p. 303-366.
- MOFFA M.; BROOK I. Tetracyclines, Glycylcyclines and Chloramphenicol. In: BENETT, J. E.; DOLIN, R.; BLASER, M. J. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Ed. Elsevier. 8ª edição, 2015, Filadélfia, p. 263-277.
- MUSTAEV, A.; MALIK, M.; ZHAO, X.; KUREPINA, N.; LUAN, G.; OPPEGARD, L. M.; HIASA, H.; MARKS, K. R.; KERNS, R. J.; BERGER, J. M.; DRLICA, K. Fluoroquinolone-gyrase-DNA Complexes: Two modes of drug bindings. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 2014, p. 12300-12312.
- NILSSON, A. C.; JENSEN, J. S.; BJORKMAN, P.; PERSSON, K. Development of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae*-infected Swedish patients treated with macrolides. *Scandinavian Journal of Infection Diseases*, 46, 2014, p. 315-319.
- NING, X.; LI, Y.; QI, H.; LI, R.; JIN, Y.; LIU, J.; YIN, Y. Anti-cancer effect of a novel 2,3-didithiocarbamate substituted naphthoquinone as a tumor metabolic suppressor *in vitro* and *vivo*. *Medicinal Chemical Communications*, 9(4), 2018, p. 1-11.
- OGATA, T.; YOSHIDA, T.; SHIMIZU, M.; TANAKA, M.; FUKUHARA, C.; ISHII, J.; NISHIUCHI, A.; INAMOTO, K.; KIMACHI, T. Unusual, chemoselective Etherification of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone derivatives utilizing alkoxymethyl chlorides: scope, mechanism and application to the synthesis of biologically active natural product (-)-lantalucratin C. *Tetrahedron*, 72, 2016, p. 1423-1432.
- OLIVEIRA, M. F.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; SEGUNDO, T. A.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R. New enamine derivatives of lapachol and biological activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 74(2), 2002, p. 211-221.
- PAULEN, F. A.; HOEGY, B.; ROCHE, I. J. S.; MISLIN, G. L. A. Synthesis of conjugates between oxazolidinones antibiotics and a pyochelin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemical Letters*, 27, 2017, p. 4867-4870.
- PERIASAMY, M.; BHATT, V. M. A new 1,2-shift in the oxidation of aromatic rings. *Tetrahedron Letters*, 27, 1977, p. 2357-2360.
- PIRNÁU, A.; MIC, M.; NEAMTU, S.; FLOARE, C. G.; BOGDAN, M. Calorimetric and spectroscopic studies of the interaction between zidovudine and human serum albumin. *Spectrochimica acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 191, 2018, p. 226-232.
- PÓOR, M.; KUNSÁGI-MÁTÉ, S.; BÁLINT, M.; HETÉNYI, C.; GERNER, Z.; LEMLI, B. Interaction of mycotoxin zearalenone with human serum albumin. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 170, 2017, p. 16-24.
- PRESTON, C. Antimicrobial Resistance Learning Site. Michigan State University, 2018. Disponível em <<https://amrls.umn.edu/antimicrobial-resistance-learning-site>>. Acessado em fevereiro de 2018.

- SANTOS-BENEIT, F.; ORDÓÑES-ROBLES, M.; MARTIN, J. F. Glycopeptide resistance: Links with inorganic phosphate metabolism and cell envelope stress. *Biochemical Pharmacology*, 133, 2017, p. 74-85.
- SHARMA, R.; FRANCOIS, D.; HAMMERSCHLAG, M. R. New antimicrobial agents for the treatment Staphylococcal infections in children. *Pediatric clinics of North America*, 64, 2017, p. 1369-1387.
- SILVA JR, E. N.; MELO, I. M. M.; DIOGO, E. B. T.; COSTA, V. A.; SOUZA FILHO, J. D.; VALENÇA, W. O.; CAMARA, C. A.; OLIVEIRA, R. N.; ARAUJO, A. S.; EMERY, F. S.; SANTOS, M. R.; SIMONE, C. A.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; CASTRO, S. L. On the search for potential anti-*Trypanosoma cruzi* drugs: Synthesis and biological evaluation of 2-hydroxy-3-methylamino and 1,2,3-triazolic naphthoquinoidal compounds obtained by click chemistry reactions. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 2012, p. 304-312.
- SILVA, T. M.; CAMARA, C. A.; BARBOSA, T. P.; SOARES, A. Z.; DA CUNHA, L. C.; PINTO, A. C.; VARGAS, M. D.; Molluscicidal activity of synthetic lapacholamino and hydrogenated derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13, 2005, p. 193-196.
- SINGH, S. B.; YOUNG, K.; SILVER, L. L. What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochemical Pharmacology*, 133, 2017, p. 63-73.
- SOUSA, E. T.; CARDOSO, M. P.; SILVA, L. A.; ANDRADE, J. B. Direct determination of quinones in fine atmospheric particulate matter by GC-MS. *Microchemical Journal*, 118, 2015, p. 26-31.
- SPIZEK, J.; REZANKA, T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance and applications. *Biochemical Pharmacology*, 133, 2017, p. 20-28.
- TIAN, J.N., LIU, J., HU, Z.D, CHEN, X.G.; Interaction of wogonin with bovine serum albumin. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, v. 13, 2005, p. 4124–4129.
- WANG, S. H.; LO, C. Y.; GWO, Z. H.; LIN, H. J.; CHEN, L. G.; KUON, C. D.; WU, J. Y. Synthesis and biological evaluation of lipophilic 1,4-naphthoquinone derivative against human cancer cell lines. *Molecules*, 20, 2015, p. 11994-12015.
- WEI, W.; YANG, H. Synergy against extensively drug-resistance *Acinetobacter baumannii* in vitro by two old antibiotics: colistin and chloramphenicol. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49, 2017, p. 321-326.
- ZHANG, D.; ZHANG, X.; LIU, Y. C.; HUANG, S. C.; OUYANG, Y.; HU, Y. Investigations of the molecular interactions between nisoldipine and human serum albumin in vitro using multi-spectroscopy, electrochemistry and docking studies. *J. Journal of Molecular Liquids*, 258, 2018, p. 155-162.

7. ANEXO DE ESPECTROS

24 Jul 2018

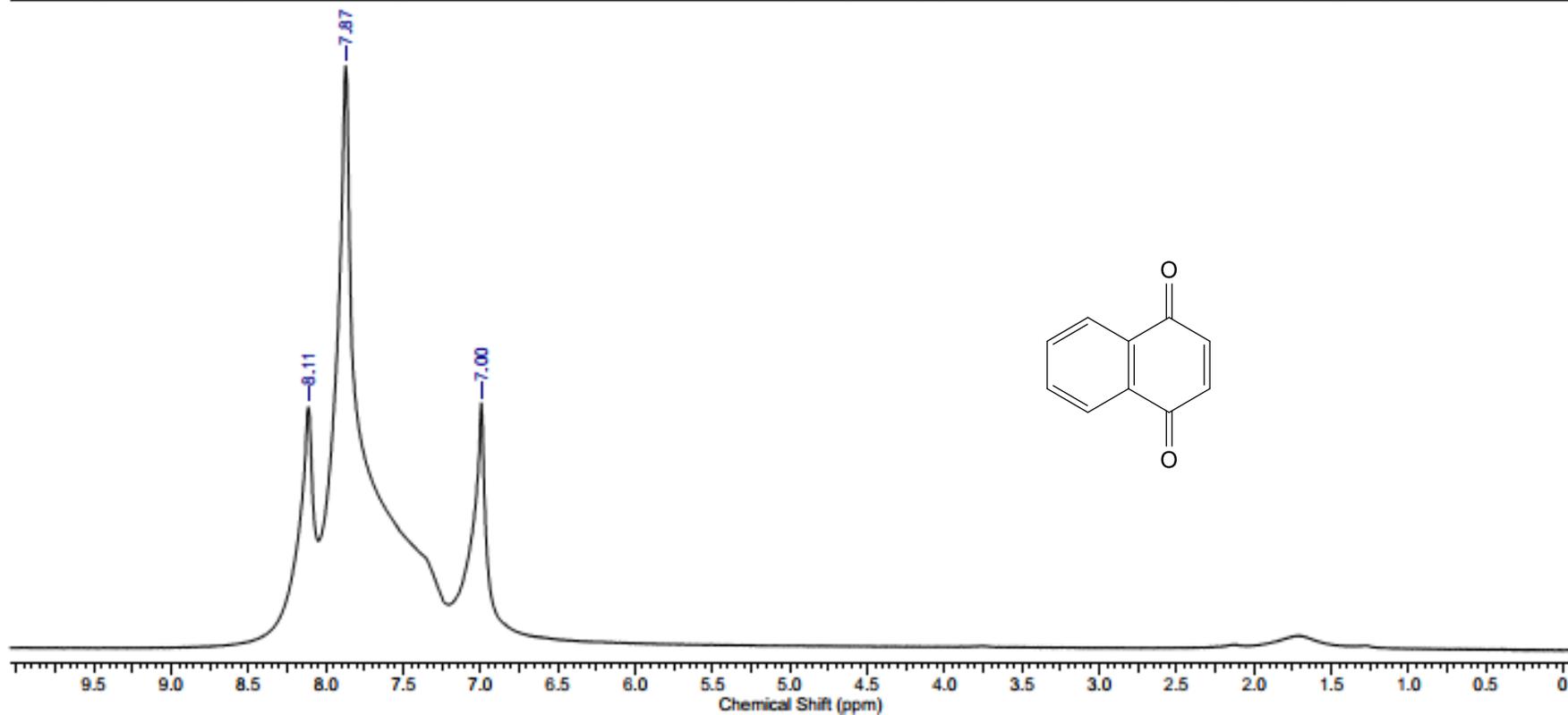
Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: NQ (DEPT Q) - 500MHZ Solvente: CDCL3	
Date	31 Jan 2017 14:50:06	File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documentos\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 21,4 NQ_008001r	
Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	¹³ C	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	29761.90	Temperature (degree C)
				21.360



ANEXO I – Espectro de RMN ¹³C DEPTQ em CDCl₃ (125 MHz) para a 1,4-naftoquinona

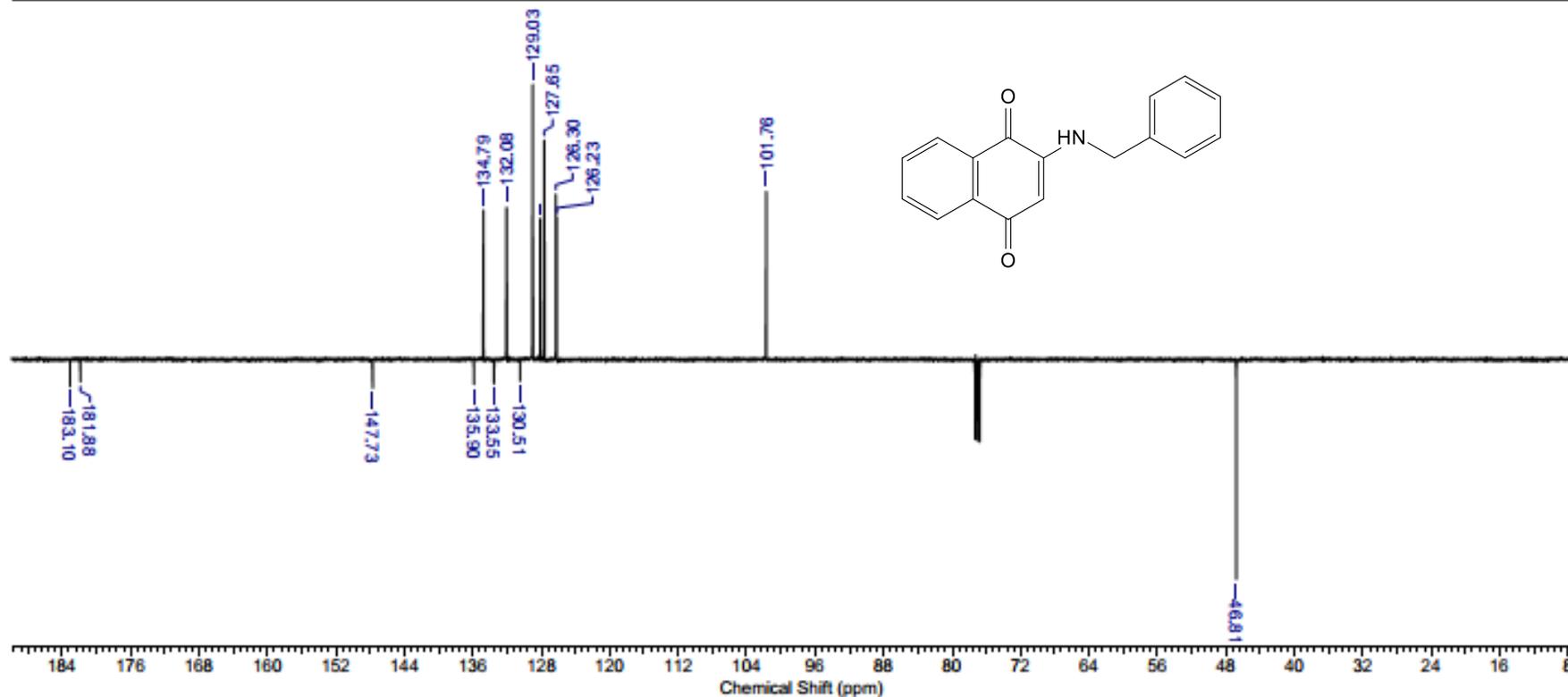
24 Jul 2018

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: NQ (PROTON) - 500MHZ Solvente: CDCL3	Date	31 Jan 2017 14:01:26
File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documentos\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2\1,4 NQ 007001r			Frequency (MHz)	500.13
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58
				Points Count	32768
				Temperature (degree C)	21.460



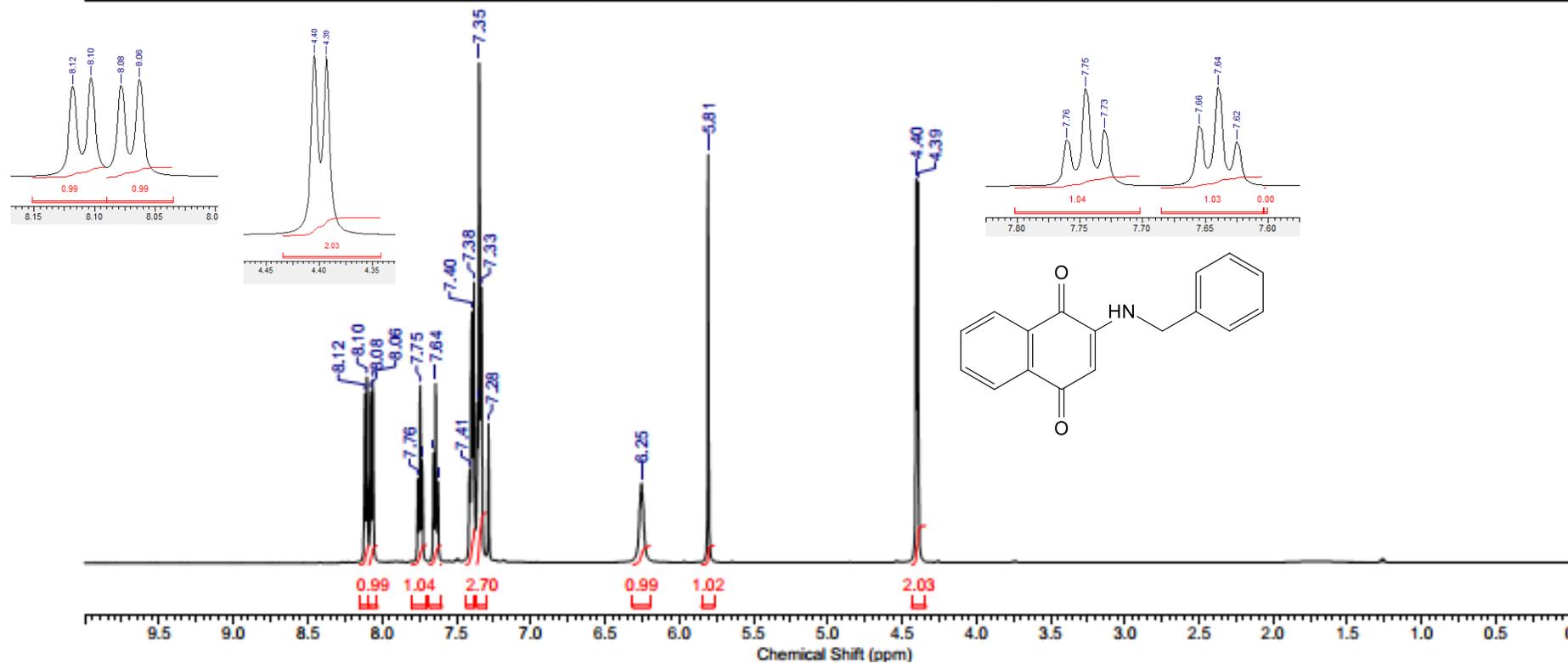
ANEXO II – Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 (500 MHz) para a 1,4-naftoquinona

