

Samira Gama Reis
Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Química
Mestrado em Química

Samira Gama Reis

**Síntese e avaliação biológica de aminas e aminoalcoóis aromáticos
e heteroaromáticos**

Juiz de Fora
2012

Síntese e avaliação biológica de aminas e aminoalcoóis aromáticos e heteroaromáticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração: Química Orgânica, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Mireille Le Hyaric

Juiz de Fora
2012

À você, minha mãe, que esteve sempre ao meu lado.
Agradeço pelo carinho, dedicação e ensinamentos.

Ao meu pai que sempre me incentivou e apoiou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida, por iluminar meus passos e permitir a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Mireille Le Hyaric pela oportunidade e ensinamentos compartilhados que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos os professores que passaram por minha vida, por terem contribuído para o crescimento profissional e pessoal, em especial aos professores do Departamento de Química.

Aos meus queridos amigos de laboratório Adriane, Angelina, Balbino, Bianca, Camila, Celso, Eloah, Elisabete, Fábio, Jaqueline, Isabela, Lara, Larissa, Lígia, Rodrigo, Tayrine, Talita, Vanessa, Wiliam pela amizade estabelecida e por todos os conhecimentos compartilhados, por proporcionarem um ambiente alegre e descontraído.

A todos os amigos do Departamento de Química pela convivência e amizade.

Aos professores do Departamento de Microbiologia pela valorosa parceria que tornou possível a realização dos testes biológicos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia pela amizade estabelecida e por toda a ajuda na realização dos testes biológicos.

A todos os funcionários do departamento de química por serem sempre prestativos e atenciosos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-REUNI) pelo suporte financeiro, tornando possível a realização deste trabalho.

A minha amiga Luciene que apesar de não estar mais neste plano, sempre me ajudou a enfrentar todos os obstáculos.

Ao meu tio Ricardo por ser o exemplo em quem espelhar em todos os aspectos da vida, por despertar em mim o interesse pela ciência e por ter incentivado nos primeiros passos na pesquisa científica.

Agradeço a **toda** minha família pela confiança em mim, por me amar incondicionalmente e por serem presença constante em minha vida.

A todos meus amigos pela convivência, incentivo e paciência.

Aos meus pais, por serem instrumentos de Deus, no Dom da Vida. Pelo amor, carinho e por me ajudarem a tornar meus sonhos em realidade. Muito obrigada. Agradeço por tudo!

Agradeço a minha “Vó” Rosa (*in memoriam*) por todo amor, carinho, ensinamentos de vida.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

“As grandes mudanças não ocorrem por grandes feitos de alguns e, sim, nas pequenas parcelas cotidianas de todos nós!” Chico Xavier

RESUMO

Síntese e avaliação biológica de aminas e aminoalcoóis aromáticos e heteroaromáticos

Tem-se observado um aumento do número de bactérias e protozoários resistentes aos quimioterápicos em uso. Desta forma, esses fármacos correm o risco de se tornarem obsoletos, tornando imprescindível o desenvolvimento de novos compostos que sejam biologicamente ativos. Dentre as diversas classes de compostos antimicrobianos ou antiprotozoários têm tido destaque os grupos aminoalcoóis e os heterociclos aromáticos, presente em muitos fármacos.

Dando continuidade aos estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, neste trabalho são descritas as sínteses de aminas e aminoalcoóis por aminação reductiva de benzaldeídos substituídos (*p*-octiloxi-, *p*-nitrobenzaldeído, *p*-metóxi benzaldeído), e de 2- e 4-piridina carboxaldeídos com monoetanolamina, 2-amino-2-metilpropanol e com a octilamina.

Na segunda parte do trabalho foram sintetizados compostos derivados do metronidazol, substância de amplo espectro de atividade. Os compostos foram obtidos a partir de substituição nucleofílica do mesilato de metronidazol, com diferentes amino álcoois e octilamina.

Após purificação e caracterização através dos métodos espectroscópicos usuais (RMN ^1H e ^{13}C e IV), as propriedades biológicas dos compostos obtidos foram avaliados *in vitro*. A avaliação da atividade antibacteriana contra diversos micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos foi feita através da análise do halo de inibição (método de difusão em Agar) e da concentração inibitória mínima (CIM). Os derivados de metronidazol estão sendo avaliados quanto a sua atividade antiparasitária.

Os resultados mostraram que a atividade antibacteriana depende da lipofilia, já que todos os compostos possuindo a cadeia octila inibiram o crescimento bacteriana.

PALAVRAS-CHAVE: Aminoalcoóis, atividade biológica e metronidazol.

ABSTRACT

Synthesis and biological evaluation of aromatic amines and amino alcohols and heteroaromatic

An increased number of bacteria and protozoa resistant to the usual chemotherapy has been observed. Thus, these drugs could become obsolete, making essential the development of new biologically active compounds. Among the various classes of antimicrobial and antiprotozoal compounds, amino alcohols and heterocyclic aromatic groups have been highlighted, as they are found in many drugs.

Giving continuity to the ongoing studies conducted by our research group, in this work are described the synthesis of amines and amino alcohols by reductive amination of substituted benzaldehydes (*p*-octyloxy, *p*-methoxy and *p*-nitro benzaldehyde) and of 2-pyridil and 4-pyridil carboxaldehydes with monoethanolamine, 2-amino-2-methylproanol and octylamine.

In the second part of the work compounds were synthesized from metronidazole, a substance with a broad spectrum of activity. The compounds were obtained by nucleophilic substitution of metronidazole mesylate with different amino alcohols and octylamine.

After purification and characterization through the usual spectroscopic methods (^1H NMR, ^{13}C NMR and IR), the biologic properties of the obtained compounds were evaluated *in vitro*. The evaluation of the antibacterial activity was performed against gram-positive and gram-negative microorganisms, through the analysis of the halo of inhibition and of the minimum inhibitory concentration. The metronidazole derivatives are being evaluated for their antiparasitic properties.

The results show that the antibacterial activity depends on lipophilicity, since all the compounds carrying the octyl chain were active.

KEY WORDS: amino alcohols, biological activity and metronidazole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura da parede celular de bactéria gram-negativa e gram-positiva.....	1
Figura 2 Mecanismos de resistência bacteriana.....	3
Figura 3 Estrutura química do metronidazol, da histamina e dopamina.....	5
Figura 4 Estrutura química do FTY720 e do etambutol	6
Figura 5 Estrutura química da quinina e da nitrofurazona	7
Figura 6 Estrutura química da anabasina e PAM-86.....	8
Figura 7 Dependência da velocidade da reação de acetona com hidroxilamina em função do pH.....	12
Figura 8 Estruturas químicas de potenciais antimicrobianos.....	14
Figura 9 Espectro de RMN de ^1H de 11	18
Figura 10 Espectro de RMN de ^{13}C de 11	19
Figura 11 Espectro de RMN de ^1H de 15a	21
Figura 12 Espectro de RMN de ^{13}C de 15a	21
Figura 13 Espectro de IV de 15a	22
Figura 14 Espectro de RMN de ^1H de 16c	23
Figura 15 Espectro de RMN de ^{13}C de 16c	24
Figura 16 Espectro no IV de 16c	24
Figura 17 Espectro de RMN de ^1H de 17b	25
Figura 18 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 17b	26
Figura 19 Espectro na região no infravermelho de 17b	27
Figura 20 Espectro de RMN de ^1H de 20c	28
Figura 21 Espectro de RMN de ^{13}C do composto 20c	28
Figura 22 Espectro no IV de 20c	29
Figura 23 Espectro de RMN de ^1H de 21b	30
Figura 24 Espectro de RMN de ^{13}C de 21b	30
Figura 25 Espectro de IV de 21b	31
Figura 26 Moléculas sob influência do campo elétrico.....	33
Figura 27 Espectro de RMN de ^1H de 24c	36
Figura 28 Espectro de RMN de ^{13}C de 24c	36
Figura 29 Espectro de RMN de ^1H de 27c	39
Figura 30 Espectro de RMN de ^{13}C de 27c	39
Figura 31 <i>S. Aureus</i>	40
Figura 32 <i>E. coli</i>	41
Figura 33 <i>S. epidermidis</i>	42
Figura 34 <i>P. aeruginosa</i>	42

Figura 35 Procedimento ensaio biológico (halo de inibição).....	71
Figura 36 Medida do halo de inibição.....	72
Figura 37 Método diluições sucessivas.....	73
Figura 38 Procedimento de determinação da concentração mínima bactericida.....	74

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Biorredução de nitrocompostos.....	6
Esquema 2 Obtenção de amina por redução.....	8
Esquema 3 Obtenção de amina por S _N 2.....	9
Esquema 4 Obtenção de amina por rearranjo de Curtius.....	9
Esquema 5 Obtenção de amina por síntese de Gabriel.....	9
Esquema 6 Obtenção de amina por aminação redutiva.....	10
Esquema 7 Mecanismo de aminação redutiva.....	11
Esquema 9 Síntese dos derivados benzaldeídos e piridínicos por aminação redutiva.....	15
Esquema 10 Síntese dos aminoalcoóis derivados do metronidazol.....	16
Esquema 11 Síntese do <i>p</i> -octiloxibenzaldeído.....	17
Esquema 12 Síntese dos compostos 15 a-c , 16 a-c , 17 a-c , 18 a-c e 19 a-c	20
Esquema 13 Proposta de mecanismo para a reação de condensação entre MTZMs e 2-amino-2-metilpropanol.....	35
Esquema 14 Proposta de síntese dos derivados metronidazol.....	38
Esquema 15 Tentativa de síntese de 27c	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tentativas de obtenção de aminoálcoois derivados do metronidazol.....	32
Tabela 2 Medida do halo de inibição em mm.....	44
Tabela 3 logP calculado por ChemDraw 8.0 (ACD Labs).....	46
Tabela 4 Concentração mínima inibitória CIM ($\mu\text{g/mL}$).....	47
Tabela 5 Concentração inibitória bactericida ($\mu\text{g/mL}$).....	48
Tabela 6 Parâmetros calculados pelo Osiris® Property Explorer.....	50
Tabela 7 Toxicidade teórica obtida com o programa Osiris® Property Explorer.....	52
Tabela 8 Valores de druglikeness e drugscore calculados pelo Osiris® Property Explorer.....	53
Tabela 9 Estequiometria das reações de aminação redutiva.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Δ	aquecimento
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
Alif	alifático
Aro	aromático
CCD	cromatografia em camada delgada
CCS	cromatografia em coluna de sílica
CIM	concentração inibitória mínima
CMB	concentração mínima bactericida
d	duplete
DMF	dimetilformamida
def.	deformação
dd	duplete duplo
DMSO	dimetilsulfóxido
δ	deslocamento químico
ν	frequência
F.M.	fórmula molecular
Hz	Hertz
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento
M.M.	massa molecular
MHz	megaHertz
CIM	concentração inibitória mínima
m	multiplete
ppm	partes por milhão
RMN de ^1H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de ^{13}C	ressonância magnética nuclear de carbono
s	simpleto
sl	sinal largo
t	tripleto
t.a.	temperatura ambiente
v/v	volume por volume
MO	micro-ondas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	1
1.2. RESISTÊNCIA AOS ANTIPROTOZOÁRIOS.....	4
1.3. ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS NITROGENADOS	4
1.3.1. Atividade biológica das aminas.	4
1.3.2. Atividade biológica de aminoalcoóis	5
1.3.3. Importância do grupo nitro.....	6
1.3.4. Compostos heterociclos nitrogenados.....	7
1.4. PRINCIPAIS MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE AMINAS.....	8
1.5. REAÇÕES DE AMINAÇÃO REDUTIVA.....	10
2. OBJETIVOS E PLANO DE SÍNTESE	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1. SÍNTESE DOS COMPOSTOS POR AMINAÇÃO REDUTIVA.....	17
3.1.1. Síntese e caracterização do <i>p</i> -octiloxibenzaldeído 11	17
3.1.2. Síntese e caracterização do 2-[4-(octiloxi)benzilamino]etanol 15a	20
3.1.3. Síntese e caracterização do <i>N</i> -(4-metoxibenzilamino)-2-metilpropanol 16c	32
3.1.4. Síntese e caracterização do <i>N</i> -(4-nitrobenzil)octilamina 17b	25
3.1.5. Síntese e caracterização do <i>N</i> -(4-piridilmetilamino)-2-metilpropanol 20c	27
3.1.6. Síntese e caracterização do <i>N</i> -(2-piridilmetil)octilamina 21b	30
3.2. SÍNTESE DE DERIVADOS DO METRONIDAZOL.....	32
3.2.1. Síntese de aminoalcoóis e amina.....	32
3.2.2. Preparação de amidas derivadas do metronidazol.....	37
3.2.2.1 Síntese do ácido 2-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -1-il)acético 25	38
3.2.2.2 Síntese do 2-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)acetato de metila 26	38
3.2.2.3 Síntese e caracterização do <i>N</i> -[(2-hidroxi-1,1-dimetil)etil]-2-[2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il]acetamida 27c	39
3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	40
3.3.1. Método do halo de inibição (Método de Kirby-Bauer)	42
3.3.2. Determinação da concentração inibitória mínima.....	46
3.3.3 Determinação da concentração mínima bactericida	47
3.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA.....	48
4. ANÁLISE “ <i>in silico</i> ” DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS (ADMET).....	49
4.1. REGRA DOS 5 DE LIPINSKI.....	49
4.2 TOXICIDADE TEÓRICA.....	51