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: 2-BZ-1,4-NQ (DEPT Q) - 500MHZ Solvente: CDCL3	
Date	31 Jan 2017 11:38:14	File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documentos\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2NQ benzil (NQA) 004001r	
Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	13C	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	29761.90	Temperature (degree C)
				21.560



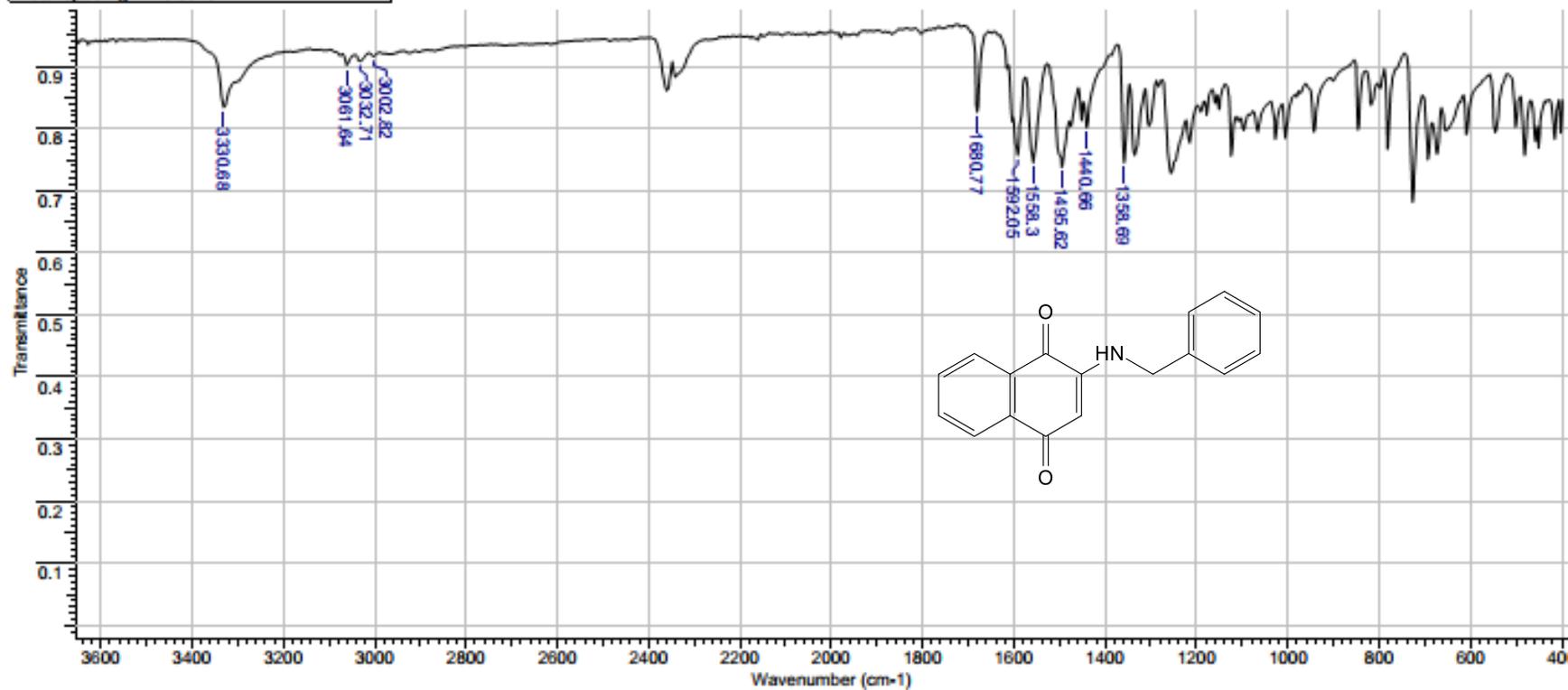
ANEXO III – Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ em CDCl_3 (125 MHz) para o composto NQA

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: 2-BZ-1,4-NQ (PROTON) - 500MHZ Solvente: CDCL3	
Date	31 Jan 2017 11:22:00	File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documents\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2\NQ benzil (NQA) 003001r	
Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	1H	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58	Temperature (degree C)
				zq30
				21.260



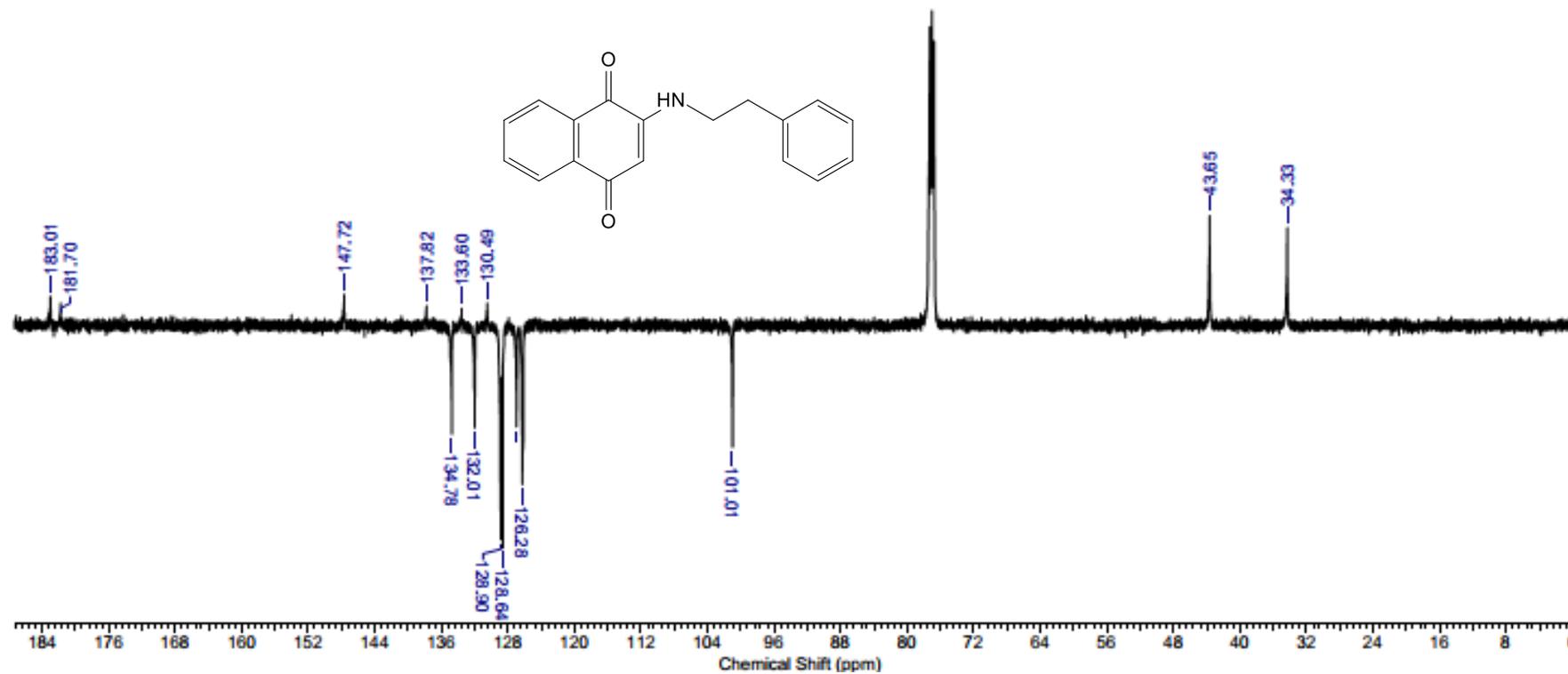
ANEXO IV – Espectro de RMN ¹H em CDCl₃ (500 MHz) para o composto NQA

Title	NQa - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE			Date Stamp	10/10/2017 11:35:32.078 (GMT-3)
File Name	C:\USERS\TEMP\DOWNLOADS\NQa - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE.0			Spectral Region	IR
Date	22 Mar 2018 11:52:46	Technique	Infrared	Instrument	VERTEX 70
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance	Spectrum Range	399.2184 - 3998.9344
Data Spacing	0.9643				



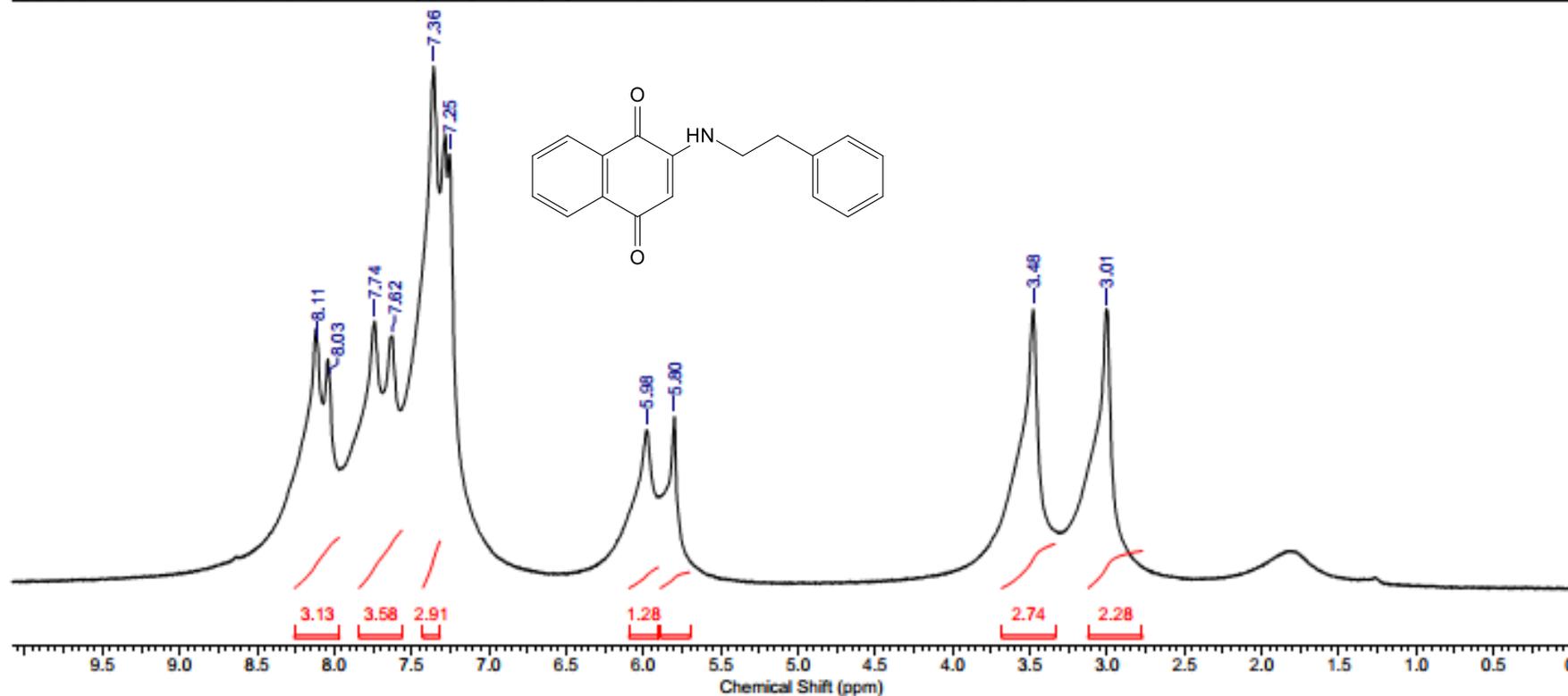
ANEXO V – Espectro de IV para o composto NQA

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: 2-FN-1,4-NQ (DEPT Q) - 500MHZ Solvente: CDCL3	
Date	31 Jan 2017 13:21:42	File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documentos\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2NQ fenetil (NQB) 002001r	
Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	¹³ C	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	29761.90	Temperature (degree C)
				21.760



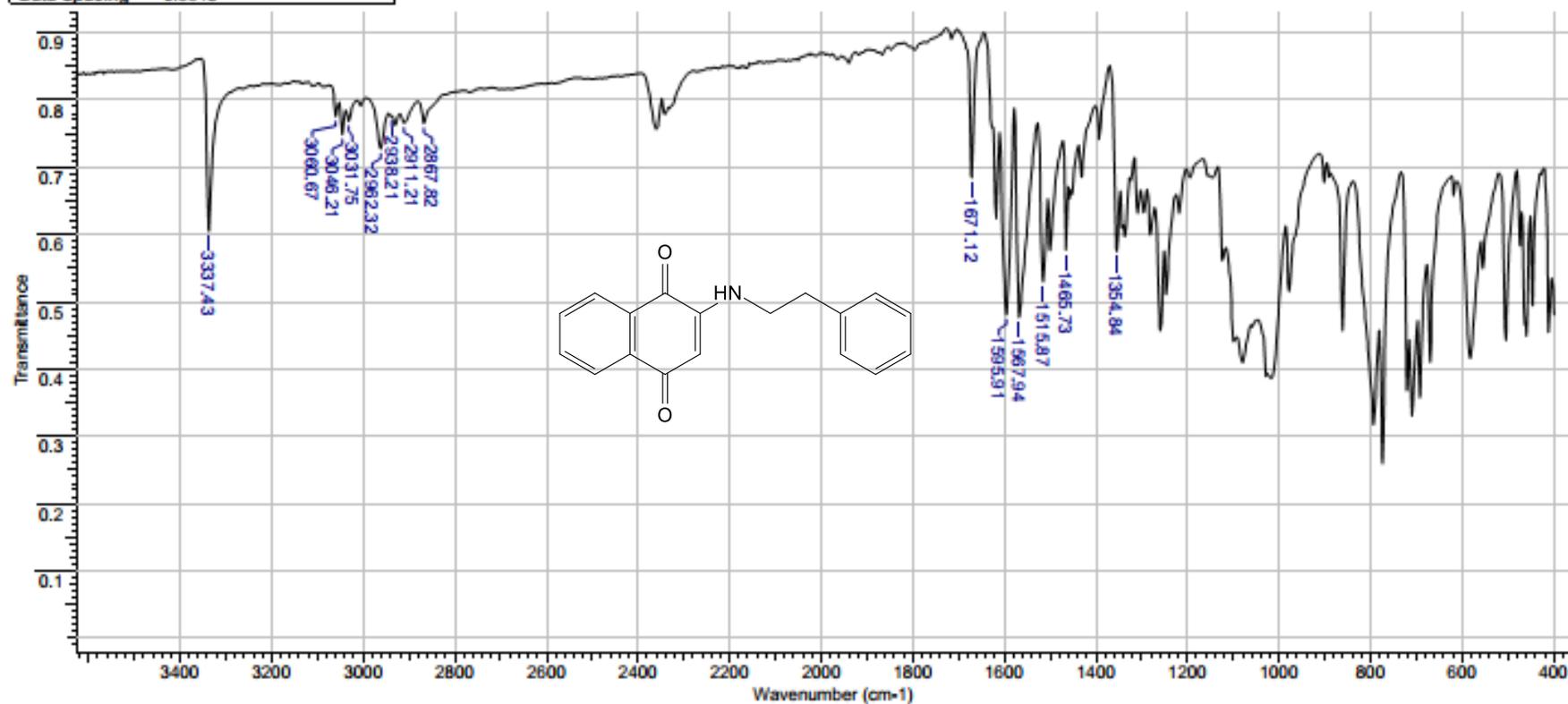
ANEXO VI – Espectro de RMN ¹³C DEPTQ em CDCl₃ (125 MHz) para o composto NQB