5. PARTE EXPERIMENTAL	55
5.1 MÉTODOS GERAIS.....	55
5.2 PROCEDIMENTO GERAL PARA AS SÍNTESES.....	57
5.2.1 Síntese do <i>p</i> -octiloxibenzaldeído	57
5.3 PROCEDIMENTO GERAL PARA REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA.....	57
5.3.1. Caracterização das substâncias obtidas por aminação reductiva.....	59
2-[(4-octiloxibenzilamino)etanol] 15a	60
<i>N</i> -[(4-octiloxi)benzil]octilamina 15b	59
<i>N</i> -((4-octiloxi)benzilamino)-2-metilpropanol) 15c	60
<i>N</i> -(4-metoxibenzilamino)etanol 16a	60
<i>N</i> -(4-metoxibenzil)octilamina 16b	61
<i>N</i> -(4-metoxibenzilamino)-2-metilpropanol 16c	62
<i>N</i> -(4-Nitrobenzilamino)etanol 17a	62
<i>N</i> -(4-nitrobenzil)octilamina 17b	63
<i>N</i> -(4-Nitrobenzilamino)-2-metilpropanol 17c	63
<i>N</i> -(4-Piridilmetilamino)etanol 20a	64
<i>N</i> -(4-Piridilmetil)octilamina 20b	64
<i>N</i> -(4-piridilmetilamino)-2-dimetiletanol 20c	65
<i>N</i> -(2-Piridilmetilamino)etanol 21a	66
<i>N</i> -(2-piridilmetil)octilamina 21b	66
<i>N</i> -(4-Piridilmetilamino)-2-metilpropanol 21c	67
5.4. SÍNTESE DOS DERIVADOS DO METRONIDAZOL	67
5.4.1. Procedimento geral para a síntese de 24b e 24c	67
5.4.2. Caracterização dos derivados metronidazólicos.....	68
<i>N</i> -[2-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etil]octan-1-amina 24b	68
2-(2-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etilamino)-2-metilpropan-1-ol 24 c	68
8-(2-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etilamino)octan-1-ol 24d	69
5.4.3. Procedimento geral para síntese do ácido 2-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -il)acético	69
5.4.4. Procedimento geral para síntese do 2-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -il)acetato de metila.	69
5.5. Procedimento geral e caracterização de amida derivada do metronidazol	70
5.6. Procedimento geral para realização dos testes biológicos	70
5.6.1 Teste halo de inibição	70

5.6.2	Macrodiluição em caldo (concentração inibitória mínima).....	72
5.6.3	Determinação da concentração mínima bactericida.....	73
6.	CONCLUSÃO.....	75
7.	REFERÊNCIAS.....	77

1. INTRODUÇÃO

Microorganismos patogênicos, como bactérias, fungos e parasitas, são responsáveis por causar uma série de enfermidades que podem ser tratadas com o uso de agentes quimioterápicos. Um dos grandes problemas para o tratamento destas doenças está associado ao fenômeno de resistência que provoca uma diminuição do poder terapêutico ocasionando um grande problema de saúde pública (Murray *et al.*, 2006).

1.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA

As bactérias constituem o grupo de seres vivos com maior massa total do planeta. São classificadas em bactérias gram-positivas ou gram-negativas de acordo com as diferenças na composição e na estrutura da parede celular (Figura 1). Essas diferenças podem ser visualizadas através do método de coloração diferencial de Gram: as bactérias são classificadas como Gram-positivas, quando coradas pelo método ou Gram-negativas, quando não coradas (Trabulsi e Alterthum, 2004; Murray *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2001). A parede celular das bactérias gram-negativas é a mais complexa, uma vez que apresentam maior teor em lipídios, um espaço periplasmático contendo enzimas, uma dupla camada lipídica e presença de polissacarídeos complexos na superfície externa. Essa maior complexidade explica a dificuldade que determinados compostos apresentam em penetrar a célula bacteriana. Esta permeabilidade limitada é responsável pela baixa sensibilidade que apresentam a ação de quimioterápicos (Trabulsi e Alterthum, 2004; Murray *et al.*, 2006).

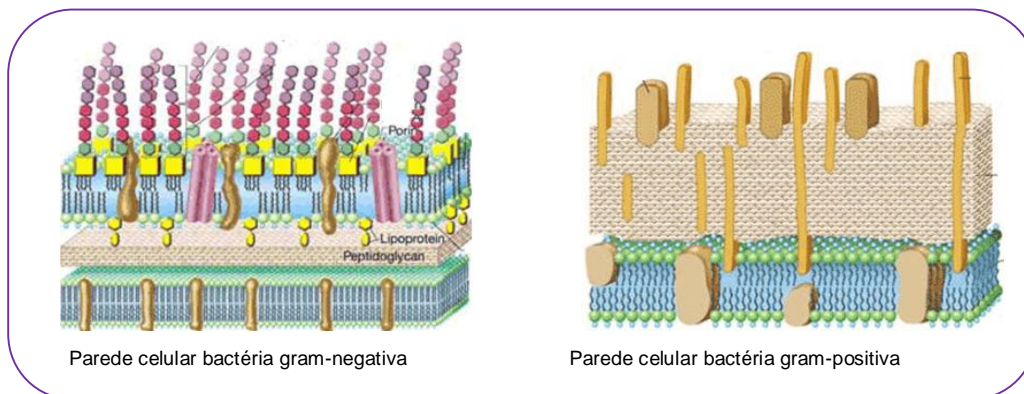


Figura 1 Estrutura da parede celular de bactéria gram-negativa e gram-positiva.

As bactérias desempenham um papel importante na área ambiental, promovendo a decomposição de material orgânico, e um papel econômico, porque podem realizar fermentação, levando a síntese de substâncias de interesse industrial. Milhares de bactérias habitam a microbiota humana de forma inofensiva, exercendo a função de proteção e

auxiliando na síntese de vitaminas, como por exemplo, os lactobacilos. No entanto, algumas mantêm ação nociva de forma temporária ou permanente, sendo responsáveis por uma série de doenças, devido aos efeitos causados pelas toxinas liberadas por estes microorganismos. O tratamento destas enfermidades ocorre com o uso de quimioterápicos, os quais podem agir na inibição da síntese do DNA microbiano ou do RNA comprometendo a síntese de proteínas, de ácidos nucleicos e síntese da parede celular, comprometendo a permeabilidade seletiva (Murray *et al.*, 2006).

O primeiro composto antibacteriano sintético foi o Salvarsan, desenvolvido em 1909 pelo químico Paul Ehrlich. Em 1928 foi descoberta a penicilina, substância produzida pelo fungo *Penicillium*, pelo médico bacteriologista inglês, Alexander Fleming. Apesar da descoberta, o interesse terapêutico pelos trabalhos de Fleming ocorreram apenas com a Segunda Guerra Mundial.

O fenômeno da resistência a farmoquímicos foi observado em 1905 por Erlich, Franke e Roehl em culturas de tripanossomos africanos tratados com arsênico. Após a introdução da penicilina no mercado terapêutico, o uso indiscriminado desta para o tratamento de pneumonias, infecções aéreas superiores, e outras infecções levou ao aparecimento de bactérias resistentes (Silveira *et al.*, 2006; Tavares W., 2000). Nos anos que seguiram o uso extensivo de antibacterianos de forma profilática e terapêutica, a aplicação em intervalos irregulares, as doses inadequadas, as más condições de higiene e a demora no diagnóstico de infecções favorecem o surgimento de cepas resistentes (Tavares, 2000; Guimarães *et al.*, 2010; Vidaver, 2002; Wise e Soulsby, 2002; Bloomfield *et al.*, 2002; McEwen e Fedorka-Cray, 2002; Brooks *et al.*, 2000).

Os compostos antimicrobianos existentes estão ficando menos eficientes e as infecções estão se tornando mais difíceis e mais caras de tratar (Mah e Memish, 2000; Sack *et al.*, 1997), aumentando as taxas de mortalidade em doenças infecciosas como tuberculose, doenças respiratórias agudas e diarreia (Espinal, 2000; Shears, 2001; Bloomfield *et al.*, 2002; Byarugaba, 2004).

É importante destacar que a resistência adquirida é um fenômeno espontâneo da bactéria, sendo os antimicrobianos apenas agentes seletores de amostras resistentes.

Os principais mecanismos de resistência bacteriana (Figura 2) estão descritos a seguir (Silveira *et al.*, 2006; Antonio *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2010).

- Mecanismo de produção pela célula bacteriana de enzimas que possam degradar o antimicrobiano ou inibir os efeitos destes;
- bombeamento por efluxo consiste na expulsão do quimioterápico do meio interior para o exterior da célula, ocorrendo à redução da concentração deste;

- diminuição da permeabilidade celular de bactérias gram negativas ocasionada através de modificação na porina presente na membrana celular externa, impedindo a difusão e, conseqüentemente, a ação do antimicrobiano;
- alteração no sítio de ligação do quimioterápico, diminuindo a afinidade do fármaco pelo sítio ativo da enzima.

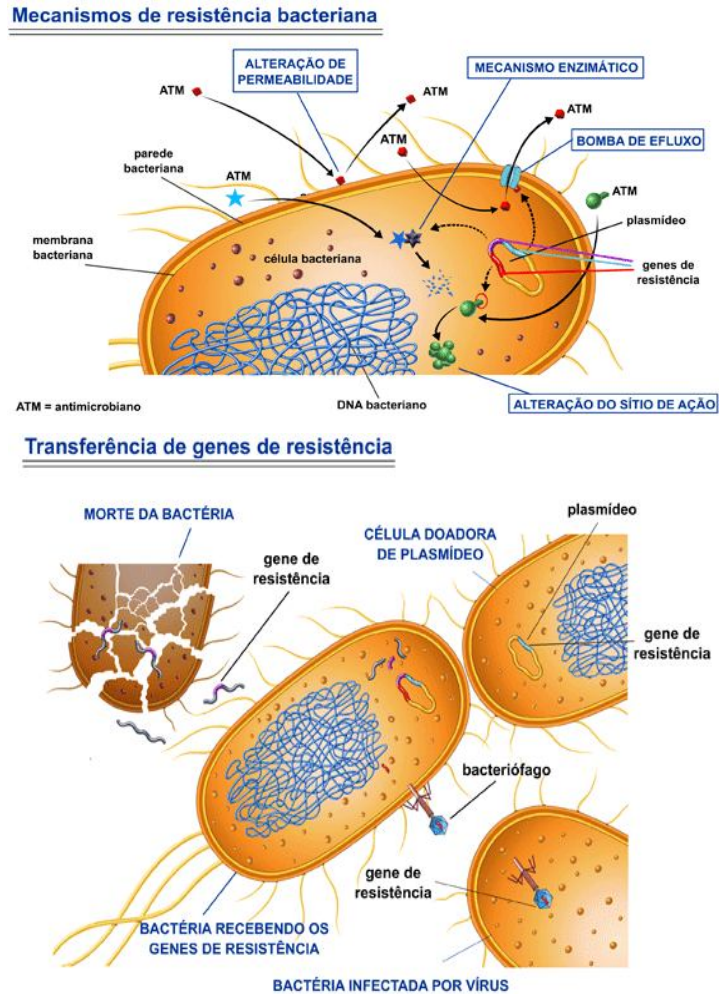


Figura 2 Mecanismos de resistência bacteriana.

(http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/mec_animacao.htm, acessado em 10/06/12).

Os antimicrobianos podem ser classificados como bacteriostáticos, quando agem contra os microrganismos, inibindo o crescimento e a duplicação celular, mas não provocam a destruição celular, podendo o microrganismo voltar a crescer com a suspensão do uso do

quimioterápico. São conhecidos como bactericidas, quando são responsáveis pela morte celular (Trabulsi e Alterthum, 2004).

1.2 Resistência aos antiprotozoários

Os protozoários são seres vivos unicelulares, eucariontes e desprovidos de clorofila. A maioria é de vida livre, inofensivos a saúde do hospedeiro e possuem um papel importante nas cadeias alimentares. No entanto, alguns parasitas são causadores de doenças, como por exemplo, a amebíase, a giardíase e a malária (Trabulsi e Alterthum, 2004).

A terapêutica das protozooses está apoiada primordialmente nos agentes antiprotozoários. Entre esses, o metronidazol **1** (Figura 3), uma substância de amplo espectro de atividade contra bactérias anaeróbicas e protozoários, sendo o principal composto utilizado contra infecção causada por um organismo microscópico unicelular chamado *Trichomonas vaginalis* (protozoário flagelado), que acomete sobretudo as mulheres (Gardner e Hill, 2001; Townson *et al.*, 1994; Khabnadideh *et al.*, 2007). O metronidazol também é o principal fármaco usado no tratamento da giardíase, provocada pelo protozoário *Giardia lamblia*, que infecta o intestino dos mamíferos provocando cólicas abdominais e fraqueza, podendo levar a morte (Krueger *et al.*, 2007). Porém, esta substância apresenta vários efeitos colaterais, tais como: anorexia, urticária, pancreatite, diarreia, tonturas, insônia entre outros sintomas é contra-indicada em gestantes e durante a amamentação (García-Rúbio *et al.*, 2006). Há relatos também de um número significativo de pacientes que não obtiveram sucesso do tratamento, devido ao aparecimento de protozoários que desenvolveram resistência a essa substância (Gardner e Hill, 2001).

1.3 Atividade biológica dos compostos nitrogenados

Das várias classes de substâncias orgânicas, os compostos nitrogenados se destacam por apresentarem importância biológica, farmacológica e industrial. Apresentam também grande importância como intermediários em sínteses. (Duarte *et al.*, 2010).

1.3.1 Atividade biológica das aminas

As aminas são uma classe de compostos responsáveis por várias funções biológicas tais como regulação, neurotransmissão e vasodilatação dentre outros, apresentando também importância industrial como catalisadores, corantes, indicadores de deficiência de minerais para plantas e indicadoras de qualidade ou de condições higiênico-sanitárias na produção

de alimentos. Muitas aminas são utilizadas como quimioterápicos como a dopamina **3** (Figura 3), atuando no sistema nervoso central (Halász *et al.*, 1994; March, 2007).

A eficiência terapêutica desta classe de compostos pode está associada à presença do par de elétrons livres no nitrogênio (Tripathi, 2006, Lin e Lu, 1998). Uma vez que o par de elétrons livres podem se ligar a vários grupos (doadores de ligação hidrogênio, Fe^{3+} do grupo prostético heme) permitindo que a substância interaja com um componente biológico, produzindo uma resposta biológica.

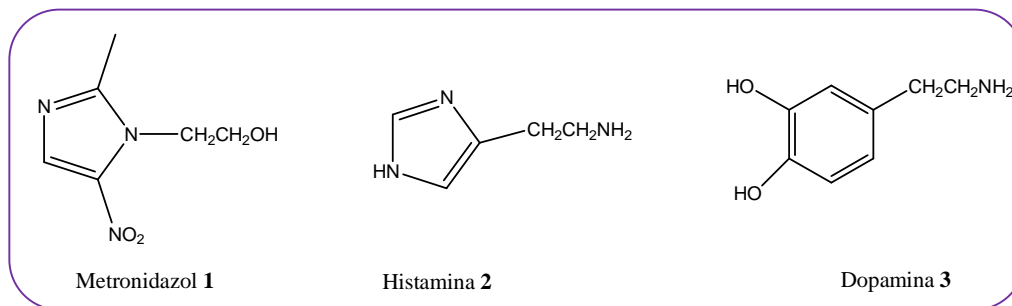


Figura 3 Estrutura química do metronidazol, da histamina e dopamina.

1.3.2 Atividade biológica de aminoalcoóis

A porção aminoálcool é constituinte estrutural de um vasto número de compostos de origem natural ou sintética, sendo encontrada em numerosos compostos bioativos como o FTY720 **4** (Figura 4) que possui efeito promissor como imunossupressor em estudos para transplantes e tratamento de doenças autoimunes, ou o etambutol **5** (Figura 4), fármaco bacteriostático sintético de primeira escolha no combate à tuberculose (Adachi *et al.*, 1995). Aminoalcoóis são utilizados no tratamento de doenças de Alzheimer, doenças cardiovasculares agindo também como: analgésicos, antibacterianos e antifúngicos (Maillard e Trucker, 2002; Albert *et al.*, 2007; Almeida, 2007).

Devido à importância biológica que apresentam, estudos voltados para a síntese de aminoalcoóis com atividade biológica estão sendo desenvolvidos por vários grupos de pesquisa, visando, entre outras, a atividade antituberculose (Del Olmo *et al.* 2009).

Estes compostos podem ser facilmente funcionalizados por reações de alquilação, substituição, oxidação, entre outros métodos, sendo classificados como importantes blocos construtores em síntese orgânica (Mateus, 2004; Oliveira *et al.*, 2008).

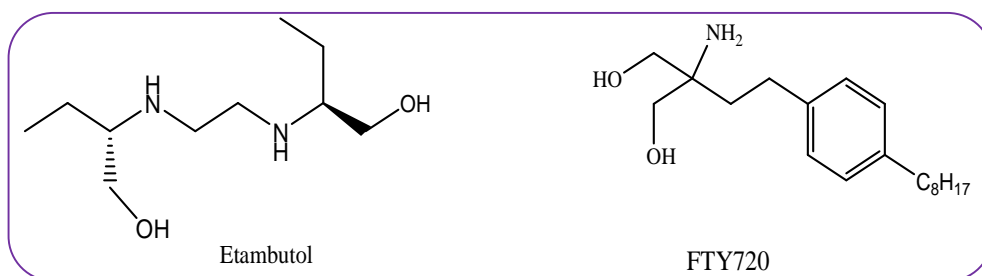
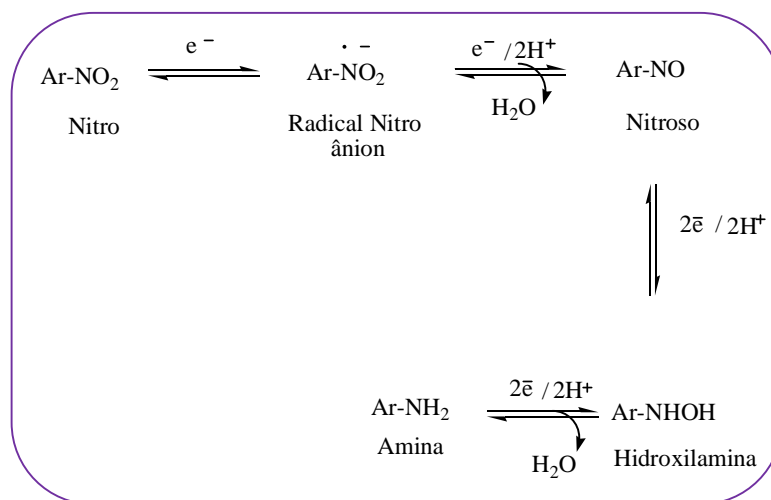


Figura 4 Estrutura química do FTY720 e do etambutol.

1.3.3. Importância do grupo nitro

Compostos contendo o grupo nitro tem tido destaque desde a década de 40, conferindo atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, anticoagulante e sedativa hipnótica, uma vez que tal grupo exerce influência nas propriedades físico-químicas, bioquímicas e farmacológicas (Korolkovas, 1988; Monasterius, 2005; Li *et al.*, 2008; Mital A., 2010).

O mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido uma vez que pode variar de acordo com diferenças estruturais dos compostos, mas acredita-se que está ligado ao processo de redução *in vivo* do grupo nitro (Esquema 1), seguido pela interação dos produtos formados com biomoléculas essenciais de bactérias, fungos e parasitas (Bosquesi *et al.*, 2008; Paula *et al.*, 2009).



Esquema 1 Biorredução de nitrocompostos.

Os nitroimidazóis tem tido destaque no uso clínico. São representantes desta classe metronidazol, tinidazol, ornidazol, e secnidazol. O metronidazol é um composto bactericida

que apresenta amplo espectro ação contra bactérias anaeróbicas e protozoários. Esta molécula se destaca por propiciar terapia de curta duração. Estudos indicam que o grande responsável pela atividade desta substância é o grupo nitro. Este grupo pode levar a formação de radicais tóxicos que podem interagir com DNA, RNA e proteínas intracelulares (Paula *et al.*, 2009; Arantes, 2007).

Relatos na literatura demonstram a toxicidade de várias substâncias que apresentam o grupo nitro (Guido *et al.*, 2001), como a nitrofurazona **6** (Figura 5). Apesar de apresentar amplo espectro de atividade, sendo eficaz inclusive no tratamento da doença de chagas (Chu *et al.*, 2008; Arantes, 2007), possui alta toxicidade, o que impede a sua utilização por via oral. Em apenas alguns países é usada em tratamentos por via tópica, em tratamentos principalmente de doenças de pele (Melo *et al.*, 2007). Acredita-se que este efeito possa estar relacionado ao possível mecanismo de redução em cadeia que pode levar à formação de espécies eletrofílicas que podem reagir com o DNA (Bosquesi *et al.*, 2008).

1.3.4 Compostos heterociclos nitrogenados

Stefani e colaboradores (2008) descreveram os compostos heterociclos como sendo o maior e mais variado ramo da família dos compostos orgânicos e destaca a importância biológica dos heterociclos nitrogenados devido ao amplo espectro de atividade. Nessa classe de compostos destacam-se os alcalóides, como por exemplo a quinina um antimalárico **7**, e os derivados imidazólicos, como o metronidazol (Figura 5).

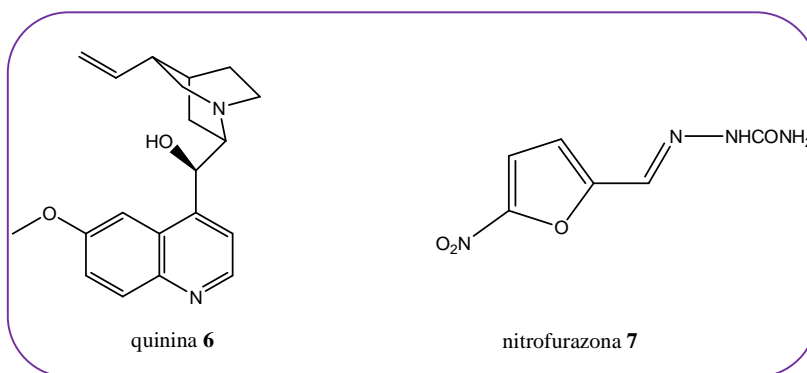


Figura 5 Estrutura química da quinina e da nitrofurazona.

Outros compostos de interesse são os derivados de piridina. Tripathi e colaboradores (2006) sintetizaram vários derivados piridínicos ativos contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, evidenciando o potencial terapêutico que tais compostos apresentam.

Derivados piridínicos também se destacam pelo potencial inseticida, como a anabasina **8** (Viegas, 2003) ou o PAM-86 **9** antimalárico (Viana, 2008) (Figura 6).

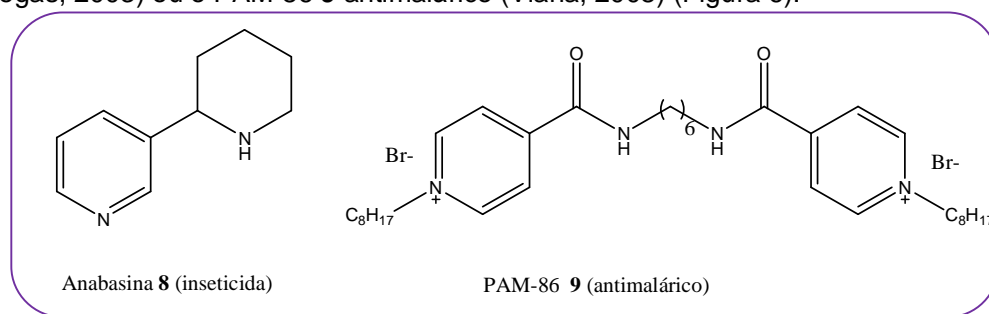
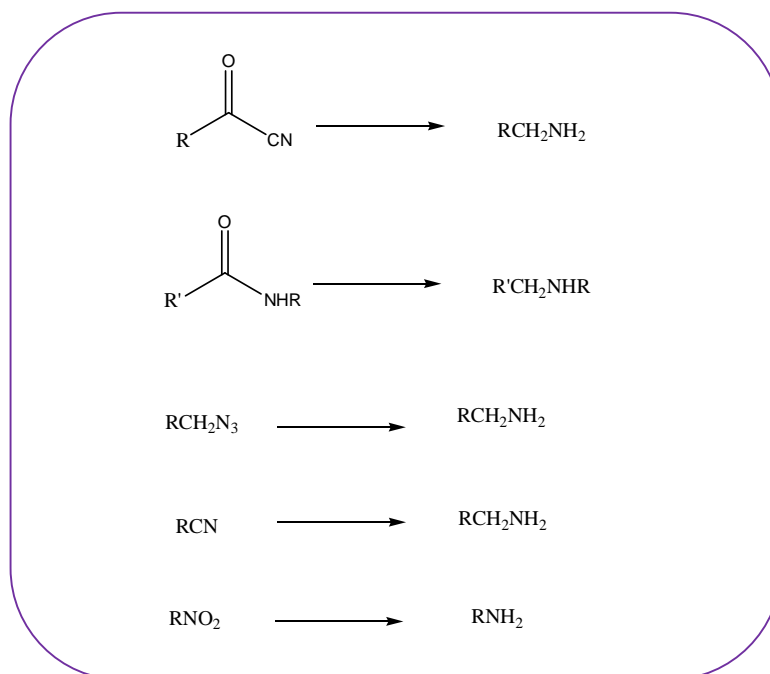


Figura 6 Estrutura química da anabasina e PAM-86.

1.4 PRINCIPAIS MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE AMINAS (March, 2007):

- Obtenção de aminas por redução (Esquema 2)



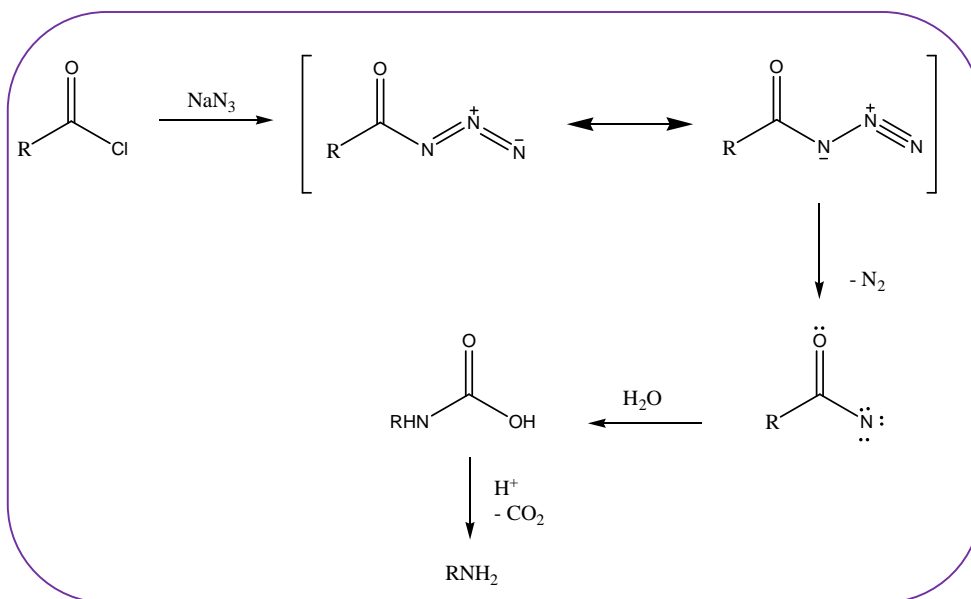
Esquema 2 Obtenção de amina por redução.

- reação de substituição: as aminas são nucleofílicas, reagindo com haletos de alquila em reações $\text{S}_{\text{N}}2$ (Esquema 3)



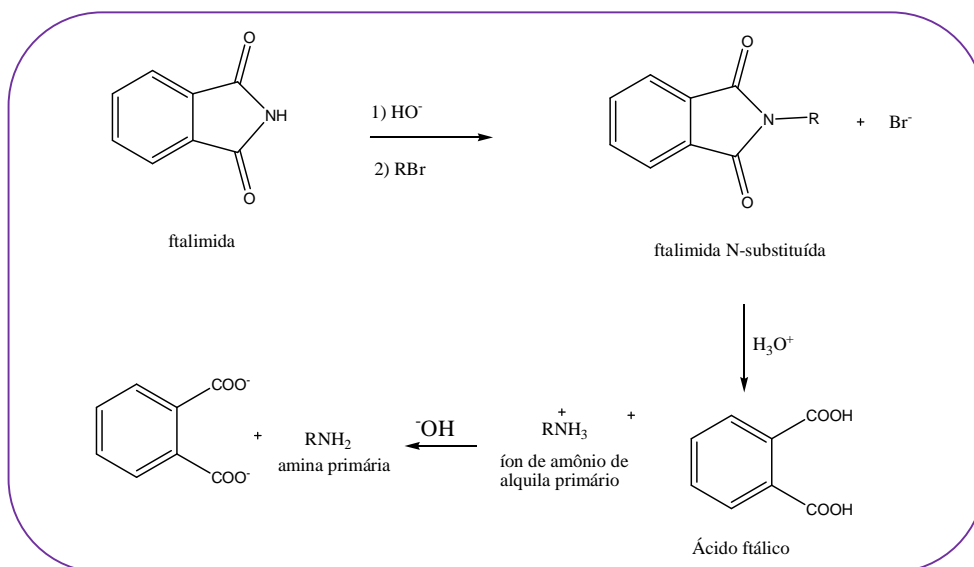
Esquema 3 Obtenção de amina.

- rearranjo de Curtius: decomposição térmica de azidas de acila em isocianatos. Estes são hidrolisados formando aminas (esquema 4)



Esquema 4 Obtenção de amina por rearranjo de Curtius.