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: 2-FN-1,4-NQ (PROTON) - 500MHZ Solvente: CDCl3	
Date	31 Jan 2017 11:52:30	File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documentos\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2\NQ fenetil (NQb) 001001r	
Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	1H	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58	Temperature (degree C)
				21.160



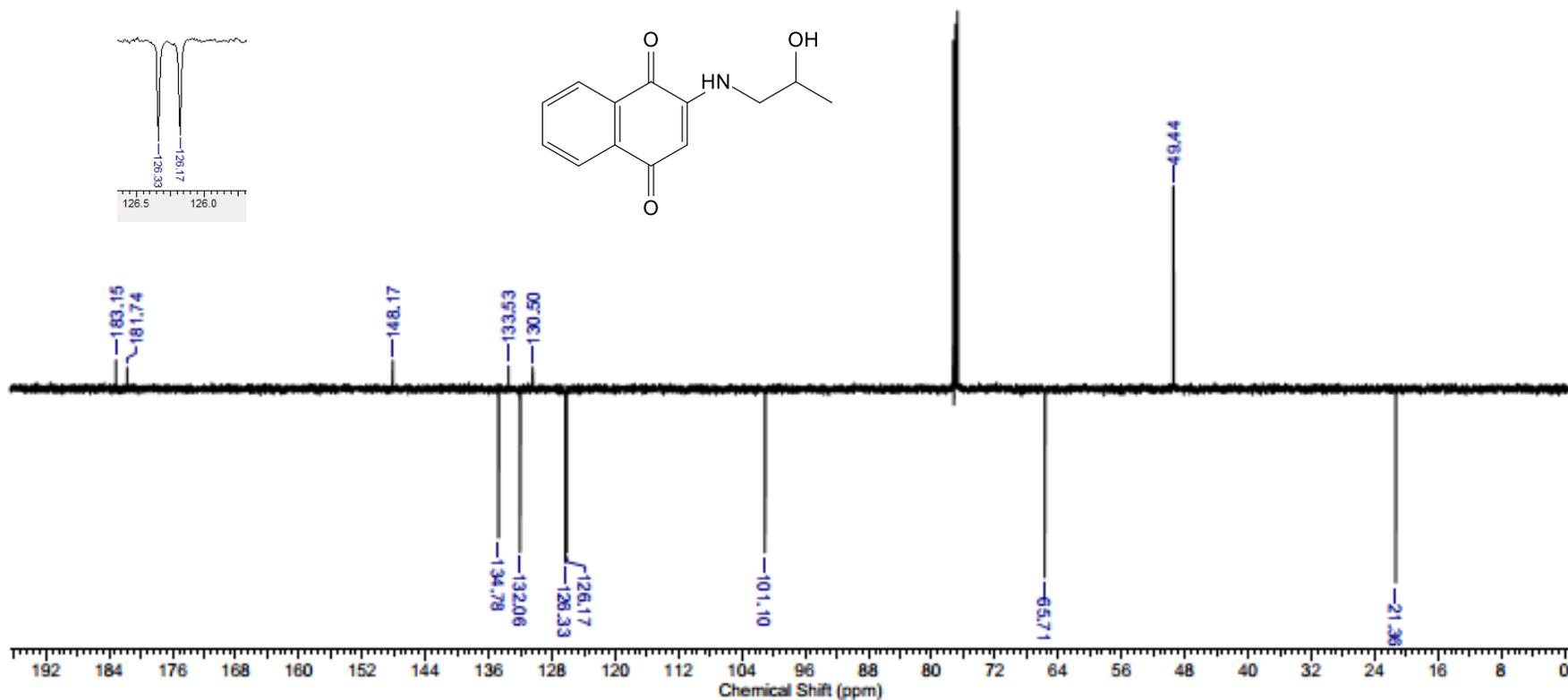
ANEXO VII – Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 (500 MHz) para o composto **NQB**

Title		NQb - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE			
File Name	C:\USERS\TEMP\DOWNLOADS\NOB - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE (1).0			Date Stamp	10/10/2017 11:40:02.247 (GMT-3)
Date	22 Mar 2018 11:58:38	Technique	Infrared	Instrument	VERTEX 70
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance	Spectrum Range	399.2184 - 3998.9344
Data Spacing	0.9643			Points Count	3734



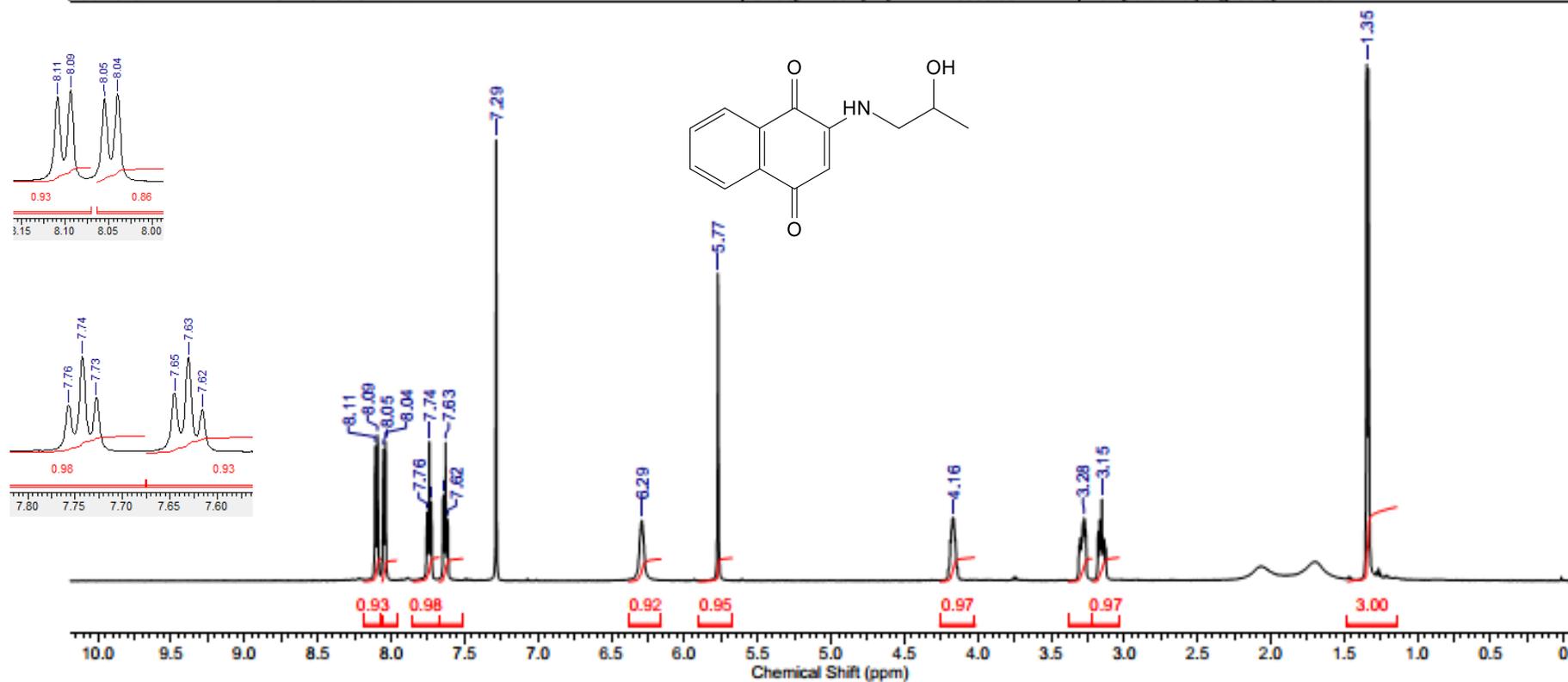
ANEXO VIII – Espectro de IV para o composto NQB

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: NQC (DEPT Q) - 500MHZ Solvente: CDCL3	Date	15 Feb 2017 16:07:42
File Name	C:\Users\Carla\Desktop_013001r	Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	13C
Number of Transients	1251	Original Points Count	32768	Points Count	32768
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	29761.90	Pulse Sequence	deptggpsp
				Temperature (degree C)	21.560



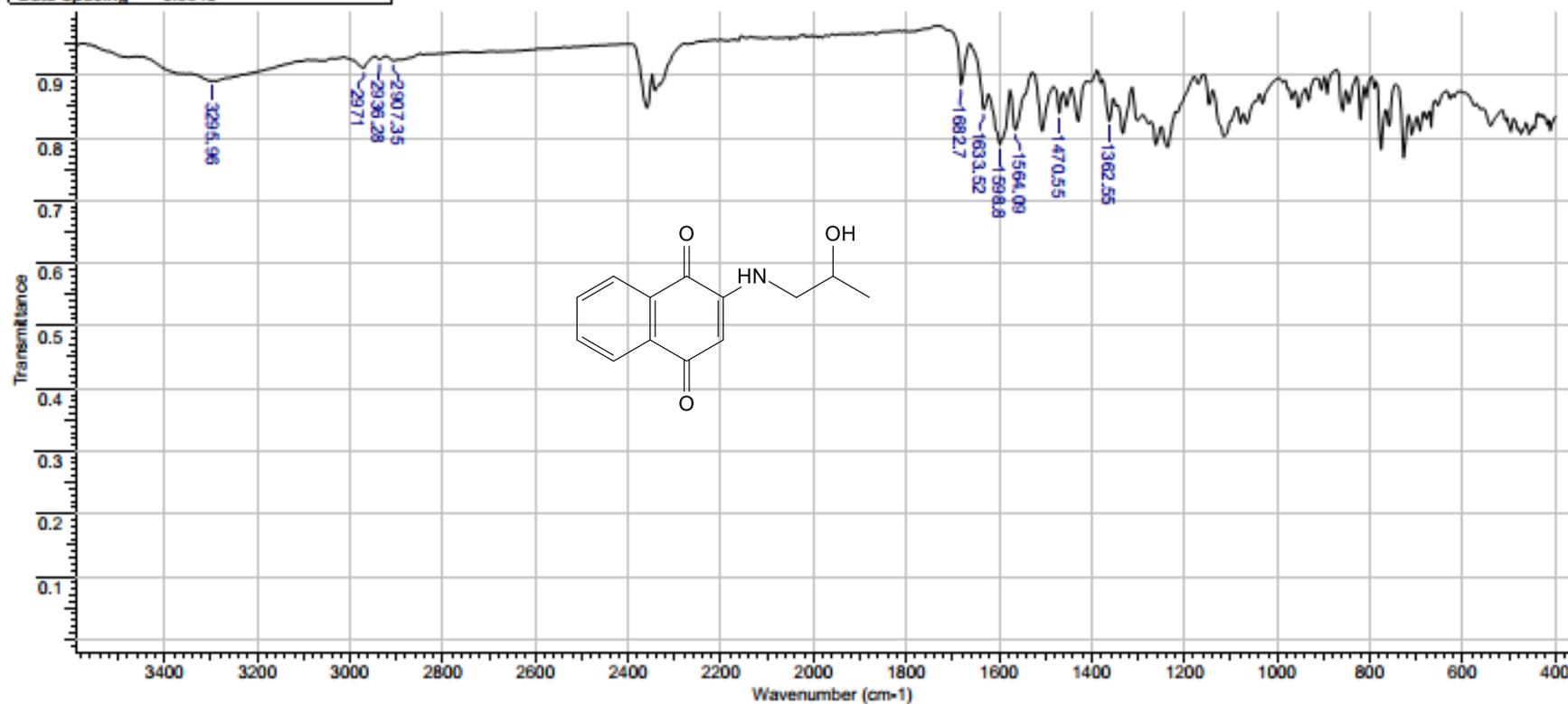
ANEXO IX – Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ em CDCl_3 (125 MHz) para o composto NQC

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: NQC (PROTON) - 500MHz Solvente: CDCL3	Date	15 Feb 2017 15:00:40
File Name	C:\Users\Carla\Desktop 012001r	Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	1H
Number of Transients	16	Original Points Count	32768	Points Count	32768
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58	Pulse Sequence	zg30
				Temperature (degree C)	21.260



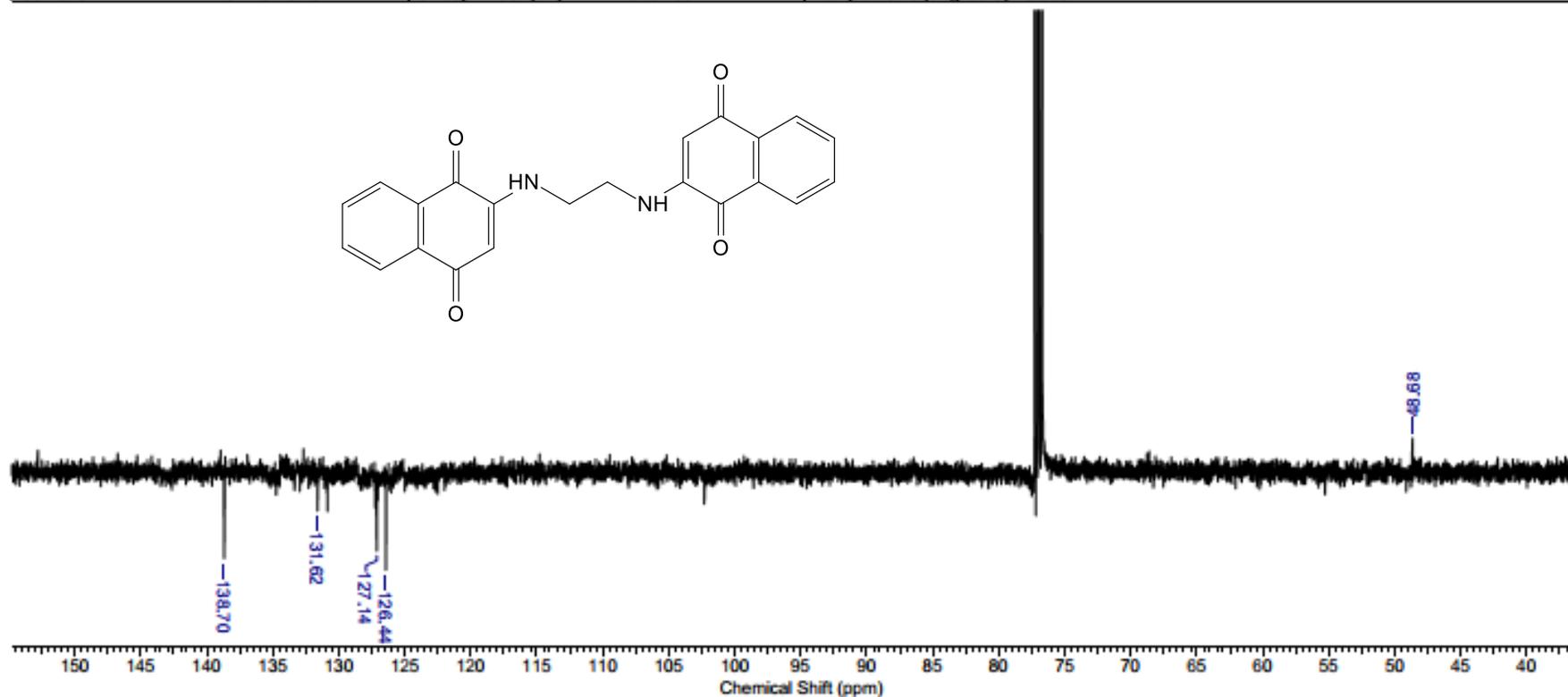
ANEXO X – Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 (500 MHz) para o composto NQC

Title NQc - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE				
File Name C:\USERS\TEMP\DOWNLOAS\NQc - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE.0			Date Stamp 10/10/2017 11:44:41.127 (GMT-3)	
Date 22 Mar 2018 12:02:04	Technique Infrared	Instrument VERTEX 70		Spectral Region IR
X Axis Wavenumber (cm-1)	Y Axis Transmittance	Spectrum Range 399.2184 - 3998.9344		Points Count 3734
Data Spacing 0.9643				



ANEXO XI – Espectro de IV para o composto NQc

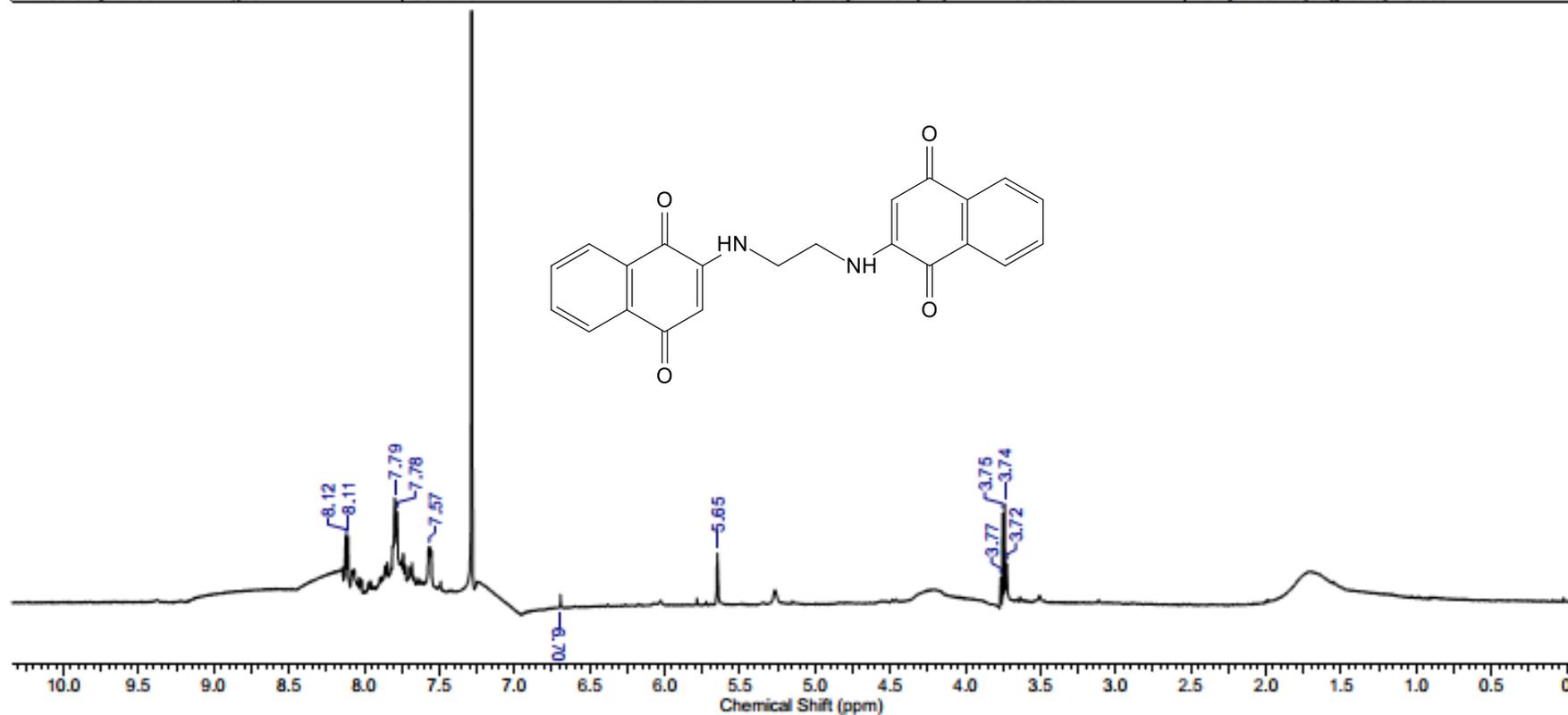
Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: NQD (DEPT Q) - 500MHZ Solvente: CDCL3		
Date	15 Feb 2017 18:08:58	File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documentos\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2\NQd_015001r		
Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	13C	Number of Transients	2560
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgsp
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	29761.90	Temperature (degree C)	23.960



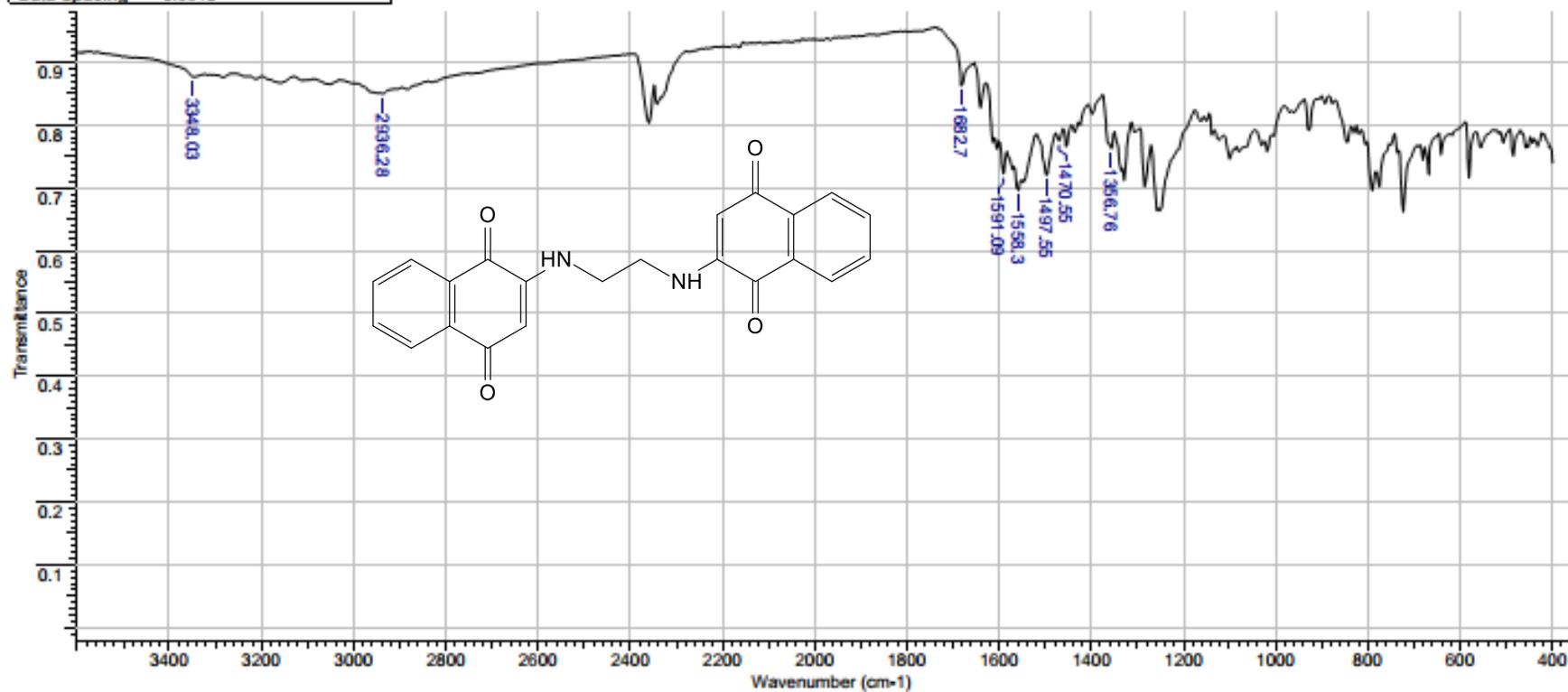
ANEXO XII – Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ em CDCl_3 (125 MHz) para o composto NQD

25 Jul 2018

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: NQD (PROTON) - 500MHZ Solvente: CDCL3	Date	15 Feb 2017 16:12:12
File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documentos\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2\NQd_014001r			Frequency (MHz)	500.13
Nucleus	¹ H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58
				Points Count	32768
				Temperature (degree C)	23.060

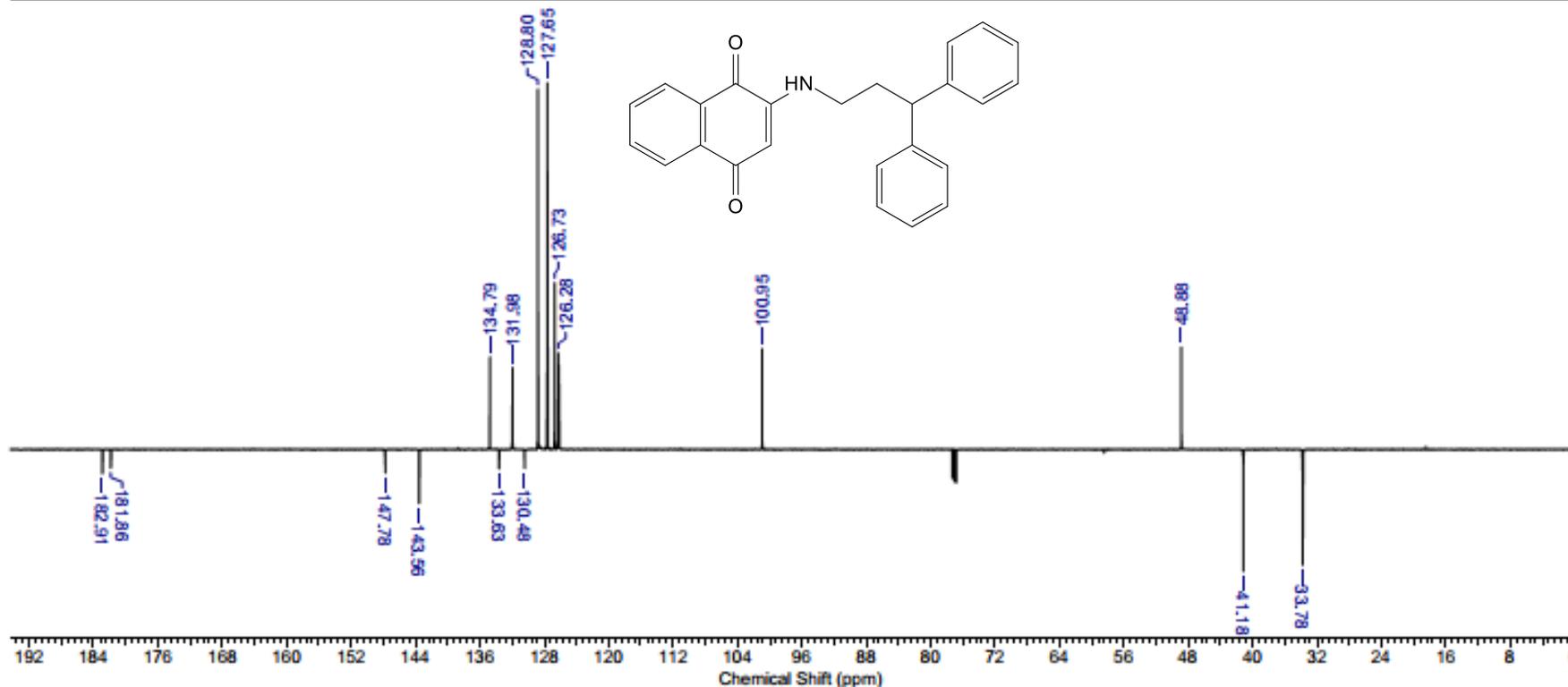
ANEXO XIII – Espectro de RMN ¹H em CDCl₃ (500 MHz) para o composto NQD

Title	NQd - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE			Date Stamp	10/10/2017 11:48:53.714 (GMT-3)
File Name	C:\USERS\TEMP\DOWNLOAS\NQD - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE.0			Spectral Region	IR
Date	22 Mar 2018 12:02:10	Technique	Infrared	Instrument	VERTEX 70
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance	Spectrum Range	399.2184 - 3998.9344
Data Spacing	0.9643				



ANEXO XIV – Espectro de IV para o composto NQD

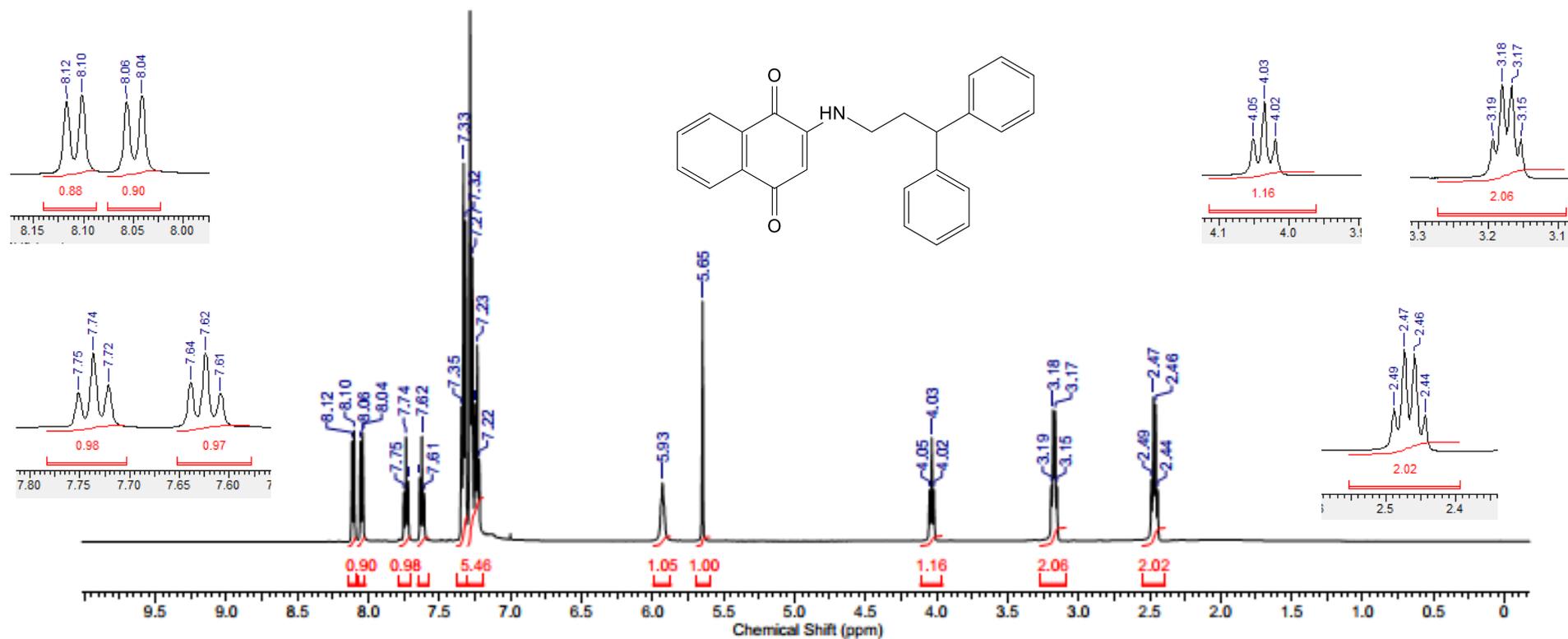
Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: NQF (DEPT Q) - 500MHZ Solvente: CDCl3	
Date	10 Mar 2017 15:56:02	File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documentos\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2\NQf_017001r	
Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	13C	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	29761.90	Temperature (degree C)
				22.160