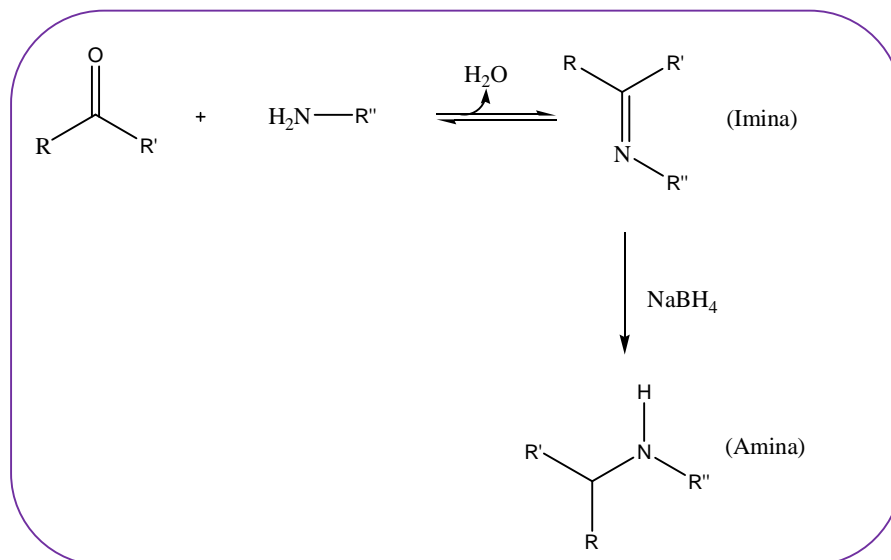
- síntese de Gabriel: conversão de haleto de alquila a aminas primárias. Na síntese de Gabriel a ftalimida é primeiramente alquilada e o composto resultante hidrolisado, formando uma amina primária (Esquema 5).



Esquema 5 Obtenção de amina por síntese de Gabriel.

- adição nucleofílica em substâncias carboniladas (aminação redutiva): condensação de aldeído ou de cetona com amina formando uma imina que é reduzida a amina (Esquema 6).

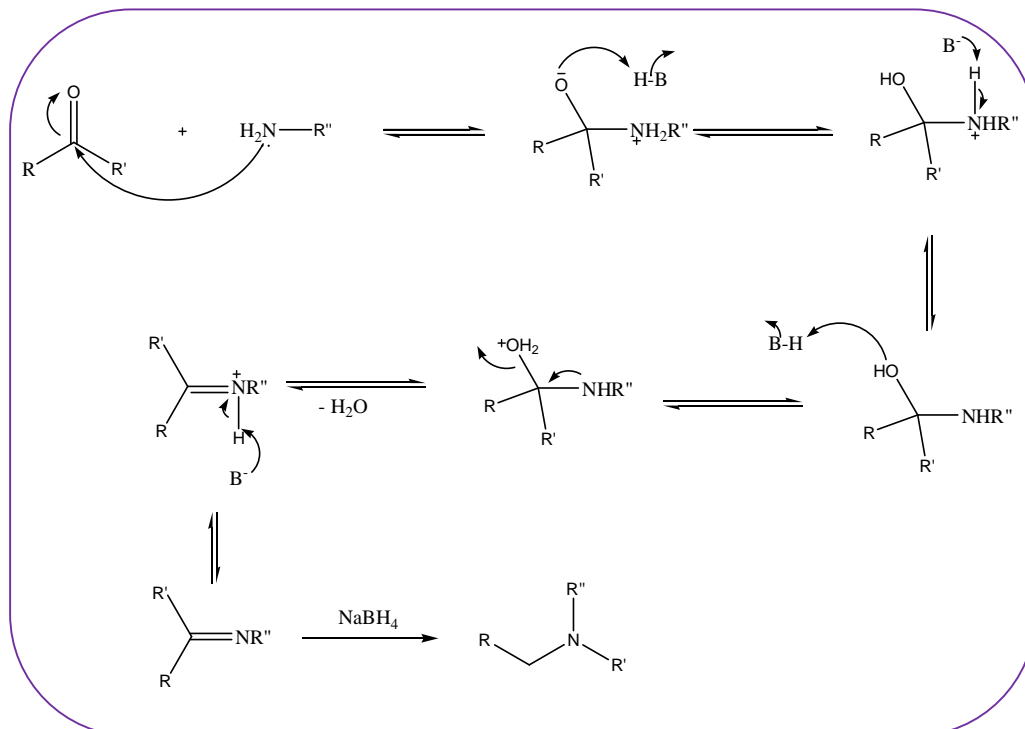
Este método será trabalhado com mais detalhes, por ser uma metodologia utilizada no trabalho.



Esquema 6 Obtenção de amina por aaminação redutiva.

1.5. REAÇÕES DE AMINAÇÃO REDUTIVA

A reação de aminas primárias e secundárias com grupos carbonílicos de aldeídos e cetonas leva, após desidratação, a síntese de iminas ou enaminas que são reduzidas na presença de agentes redutores (Esquema 7). Este tipo de reação é conhecido como aaminação redutiva, um método amplamente empregado em escala industrial por ser uma reação simples de custo reduzido e apresentar bons rendimentos (March, 2007; Abdel-Magid, 1996; Grenga *et al.*, 2009). O mecanismo envolve ataque nucleofílico da amina na função carbonílica, formando uma carbilonamina. Em seguida, a eliminação de água, leva a imina. Aminas derivadas de aldeídos formam quase que exclusivamente o isômero E, termodinamicamente mais estável (Gonçalves, 2008). Se R'' for diferente de hidrogênio, tem-se uma base de Schiff (March, 2007; Costa *et al.*, 2003).



Esquema 7 Mecanismo de aminação redutiva.

Dentre os métodos clássicos de aminação redutiva são conhecidos os processos direto e indireto. No primeiro, a amina e o agente redutor são adicionados ao mesmo tempo no meio reacional. A grande vantagem de se realizar a aminação redutiva direta, sem isolar a imina, é evitar a decomposição da imina gerando subprodutos, porém pode ocorrer no processo a redução do grupo carbonila, levando a síntese do álcool. Já no método indireto o agente redutor é adicionado ao meio reacional após a formação da imina, a qual é *in situ*.

O equilíbrio pode ser deslocado na direção da imina através da retirada de água, utilizando agentes secantes (sulfato de sódio anidro) ou por destilação azeotrópica com Dean-Stark (Jarrahpour *et al.*, 2004; Esteves-Souza *et al.* 2004). O aquecimento pode ser convencional ou por micro-ondas, permitindo uma redução do volume de solvente usado (Pedrosa *et al.*, 2009). Guzen e colaboradores (2007) realizaram a reação usando a irradiação de ultrassom.

O controle do pH na formação do cátion imínio intermediário é facilitada em pH de 6 a 8. Neste intervalo ocorre a redução preferencial da imina frente a redução do composto carbonílico. Sabe-se também que em pH abaixo de 4 pode ocorrer diminuição da nucleofilicidade da amina devido a protonação, enquanto, em pH acima de 8 ocorre um aumento da dificuldade de eliminação da água no meio reacional. A formação do intermediário tetraédrico é considerada a etapa lenta da reação. Para aumentar a velocidade

desta, costuma-se empregar a catálise ácida. Desta forma, ocorre a protonação do oxigênio carbonílico, tornando-o mais suscetível ao ataque nucleofílico (Figura 7, Bruice, 2006). No caso de aminas aromáticas ou aldeídos aromáticos a catálise ácida pode ser dispensada, uma vez que a conjugação do anel aromático estabiliza a imina formada (Gonçalves, 2008).

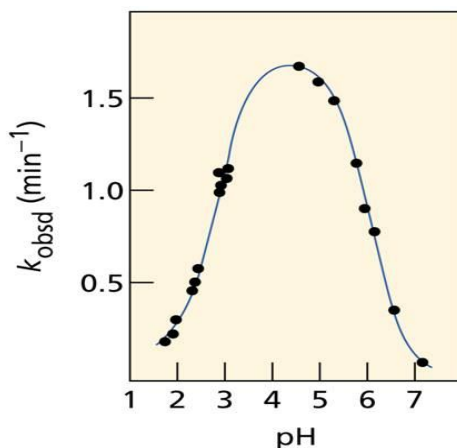


Figura 7 Dependência da velocidade da reação de acetona com hidroxilamina em função do pH. (Bruice, 2006).

O borohidreto de sódio é o agente redutor mais utilizado para a redução de iminas por ser de baixo custo, de fácil manuseio e por reagir em condições brandas de maneira limpa e seletiva (Esteves-Souza, 2004). Outros agentes redutores podem ser usados em reações de aminação redutiva:

- NaBH_3CN : método eficiente, podendo ser usado em temperatura ambiente porém, tem como inconveniente a liberação de produtos tóxicos (HCN e NaCN) (Grenga *et al.*, 2009).
- H_2 (hidrogenação catalítica), porém apresenta o inconveniente de reduzir outros grupos funcionais presentes na estrutura (March, 2007);
- Biocatalisador: fermento de pão (Chimni e Singh, 1998)

Nesse trabalho serão descritas as sínteses de aminas/aminoalcoóis por aminação redutiva indireto, porém sem isolamento da imina, usando o borohidreto de sódio como agente redutor.

2. OBJETIVOS E PLANO DE SÍNTESE

O surgimento de enfermidades para as quais o atual arsenal terapêutico é insuficiente, assim como relatos de severos efeitos colaterais e contra indicações relacionadas a determinadas substâncias fizeram a descoberta de novas moléculas biologicamente ativas de extrema importância. Para isto, é necessário que seja feito um planejamento estrutural para a síntese de novos compostos, visando o aumento das propriedades terapêuticas e a diminuição dos possíveis efeitos colaterais.

Planeja-se a síntese e caracterização de aminas e aminoalcoóis derivados de aldeídos aromáticos e heteroaromáticos (benzaldeído substituído e aldeídos heteroaromáticos) (Esquema 9), assim como a síntese e caracterização de novos aminoalcoóis e novas aminas derivadas do metronidazol (Esquema 10).

Será realizada a avaliação da atividade antibacteriana dos compostos obtidos contra diversos micro-organismos gram-positivo (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e Gram-negativo (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), bactérias de grande interesse farmacológico. Os testes microbiológicos, realizados através da análise do halo de inibição (método de difusão em Agar), da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bacteriostática mínima (CBM) dos compostos, serão realizados no departamento de microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF em colaboração com o Professor Dr. Cláudio Galuppo Diniz e a professora Dra. Vânia L. da Silva.

Os testes para avaliação das atividades antiparasitária serão realizados no Laboratório de Amebíase do Departamento de Parasitologia-ICB-UFMG, sob a coordenação da professora Maria Aparecida Gomes.

Busca-se por substâncias que apresentem toxicidade seletiva, ou seja, em baixas concentrações sejam prejudiciais apenas para o micro-organismo. A fim de verificar este efeito as substâncias sintetizadas no presente trabalho serão avaliadas a partir de um estudo teórico para identificar possíveis efeitos de irritabilidade, mutagenicidade, tumorigenicidade e efeitos reprodutivos. Para isso estudos *in silico* dos parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade) assim como o potencial dos compostos como fármacos serão realizados utilizando os softwares Osiris® Property Explore (Actelion Pharmaceuticals, Ltd.) e Molinspiration. O objetivo inicial deste estudo é a obtenção de informações quanto a possíveis efeitos tóxicos dos compostos sintetizados, economizando tempo e investimento (Afonso, 2008).