ANEXO XV – Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ em CDCl_3 (125 MHz) para o composto NQF

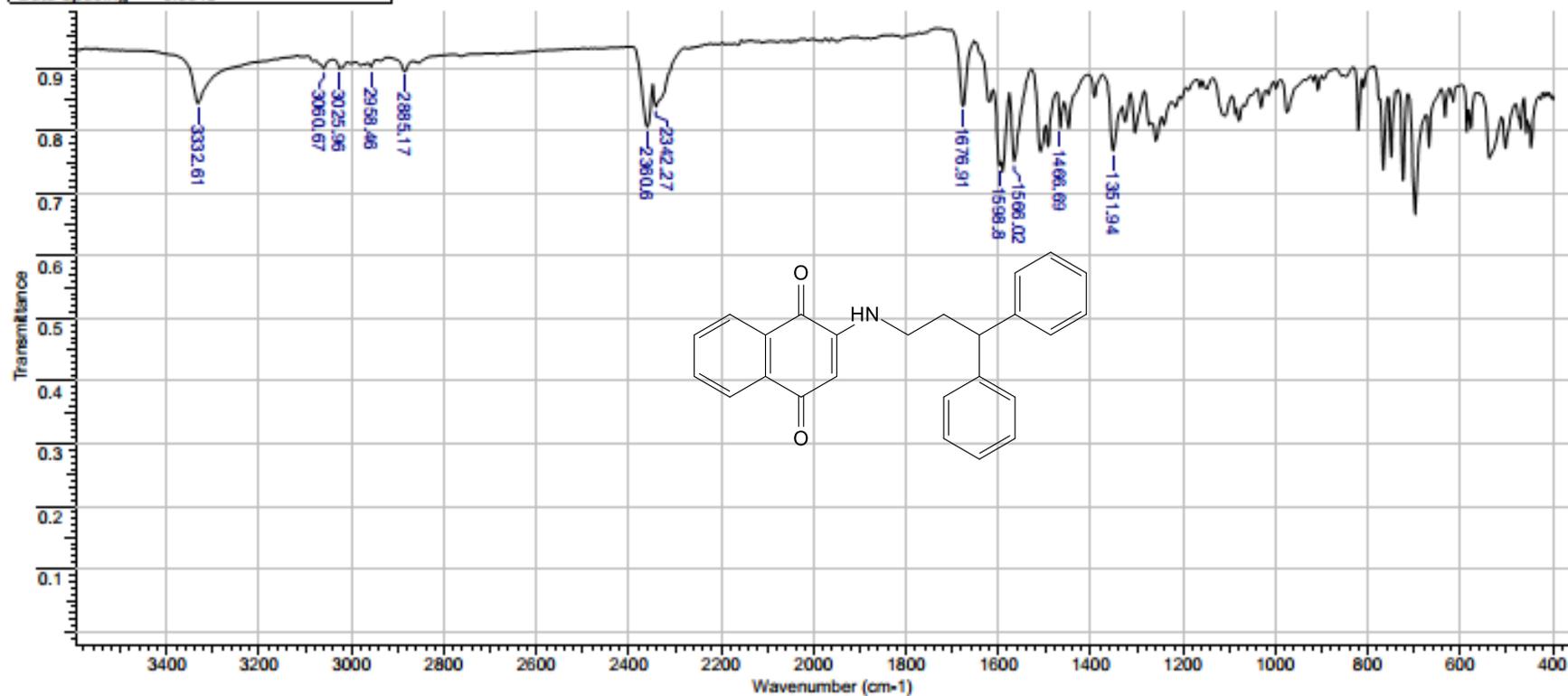
25 Jul 2018

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: NQF (PROTON) - 500MHZ Solvente: CDCL3	Date	10 Mar 2017 15:06:40
File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documentos\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2\NQF_016001r			Frequency (MHz)	500.13
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58
				Points Count	32768
				Temperature (degree C)	21.360



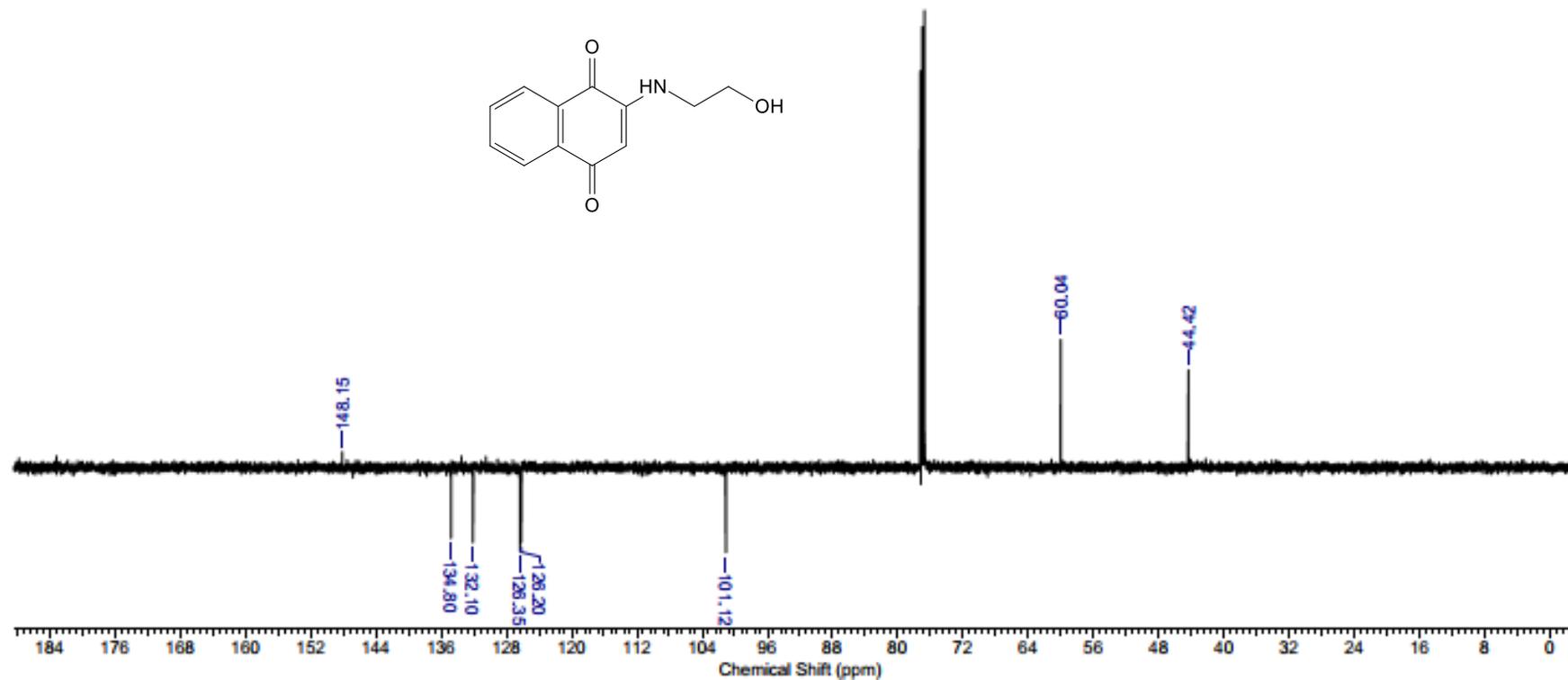
ANEXO XVI – Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 (500 MHz) para o composto NQF

Title NQF - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE							
File Name	C:\USERS\TEMP\DOWNLOADS\NQF - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE.0			Date Stamp	10/10/2017 11:54:32.319 (GMT-3)		
Date	22 Mar 2018 12:02:16	Technique	Infrared	Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR
X Axis	Wavenumber (cm ⁻¹)	Y Axis	Transmittance	Spectrum Range 399.2184 - 3998.9344		Points Count	3734
Data Spacing	0.9643						



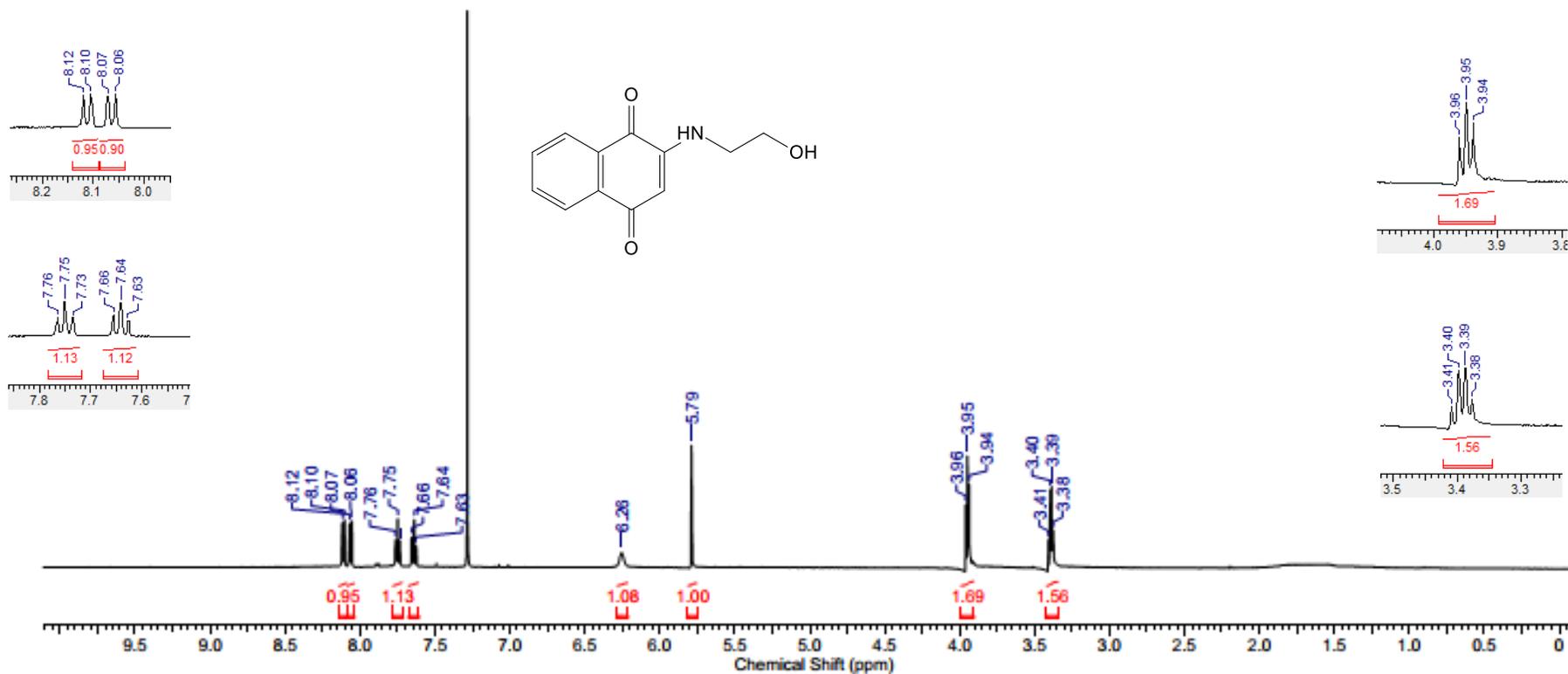
ANEXO XVII – Espectro de IV para o composto NQF

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: NQq (DEPT Q) - 500MHZ Solvente: CDCL3	
Date	03 Apr 2017 16:38:38	File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documentos\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2\NQq_025001r	
Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	13C	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	29761.90	Temperature (degree C)
				21.760



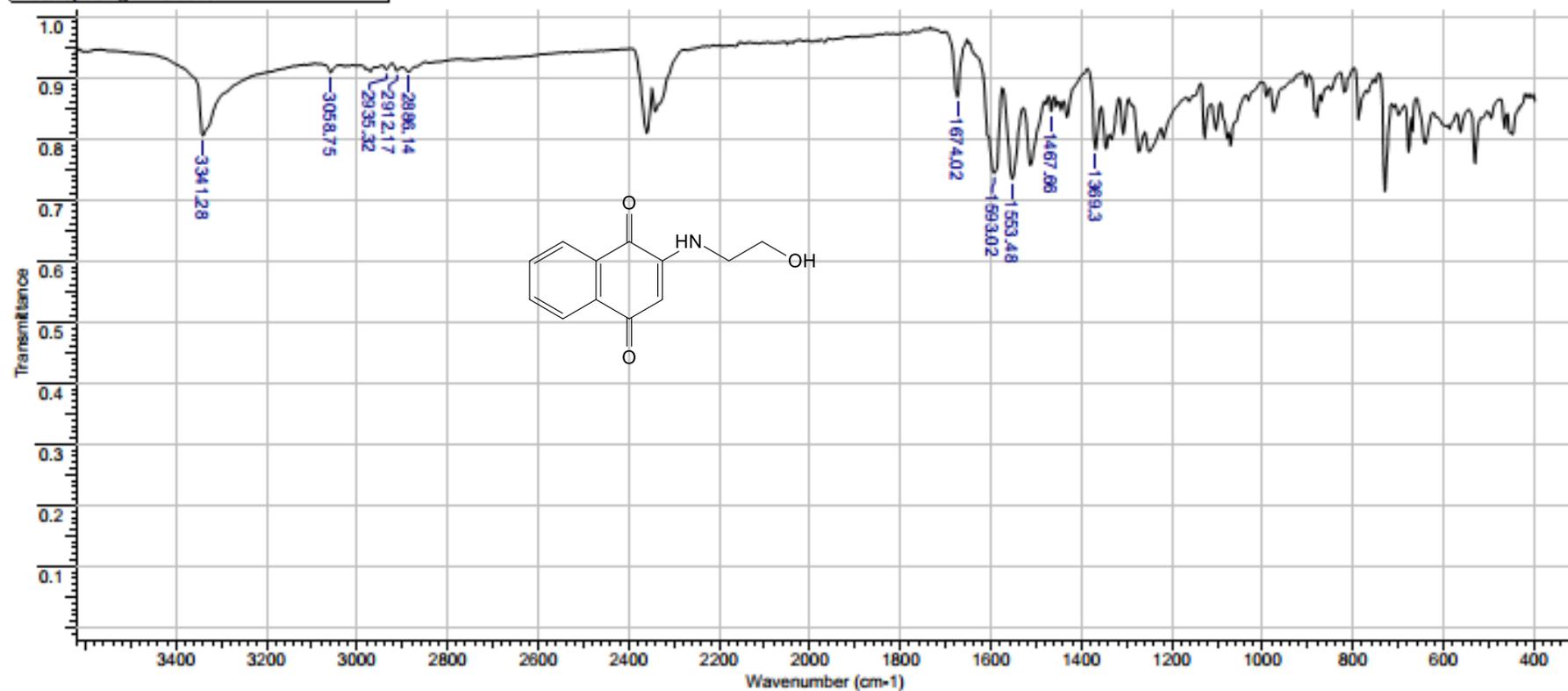
ANEXO XVIII – Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ em CDCl_3 (125 MHz) para o composto NQq

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: NQg (PROTON) - 500MHZ Solvente: CDCl3		Date	03 Apr 2017 15:51:42	
File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documents\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2\NQg_024001r				Frequency (MHz)	500.13	
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58	Temperature (degree C)	21.260



ANEXO XIX – Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 (500 MHz) para o composto NQg