O estudo da relação estrutura-atividade será feita a partir dos dados obtidos nos testes microbiológicos, nos quais serão avaliadas a influência de várias modificações estruturais (aminoálcool, amina ou heterociclo) e da posição dos grupos doadores ou retiradores de elétron.

Complementando estudos em andamento no grupo de pesquisa (Almeida, 2010), nos quais a atividade antibacteriana de aminoalcoóis e aminas derivadas do furfural e do tiofeno estava sendo avaliada (Figura 8), planejamos a síntese de derivados de benzaldeído e de piridina-carbaldeído, funcionalizando os anéis aromáticos com grupos amina e aminoálcool (Figura 9). No caso dos derivados benzaldeídos, pretendeu-se estudar a influência da presença de substituintes retiradores ou doadores de elétrons.

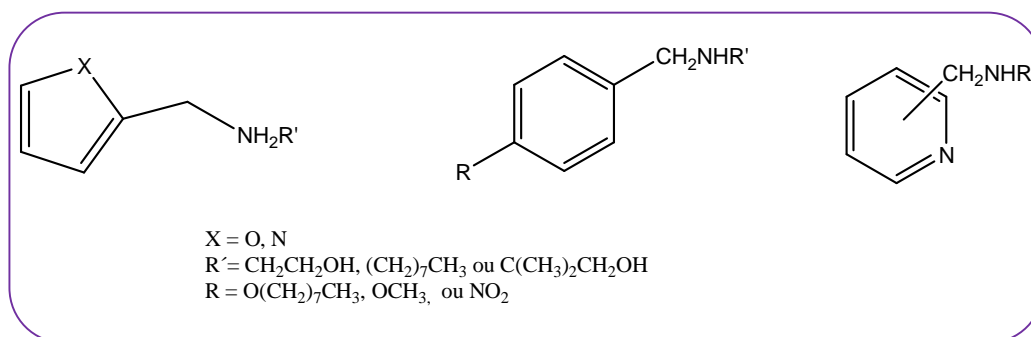
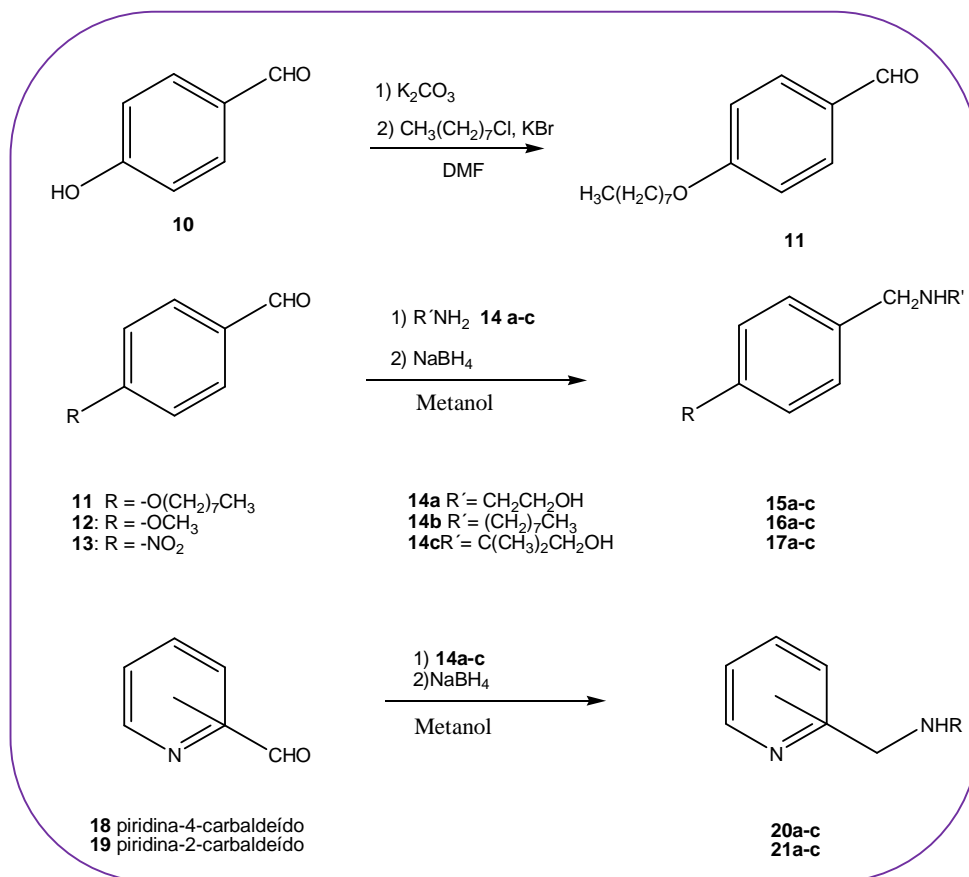


Figura 8 Estruturas químicas de potenciais antimicrobianos.

A síntese do *p*-octiloxibenzaldeído **10** será realizada através do método de Williamson: o substrato *p*-hidroxibenzaldeído será alquilado empregando-se carbonato de potássio, cloreto de octila e brometo de potássio em *N, N*- dimetilformamida como solvente (Murillas *et al.*, 2004). Posteriormente o aldeído alquilado **11** será submetido à reação de aminação redutiva com os aminoalcoóis **14 a-b** e com a amina **14c** levando a obtenção de três derivados **15 a-c**.

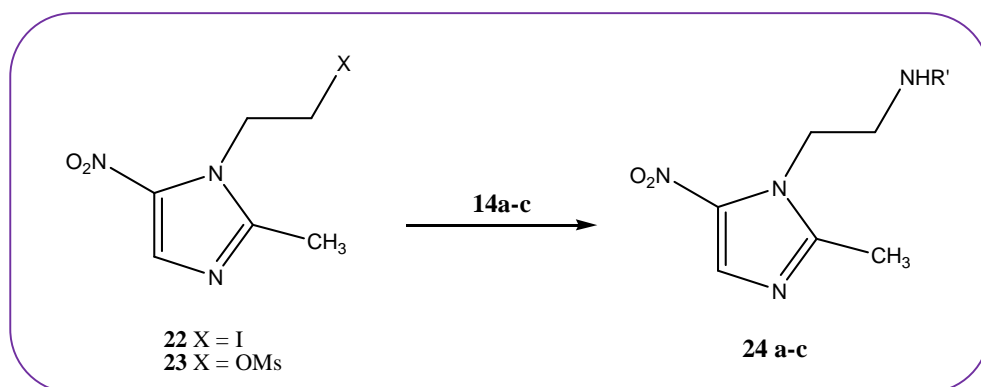
Será realizado também a condensação do nitrobenzaldeído **12** e do *p*-metoxibenzaldeído **13** com os aminoalcoóis **14 a-b**, com a amina **14c** seguida da redução das iminas formadas *in situ* com borohidreto de sódio fornecendo os compostos **16 a-c** e **17 a-c** (Esquema 9).

A mesma metodologia será empregada na síntese de análogos heterociclos a partir de piridina-4-carbaldeído **18** e piridina-2-carbaldeído **19**. Nessa etapa será avaliado o papel do heterociclo e a influência da posição da porção aminoálcool ou amina na atividade biológica.



Esquema 9 Síntese dos derivados benzaldeídos e piridínicos por aminação redutiva.

A segunda parte do trabalho consiste na obtenção de derivados do metronidazol. Os compostos almejados serão preparados a partir do mesilmetronidazol **23** (MTZMs) ou iodometronidazol **22** (MTZI) fornecidos pelo Professor Dr. Ricardo José Alves da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os grupos abandonadores mesilato e iodo serão substituídos por amina ou aminoálcool na cadeia ligada ao heterociclo (Esquema 10). Pretende-se obter assim compostos que possuam atividade antibacteriana e anti-protozoária.



Esquema 10 Síntese dos aminoalcoóis derivados do metronidazol

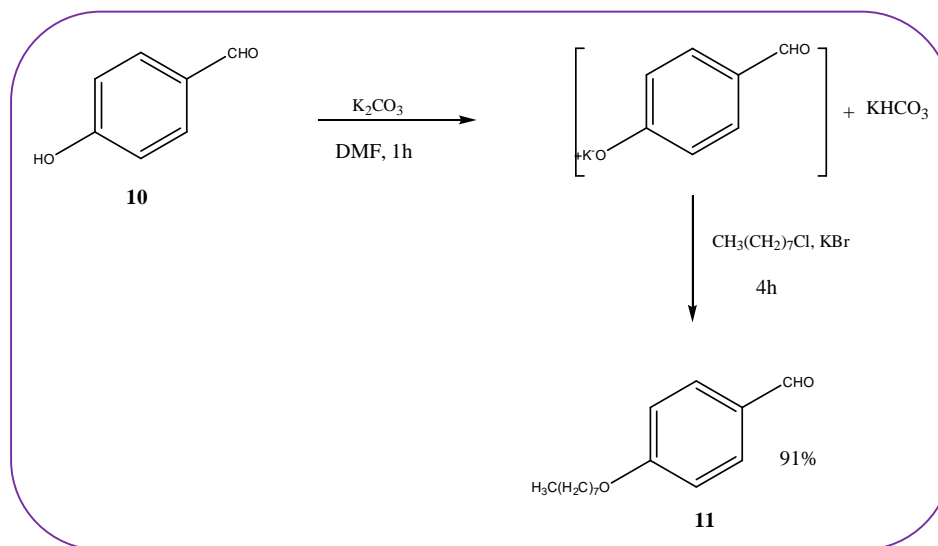
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos representados nesse capítulo, assim como na parte experimental foram numerados de forma facilitar a compreensão, podendo não corresponder aos números utilizados na nomenclatura de acordo com a regra da IUPAC.

3.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS POR AMINAÇÃO REDUTIVA

3.1.1 Síntese e caracterização do *p*-octiloxibenzaldeído (Murillas *et al.*, 2004)

Por ser um método simples e em geral, apresentar bons resultados, a síntese de Williamson, descoberta em 1850, é um dos métodos mais empregados quando se deseja substituir o hidrogênio de um grupo hidroxila de alcoóis ou fenóis, formando éteres. O aldeído **10** foi tratado com carbonato de potássio em DMF, gerando *in situ* um íon arilóxi muito reativo (Esquema 11). Este foi tratado com cloreto de octila em presença de brometo de potássio, levando ao *p*-octiloxibenzaldeído com rendimento de 91% após extração em éter e água, sem necessidade de purificação sob a forma de óleo. O KBr foi empregado com intuito de acelerar a reação, uma vez que o cloro é substituído pelo bromo, melhor grupo abandonador. Desta forma, a segunda etapa da reação ocorre de forma mais rápida.



Esquema 11 Síntese do *p*-octiloxibenzaldeído **11**.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 9) do composto **11** verifica-se: um sinal em δ 0,89 correspondente aos hidrogênios metílicos; entre δ 1,29 e 1,83 observam-se sinais referente a presença dos hidrogênios metilênicos da cadeia alifática; em δ 4,03 um tripleto de constante de acoplamento 6,0 Hz referente aos hidrogênios metilênicos H_8 , em δ 6,98 e δ 7,82 correspondentes aos hidrogênios aromáticos, além de um simpleto em δ 9,89 referente ao hidrogênio do grupo aldeído.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 10) do composto **11**, observam-se sinais em δ 14,2 referente ao carbono do grupo metila; sinais entre δ 22,8 – 31,9 referentes aos carbonos metilênicos (C_{2-7}), sinal em δ 68,6 referente ao carbono metilênico, C_8 , sinais em δ 114,9 e δ 132,2 correspondentes aos carbonos aromáticos hidrogenados, em δ 129,9 e δ 164,5 referentes aos carbonos não hidrogenados, além de um sinal em δ 190,9 referente ao carbono do grupo aldeído.

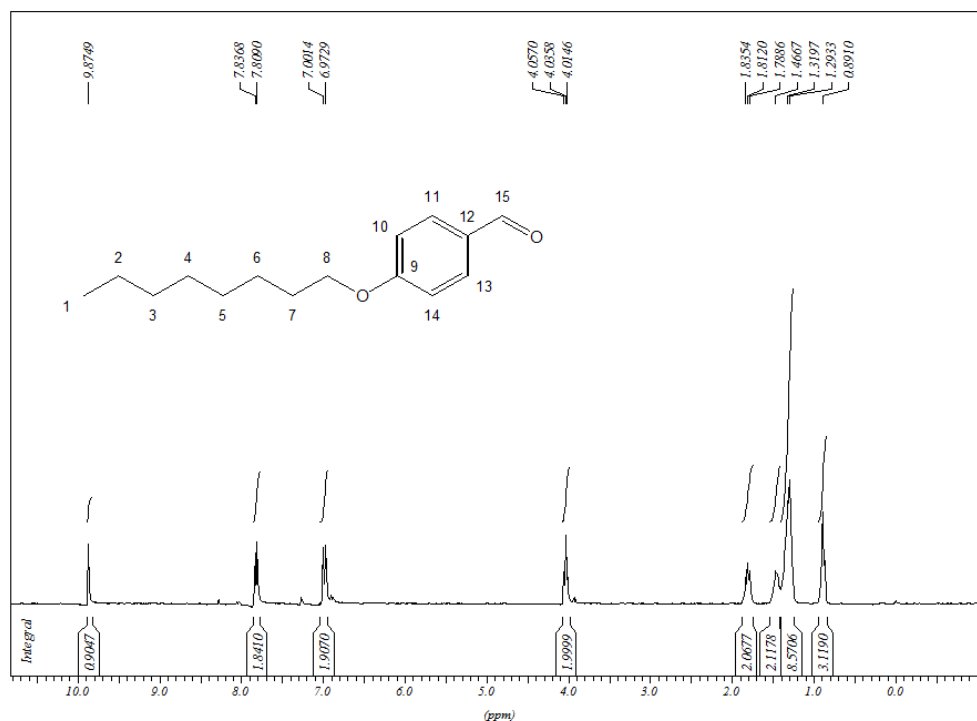


Figura 9 Espectro de RMN de ^1H de **11** (300 MHz, CDCl_3 , δ CDCl_3 7,26).

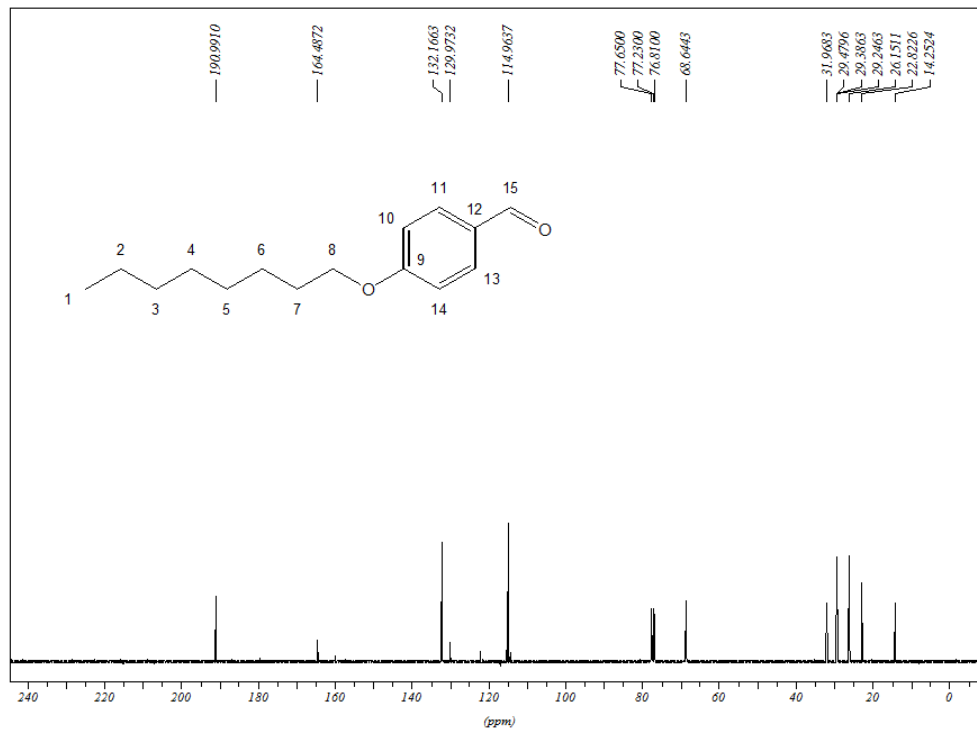
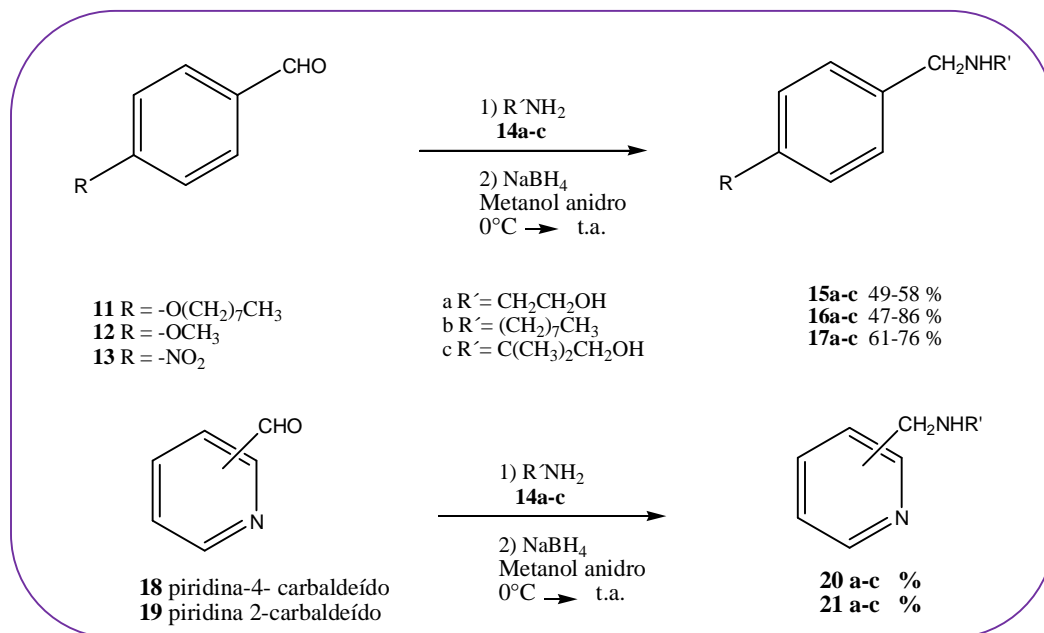


Figura 10 Espectro de RMN de ^1H de **11** (75 MHz, CDCl_3 , δCDCl_3 77,00).

Os compostos **15 a-c**, **16 a-c**, **17 a-c**, **20 a-c** e **21 a-c** foram obtidos por aminação redutiva a partir da condensação de aldeídos aromáticos com a octilamina e aminoalcoóis (2-aminoetanol e 2-amino-2-metilpropanol) (Esquema 12).



Esquema 12 Síntese dos compostos **15 a-c**, **16 a-c**, **17 a-c**, **18a-c** e **19a-c**.

Após purificação por coluna cromatográfica e/ou pelo processo de recristalização os compostos foram obtidos com rendimentos moderados (49-89% de rendimento) e foram devidamente caracterizados por ponto de fusão e pela análise dos espectros no infravermelho e RMN de ^1H e de ^{13}C . Devido a similaridade das estruturas, a caracterização dos derivados será detalhada a seguir apenas para os compostos **5a**, **6c**, **7b**, **8c**, **9c** e **10b**.

3.1.2 Síntese e caracterização do 2-[4-(octiloxi)benzilamino]etanol **15a** (Almeida *et al.*, 2011)

Utilizando a metodologia de aminação redutiva a substância **15a**, foi obtida com rendimento de 49 %, sob a forma de sólido.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 11) do composto **15a** observa-se: em δ 0,86 um sinal referente aos hidrogênios metílicos; entre δ 1,29 e 1,44 multipletos referentes aos hidrogênios da cadeia alifática; entre δ 1,74 e 1,79 um multiplete relativo aos hidrogênios H_7 ; em δ 2,77 e 3,65 observam-se dois tripletos, referentes aos hidrogênios metilênicos H_{17} e H_{18} da porção aminoálcool com constante de acoplamento $J = 5,0$ Hz; em δ 3,73 um simpleto correspondente aos hidrogênios H_{15} ; em δ 3,93 um triplete referente aos hidrogênios metilênicos H_8 de $J = 6,6$ Hz, enquanto em δ 6,8 e 7,2 observam-se sinais referente aos hidrogênios do anel aromático, $J = 8,2$ Hz.