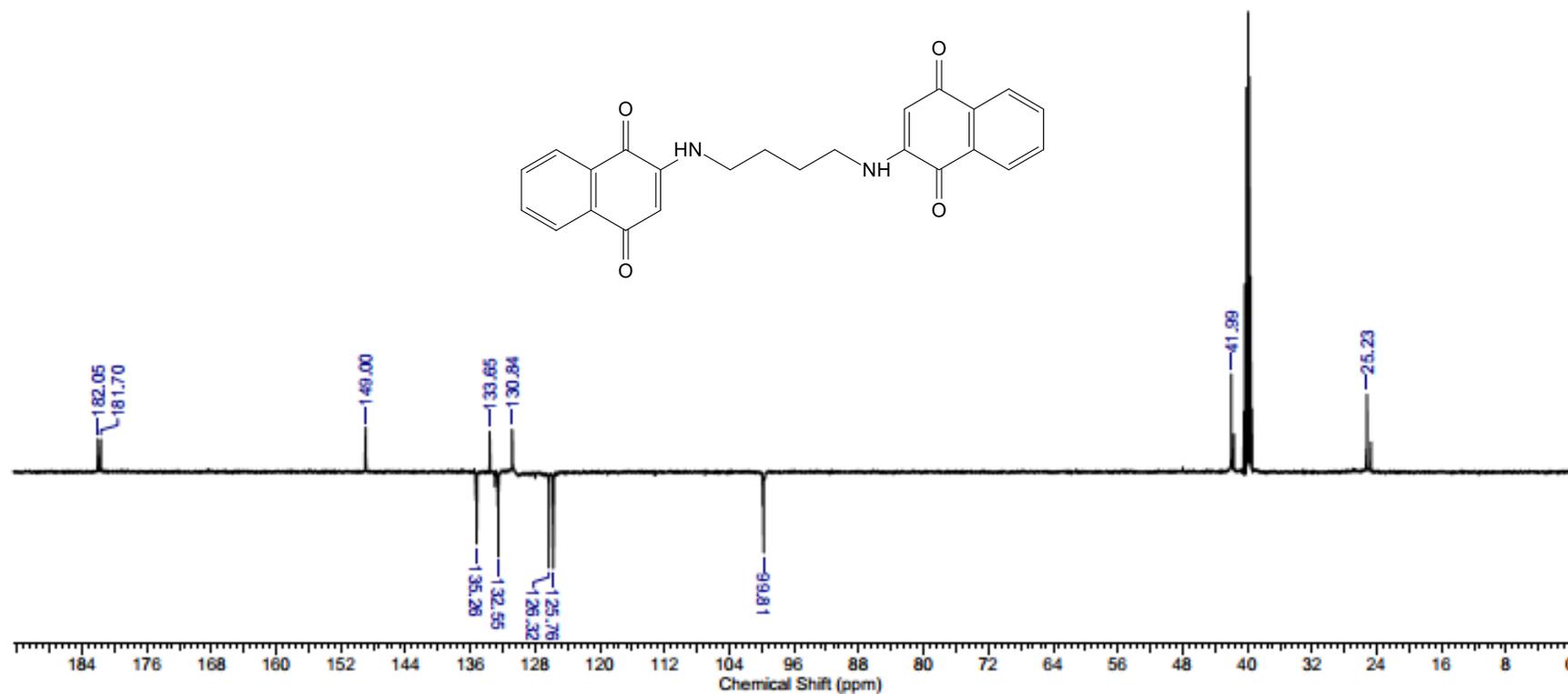
Title		NQg - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE					
File Name		C:\USERS\TEMP\DOWNLOADS\NOG - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE.0		Date Stamp	10/10/2017 11:58:59.339 (GMT-3)		
Date	22 Mar 2018 12:02:22	Technique	Infrared	Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance	Spectrum Range 399.2184 - 3996.9344		Points Count	3734
Data Spacing	0.9643						



ANEXO XX – Espectro de IV para o composto NQG

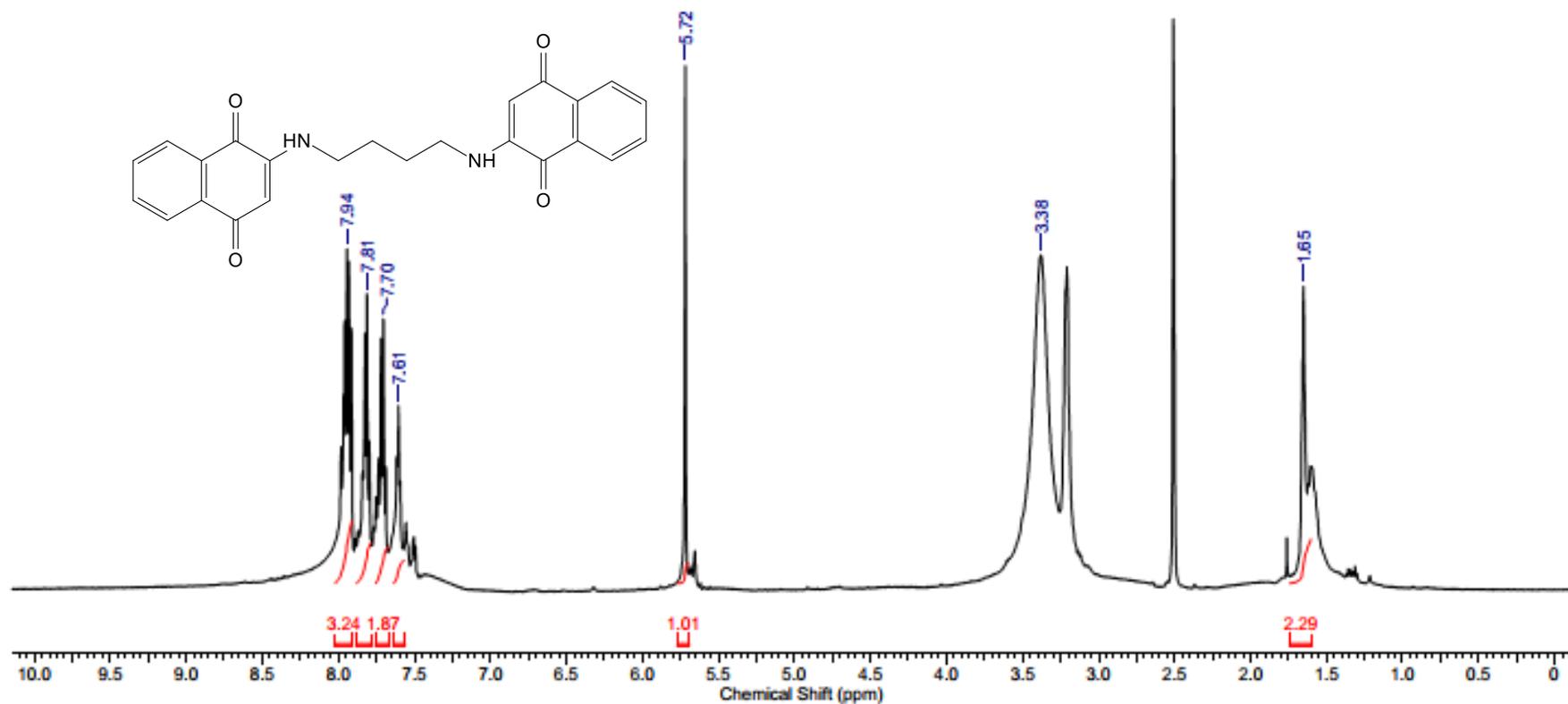
25 Jul 2018

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: NQJ 4C (DEPT Q) - 500MHZ Solvente: DMSO		Date	05 Apr 2018 11:21:16	
File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documents\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2_049001r				Frequency (MHz)	125.76	
Nucleus	¹³ C	Number of Transients	2560	Original Points Count	32768	Points Count	32768
Pulse Sequence	deptqqsp	Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	29761.90	Temperature (degree C)	22.060

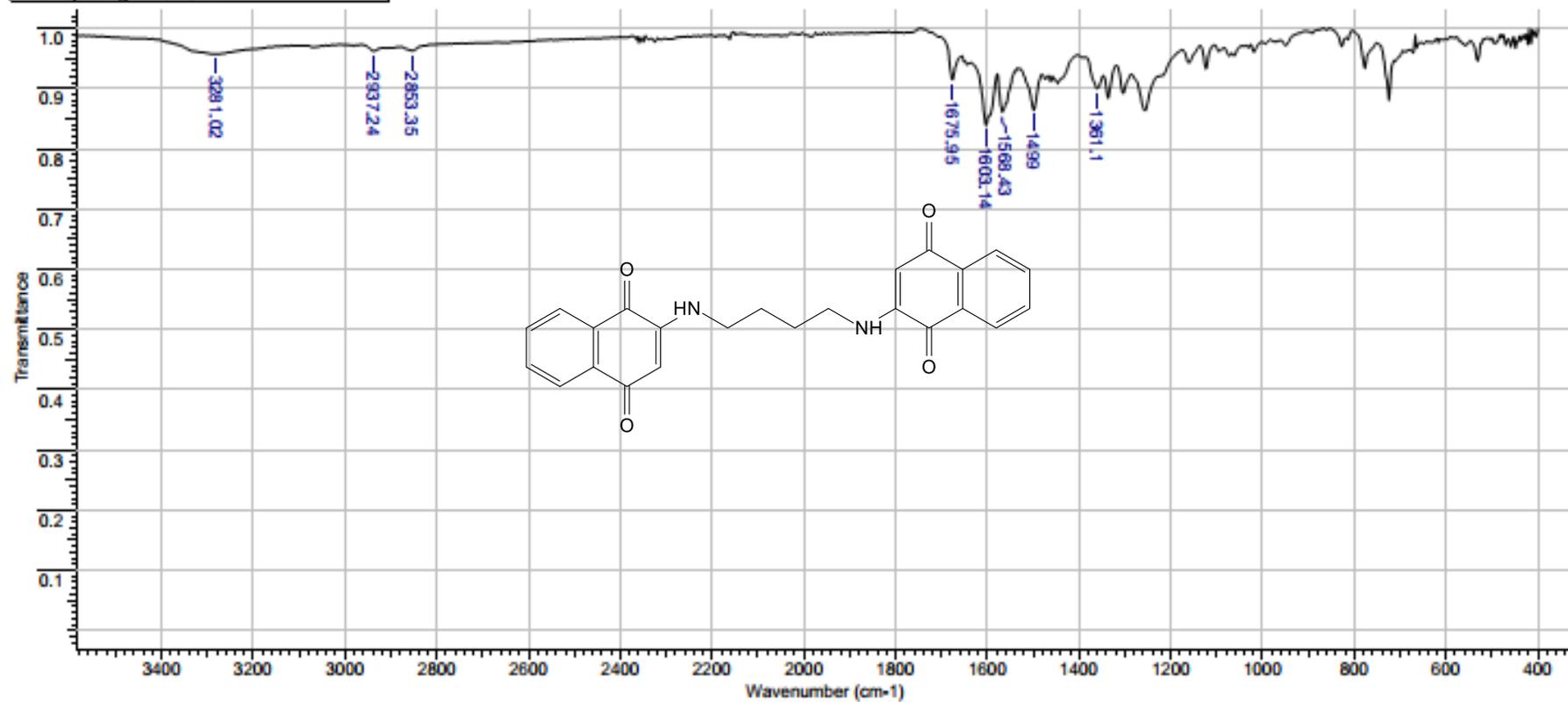
ANEXI XXI – Espectro de RMN ¹³C DEPTQ em DMSO-d₆ (125 MHz) para o composto NQH

25 Jul 2018

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTR: NQJ 4C (PROTON) - 500MHZ Solvente: DMSO		Date	05 Apr 2018 11:20:58	
File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documentos\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2_048001r				Frequency (MHz)	500.13	
Nucleus	¹ H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	10330.58	Temperature (degree C)	21.460

ANEXO XXII – Espectro de RMN ¹H em DMSO-d₆ (500 MHz) para o composto NQH

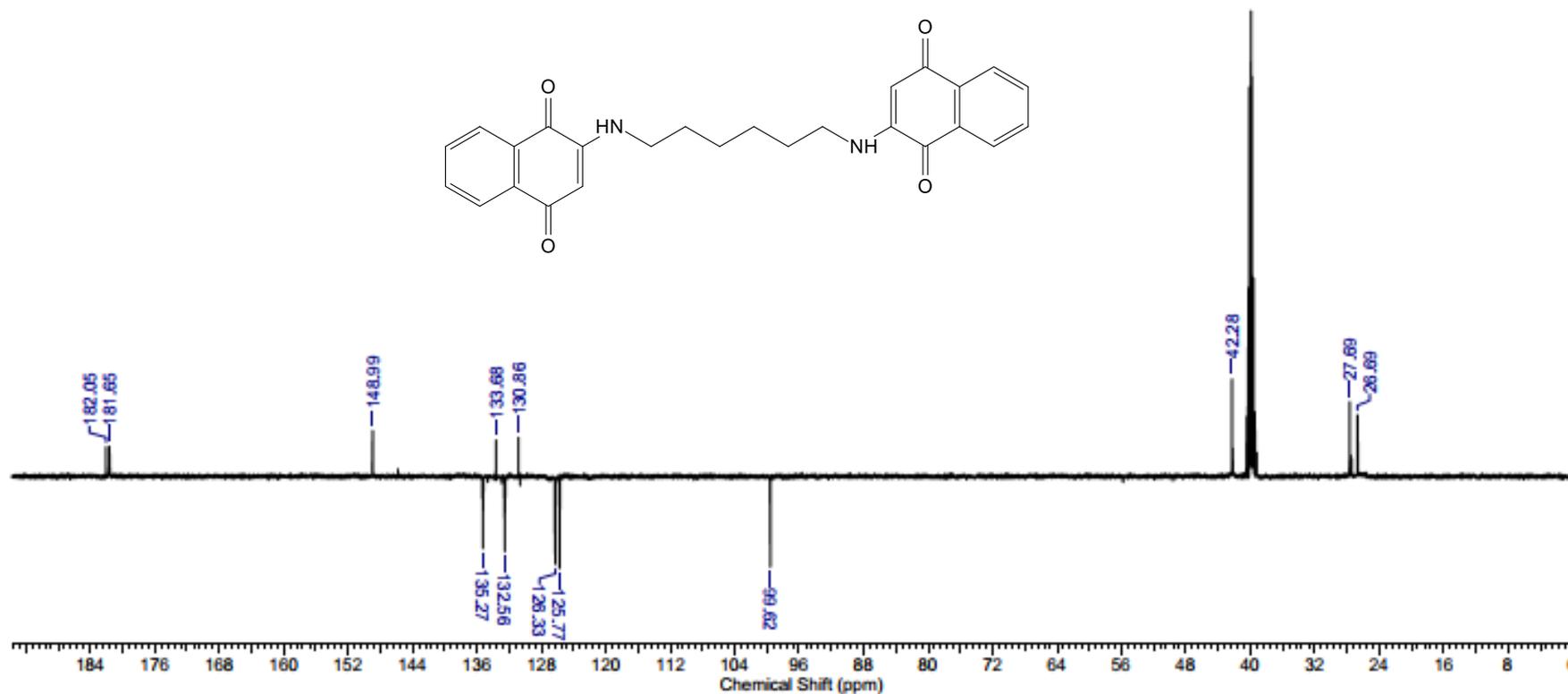
Title NQi - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE						
File Name	C:\USERS\TEMP\DOWNLOADS\NQI - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE.0			Date Stamp	18/07/2018 15:12:34.577 (GMT-3)	
Date	18 Jul 2018 16:11:44	Technique	Infrared	Instrument	VERTEX 70	
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance	Spectrum Range	399.7007 - 3999.4165	
Data Spacing	0.4821				Points Count	7467



ANEXO XXIII – Espectro de IV para o composto NQH

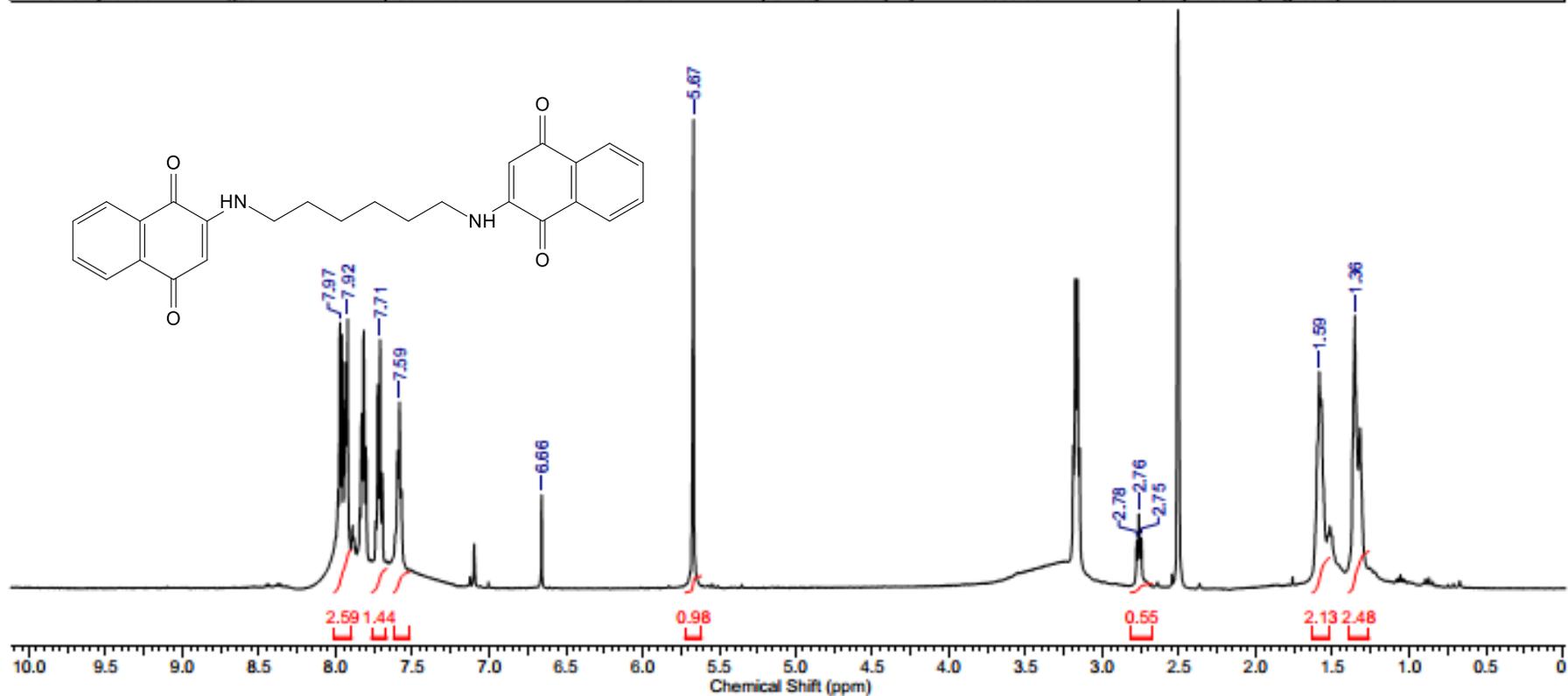
25 Jul 2018

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: NQH (13C DEPT Q) - 500MHZ Solvente: DMSO	Date	28 Mar 2018 10:49:28
File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documents\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2_047001r			Frequency (MHz)	125.76
Nucleus	13C	Number of Transients	1161	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	deptqgpp	Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	29761.90
				Points Count	32768
				Temperature (degree C)	21.960



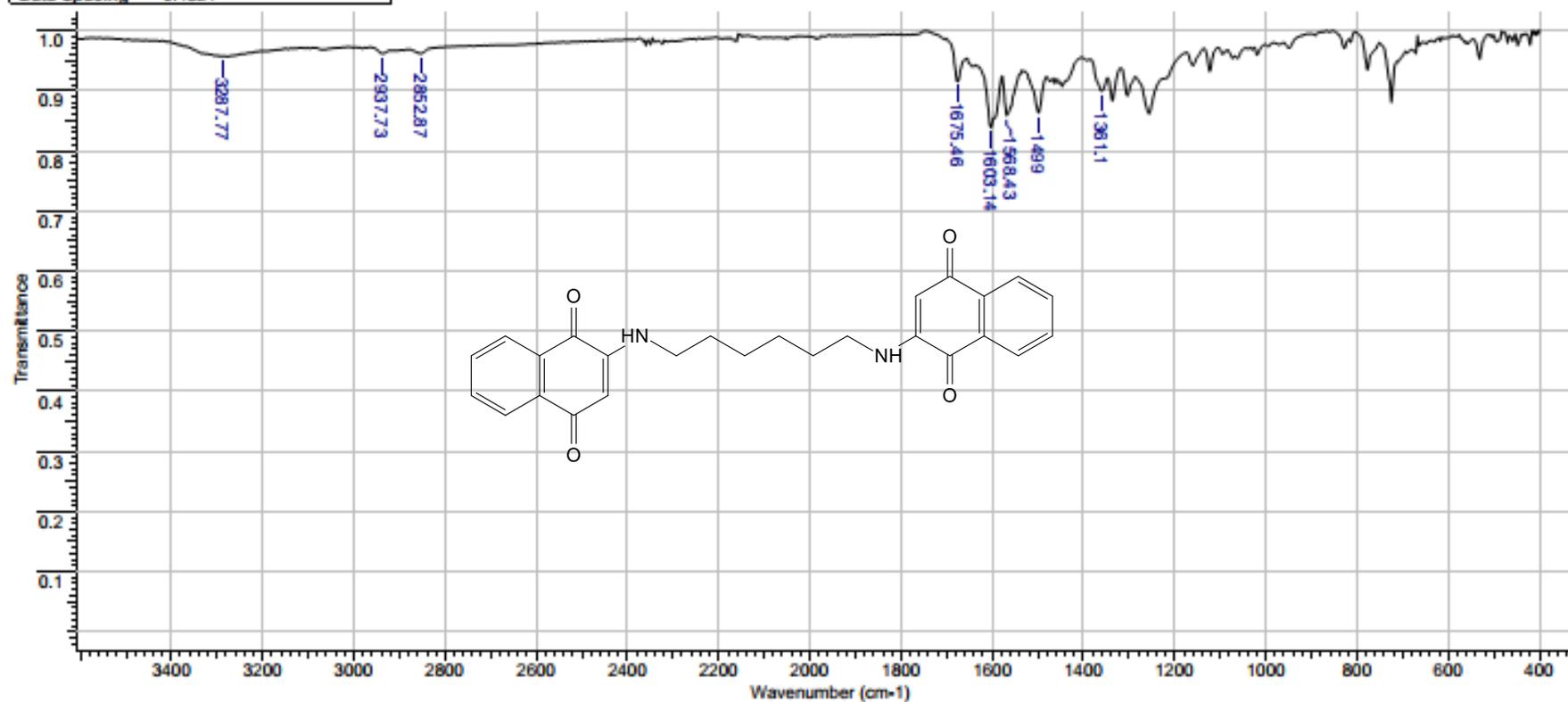
ANEXO XXIV – Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ em DMSO- d_6 (125 MHz) para o composto NQI

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: NQH (PROTON) - 500MHZ Solvente: DMSO	Date	28 Mar 2018 10:46:32
File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documentos\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2_046001r			Frequency (MHz)	500.13
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	10330.58
				Points Count	32768
				Temperature (degree C)	21.460



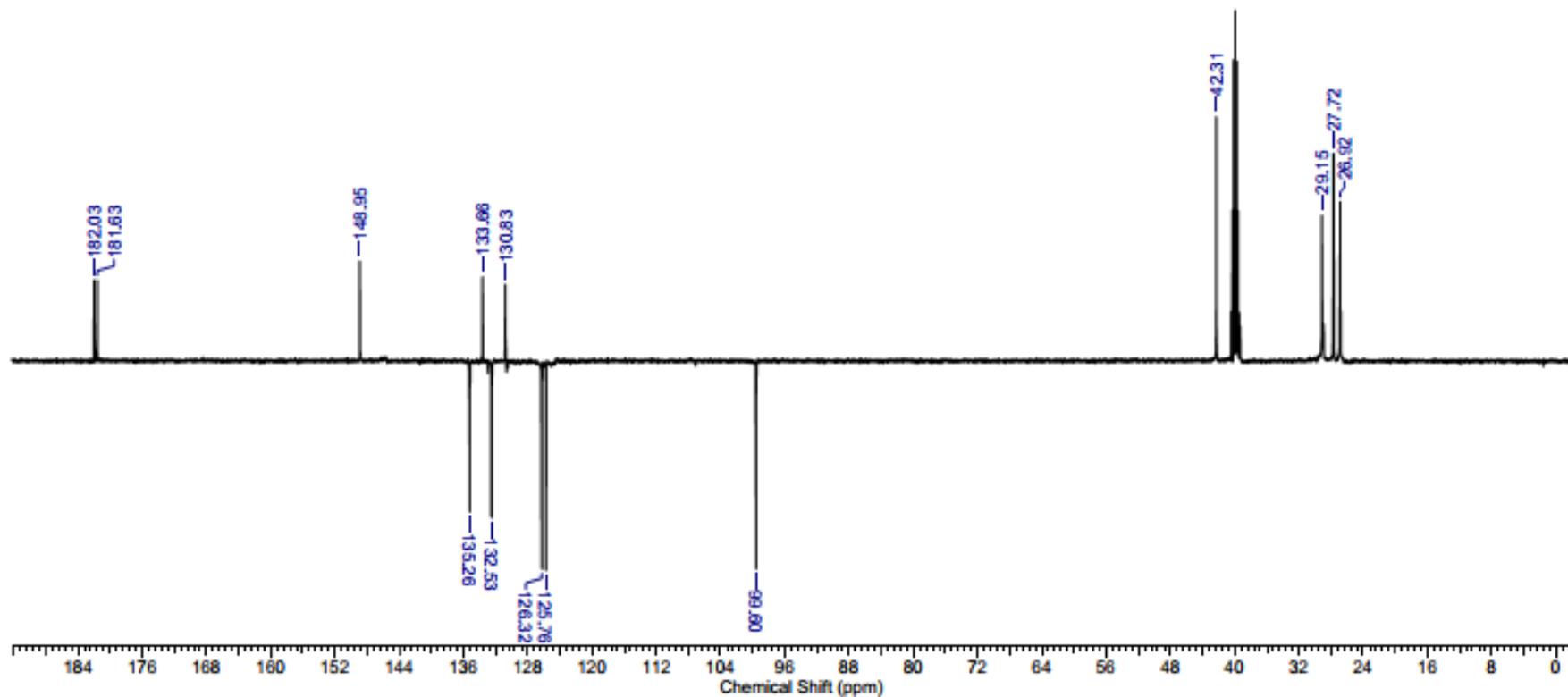
ANEXO XXV – Espectro de RMN ¹H em DMSO-d₆ (500 MHz) para o composto NQI

Title		NQI - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE						
File Name		C:\USERS\TEMP\DOWNLOADS\NQI - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE.1		Date Stamp	18/07/2018 15:16:26.049 (GMT-3)			
Date	18 Jul 2018 16:11:42	Technique	Infrared	Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR	
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance	Spectrum Range		399.7007 - 3999.4165	Points Count	7467
Data Spacing	0.4821							



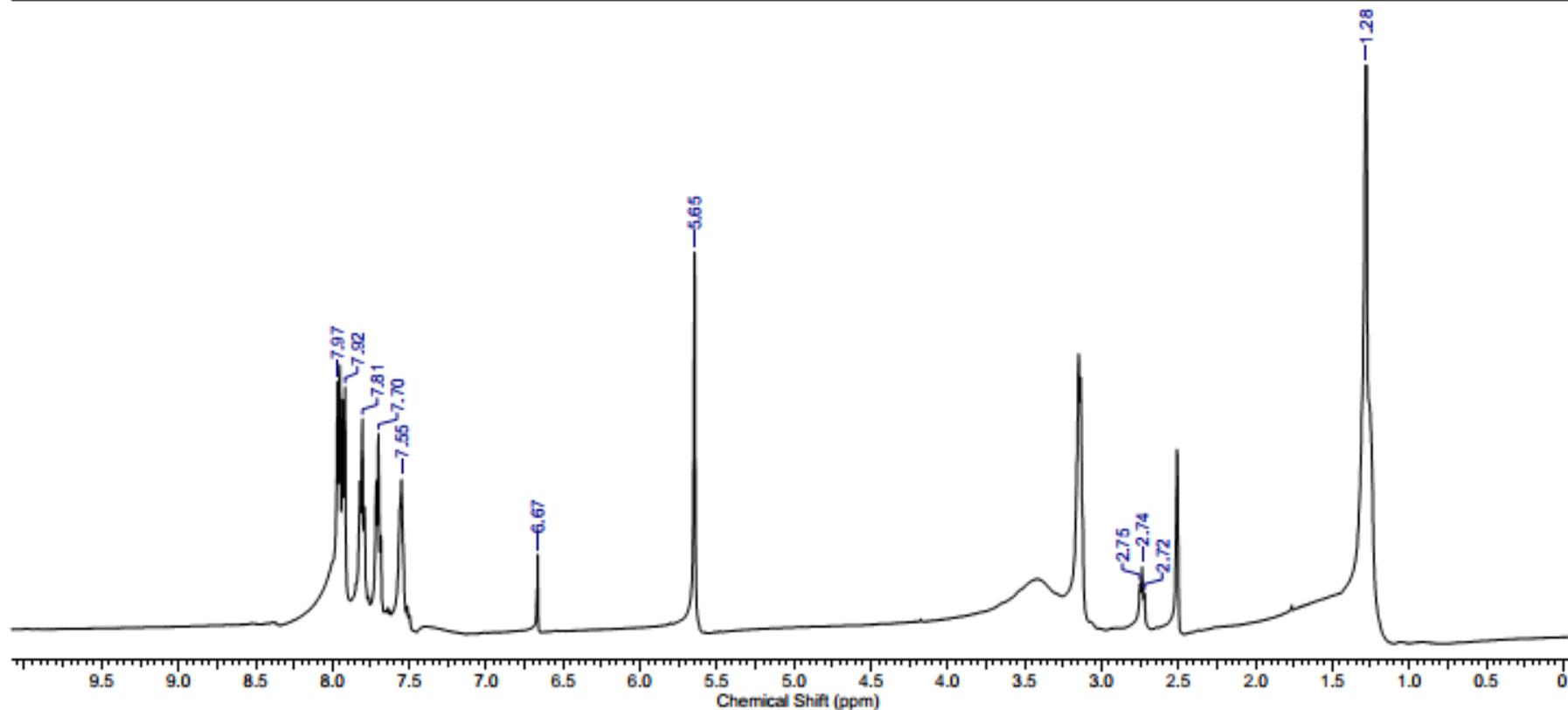
ANEXO XXVI – Espectro de IV para o composto NQI

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: NQJ 8C (DEPT Q) - 500MHZ Solvente: DMSO	Date	05 Apr 2018 11:44:52
File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documentos\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2_051001r			Frequency (MHz)	125.76
Nucleus	¹³ C	Number of Transients	1031	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	deptqgppsp	Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	29761.90
				Points Count	32768
				Temperature (degree C)	21.960



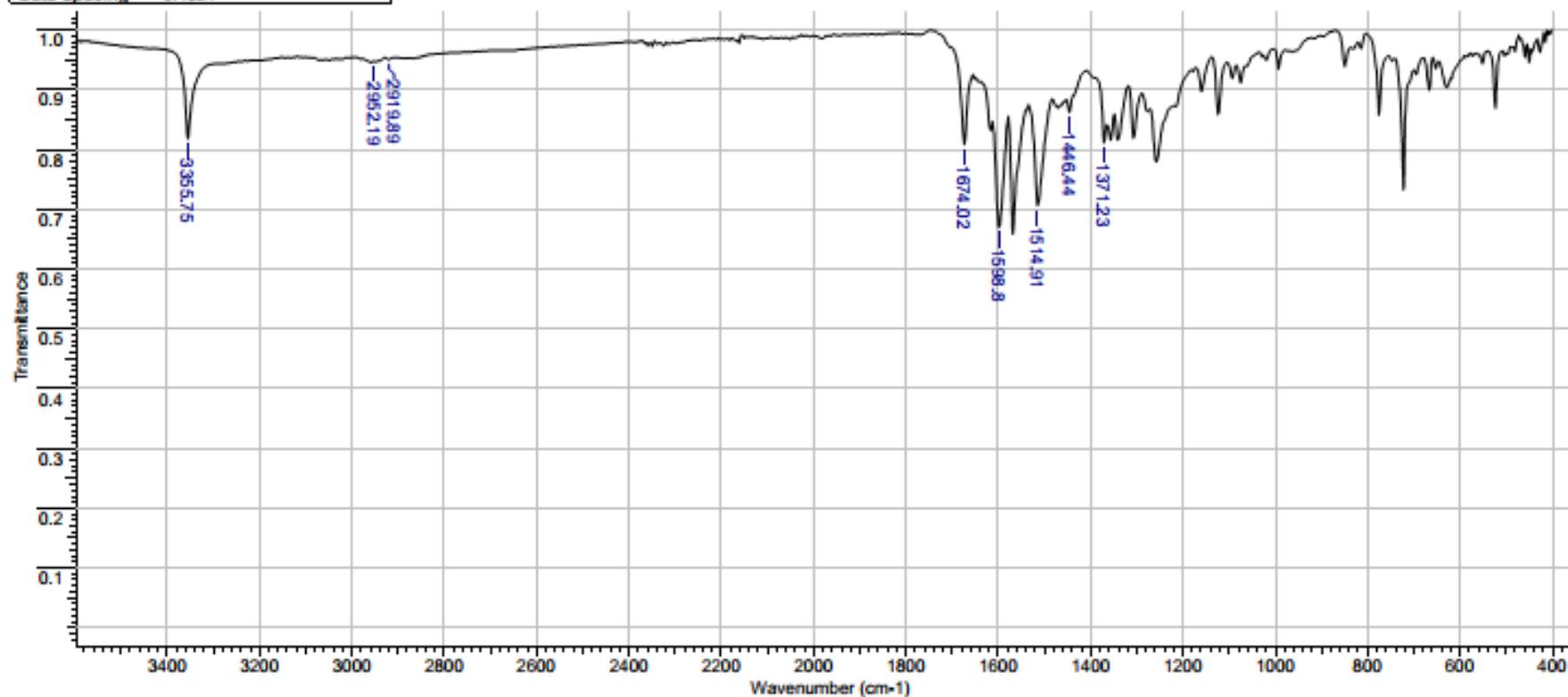
ANEXO XXVII – Espectro de RMN ¹³C DEPTQ em DMSO-d₆ (125 MHz) para o composto NQJ

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: NQI 8C (PROTON) - 500MHZ Solvente: DMSO	Date	05 Apr 2018 11:44:38
File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documentos\Mestrado\Mestrado\Espectros\Carla 2_050001r			Frequency (MHz)	500.13
Nucleus	¹ H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	10330.58
				Points Count	32768
				Temperature (degree C)	21.160



ANEXO XXVIII – Espectro de RMN ¹H em DMSO-d₆ (500 MHz) para o composto NQJ

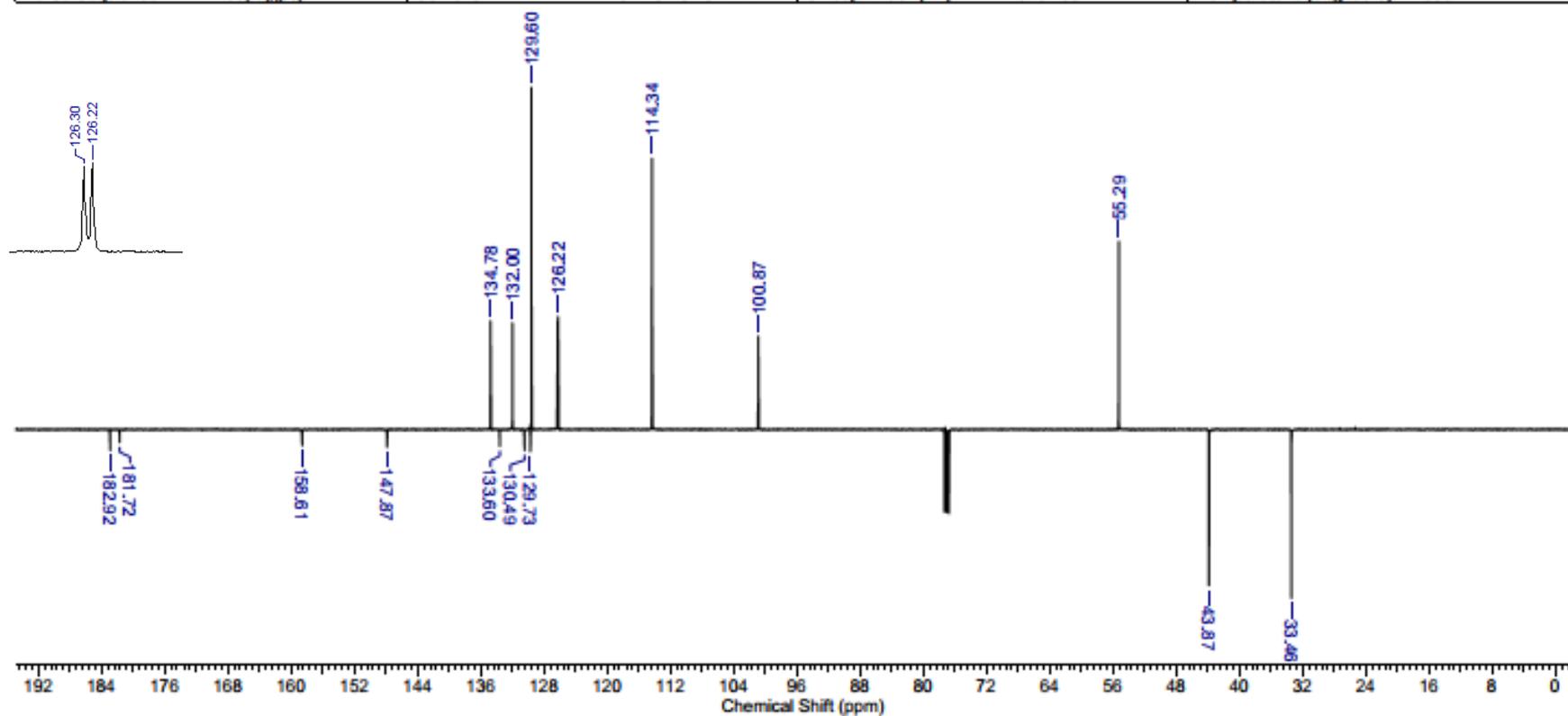
Title		NQJ - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE		Date Stamp	18/07/2018 15:23:55.035 (GMT-3)
File Name		C:\USERS\TEMP\DOWNLOADS\NQJ - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE.0		Spectral Region	IR
Date	18 Jul 2018 16:04:10	Technique	Infrared	Instrument	VERTEX 70
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance	Spectrum Range	399.7007 - 3999.4165
Data Spacing	0.4821			Points Count	7467



ANEXO XXIX – Espectro de IV para o composto NQJ

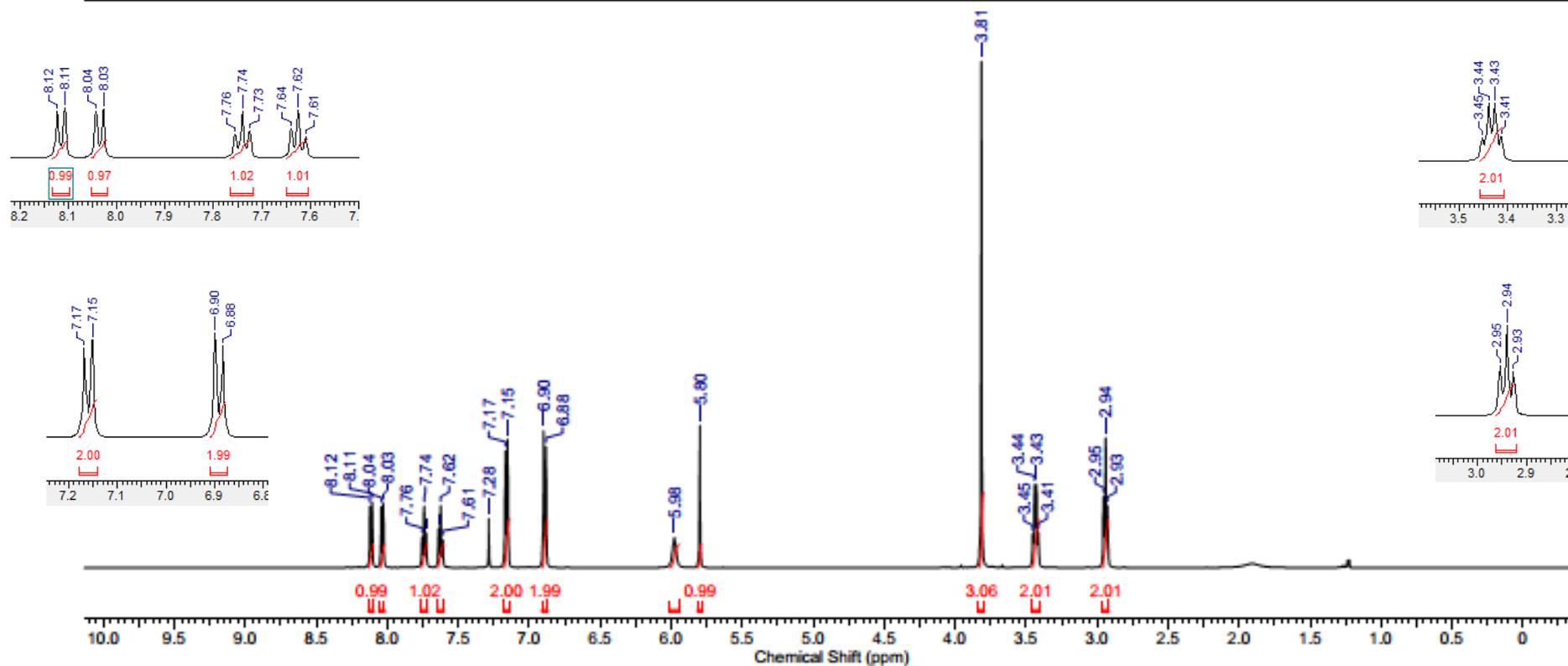
25 Jul 2018

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: NQK (13C DEPT Q) - 500MHZ Solvente: CDCl3	Date	17 Jul 2018 17:58:16
File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documents\Mestrado\Disseria * o\Espectros 053001r			Frequency (MHz)	125.76
Nucleus	13C	Number of Transients	2560	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	deptqgppsp	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	29761.90
				Points Count	32768
				Temperature (degree C)	22.036



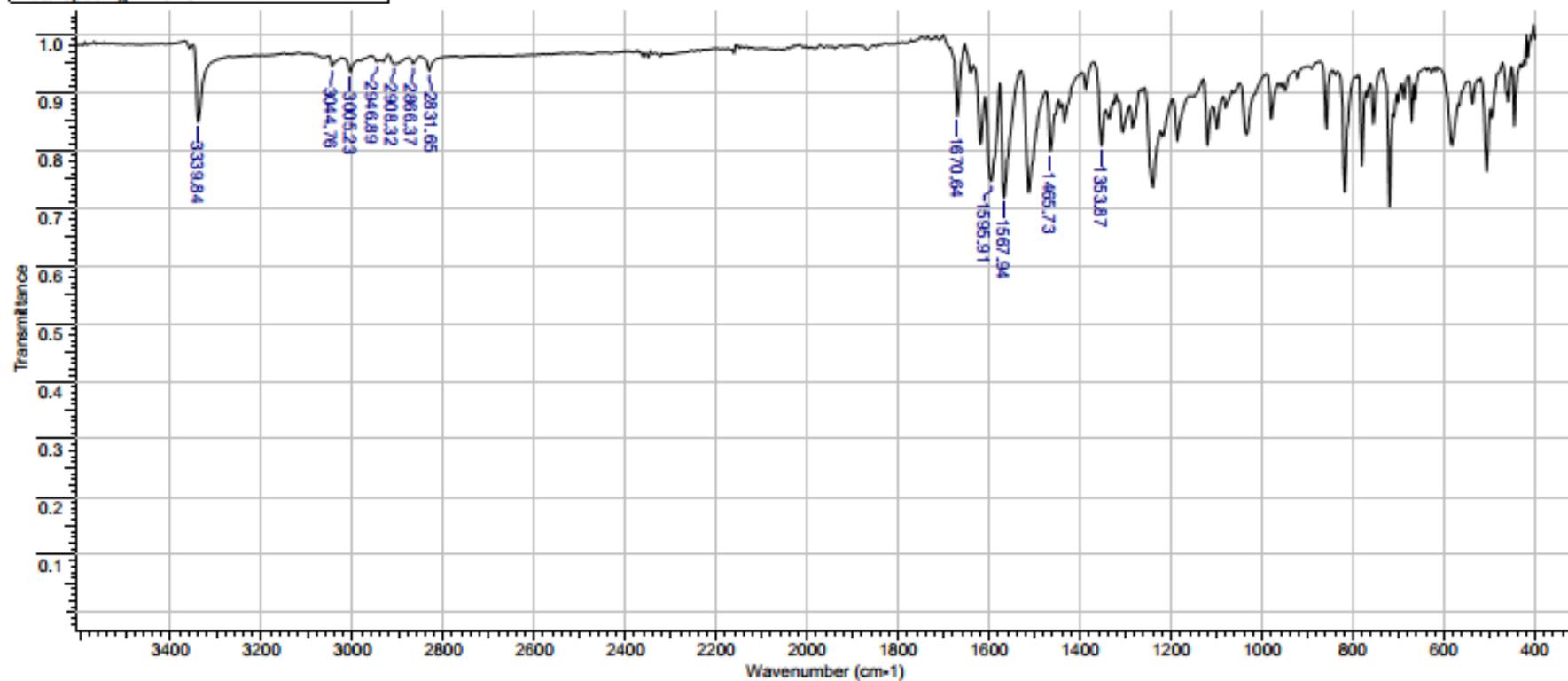
ANEXO XXX – Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ em CDCl_3 (125 MHz) para o composto NQK

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: NQK (PROTON) - 500MHZ Solvente: CDCl3	Date	17 Jul 2018 15:43:14
File Name	C:\Users\TEMP\OneDrive\Documents\Mestrado\Dissera *o\Espectros 052001r			Frequency (MHz)	500.13
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58
				Points Count	32768
				Temperature (degree C)	20.502



ANEXO XXXI – Espectro de RMN ¹H em CDCl₃ (500 MHz) para o composto NQK

Title NQK - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE				
File Name C:\USERS\TEMP\DOWNLOADS\NQK - CARLA CRISTINA - AUREA ECHEVARRIE.0			Date Stamp	18/07/2018 15:32:06.803 (GMT-3)
Date	18 Jul 2018 16:04:08	Technique	Infrared	Instrument VERTEX 70
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance	Spectral Range 399.7007 - 3999.4165
Data Spacing	0.4821			Points Count 7467



ANEXO XXXII – Espectro de IV para o composto NQK