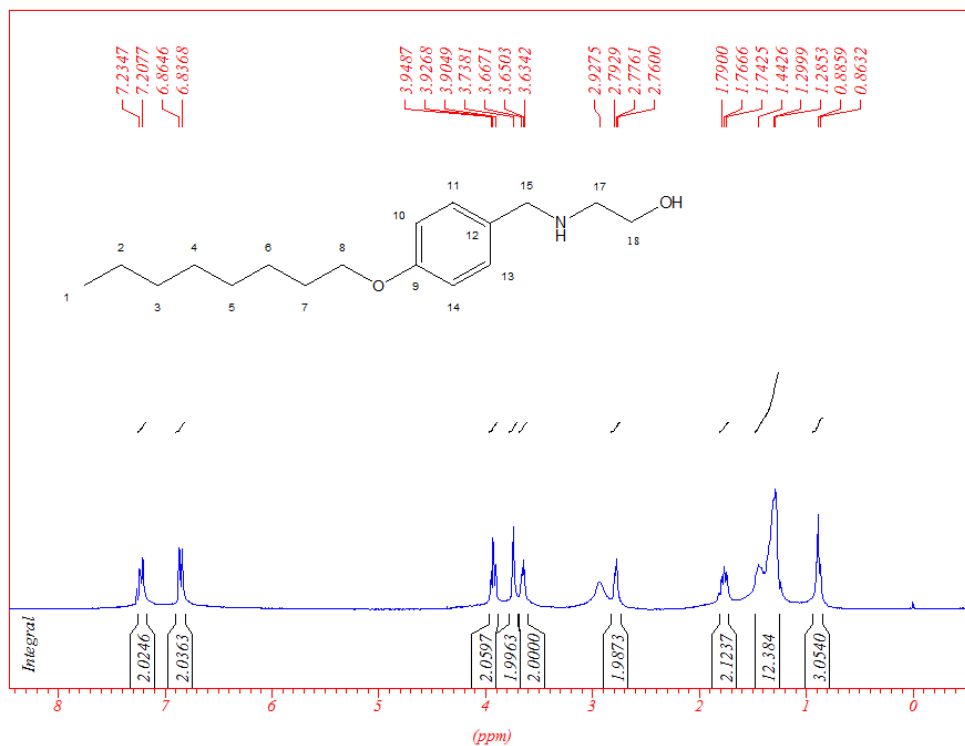


Figura 11 Espectro de RMN de ^1H de 15a (300 MHz, CDCl_3 , δ CDCl_3 7,26).

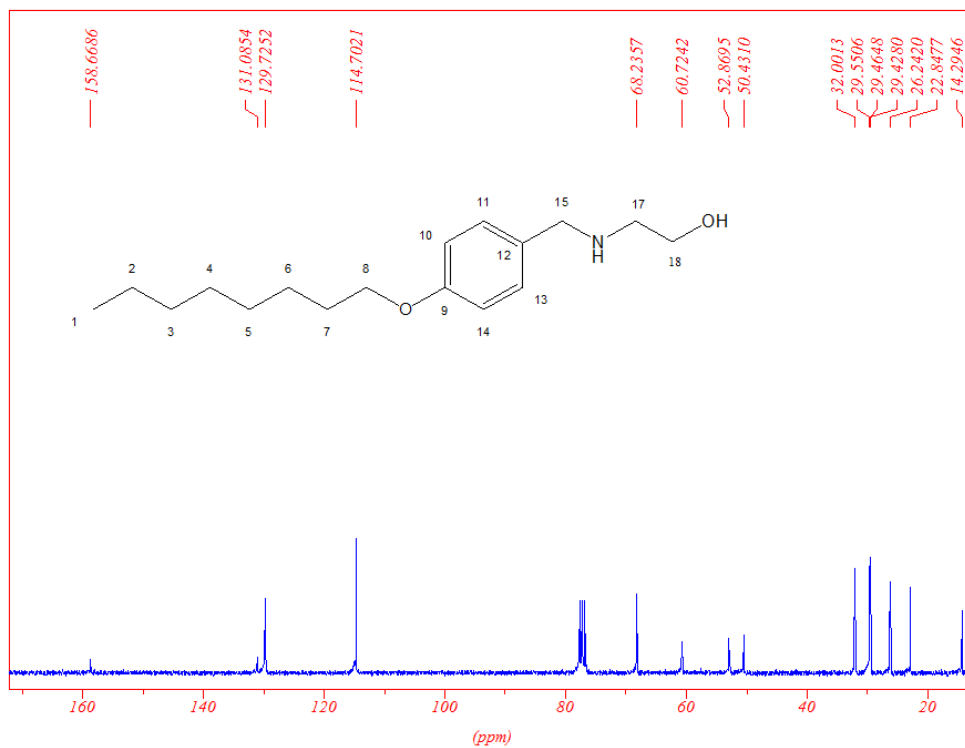


Figura 12 Espectro de RMN de ^{13}C de 15a (75 MHz, CDCl_3 , δ CDCl_3 77,00).

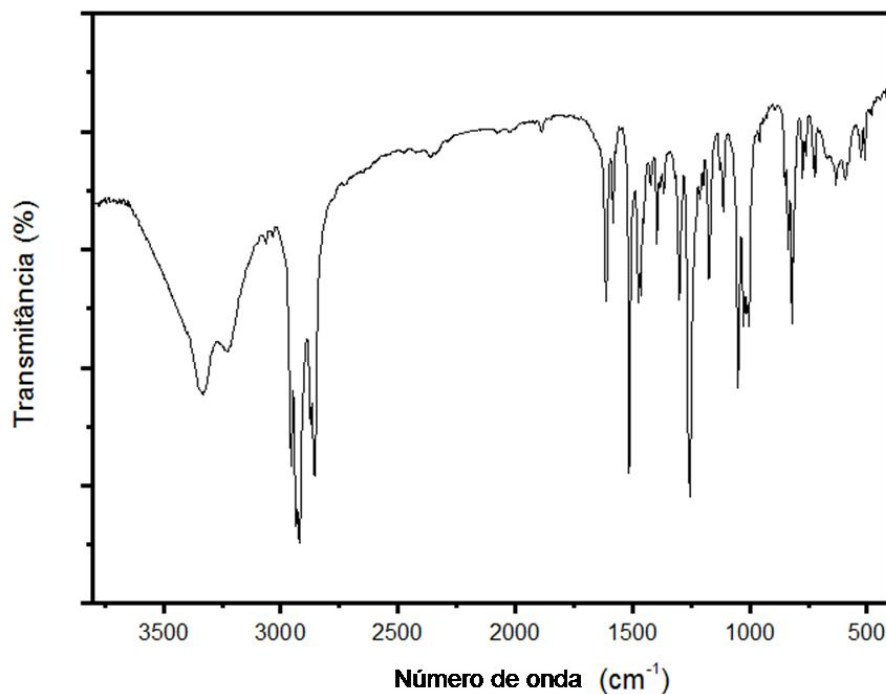


Figura 13 Espectro no IV de **15a** (KBr).

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **15a** (Figura 12) observam-se sinais entre δ 14,3–32,0 correspondentes aos carbonos da cadeia alifática. Em δ 50,4 e 60,7 é possível verificar sinais correspondentes aos dois carbonos da porção aminoálcool, enquanto em δ 52,9 observa-se o sinal do carbono metilênico ligado ao anel aromático e ao nitrogênio. Em δ 68,2 verifica-se a presença do carbono alifático ligado ao oxigênio do grupo éter, já em δ 114,7, 129,7, 131,1 e 158,7 verifica-se a presença dos sinais dos carbonos do anel aromático.

No espectro na região do infravermelho em KBr (Figura 13) observaram-se bandas de absorção em 3336 cm^{-1} referente a deformação axial O-H, em 3229 cm^{-1} o referente a deformação axial N-H de aminas; em 2924 e 2861 cm^{-1} observam-se as deformações axiais C-H de aromático e alifático, respectivamente e em 1263 cm^{-1} referente a deformação axial C-N de aminas e em 1183 cm^{-1} correspondente ao estiramento C-O.

3.1.3 Síntese e caracterização do *N*-(4-metoxibenzilamino)-2-metilpropanol **16c** (Beaulieu *et al.*, 2009)

Sintetizou-se o composto **16c** por condensação do aminoálcool **14c** com o aldeído **13**, conforme descrito anteriormente (Esquema 12). O produto foi obtido com rendimento de 86 %, sob a forma de sólido.

A formação do derivado **16c** pode ser confirmada pela análise do espectro de RMN de ^1H mostrado na (Figura 14). Observou-se em δ 1,14 a presença de um simpleto, correspondente aos seis hidrogênios dos dois grupos metílicos; um simpleto em δ 3,33 referente aos hidrogênios ligados ao carbono hidroxilado; sinal em δ 3,61 referente aos hidrogênios do grupo metoxila; um sinal em δ 3,79 referente aos hidrogênios do metilênico ligado ao anel aromático. Pode-se observar também em δ 6,86 e 7,25 dupletos característicos dos hidrogênios do anel aromático com $J = 8,3$ Hz.

No espectro de RMN de ^{13}C de **16c** (Figura 15) observam-se sinais em δ 24,6 referente ao carbonos metílico; um sinal em δ 46,4 correspondente ao carbono metilênico ligado ao anel benzênico, em δ 54,7 verifica-se a presença do carbono C_9 , em δ 55,8 ppm um sinal indicando a presença do carbono metoxila, δ 68,4 sinal referente ao carbono ligado a hidroxila, em 114,5, 129,9, 130,0 e 159,3 sinais referentes aos carbonos do anel aromático.

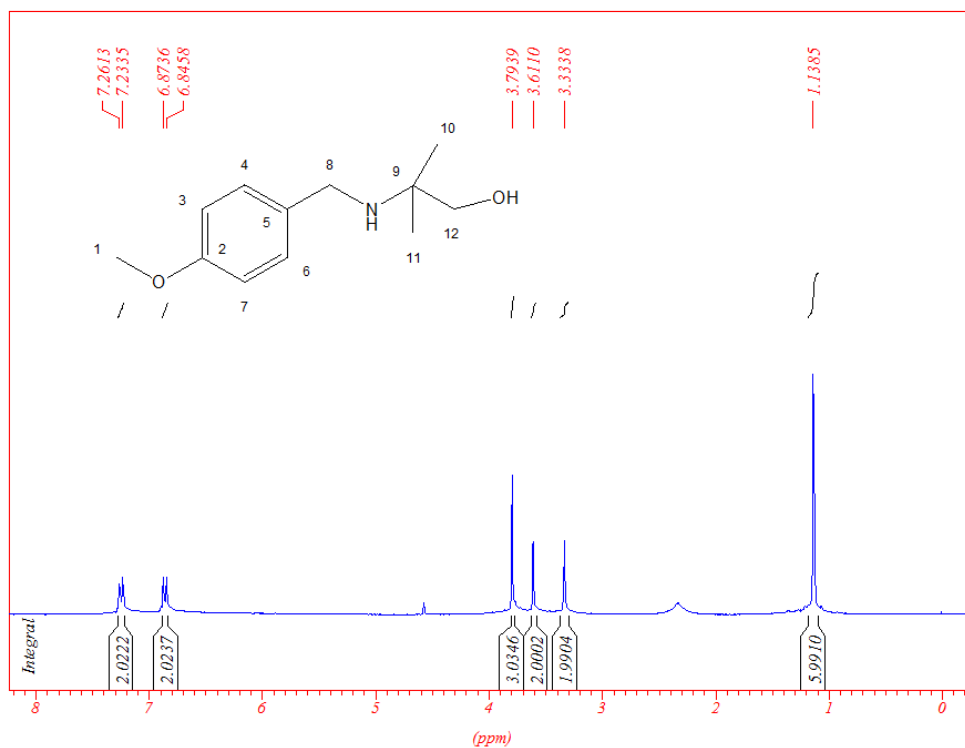


Figura 14 Espectro de RMN ^1H de **16c** (300 MHz, CDCl_3 , δ CDCl_3 7,26).

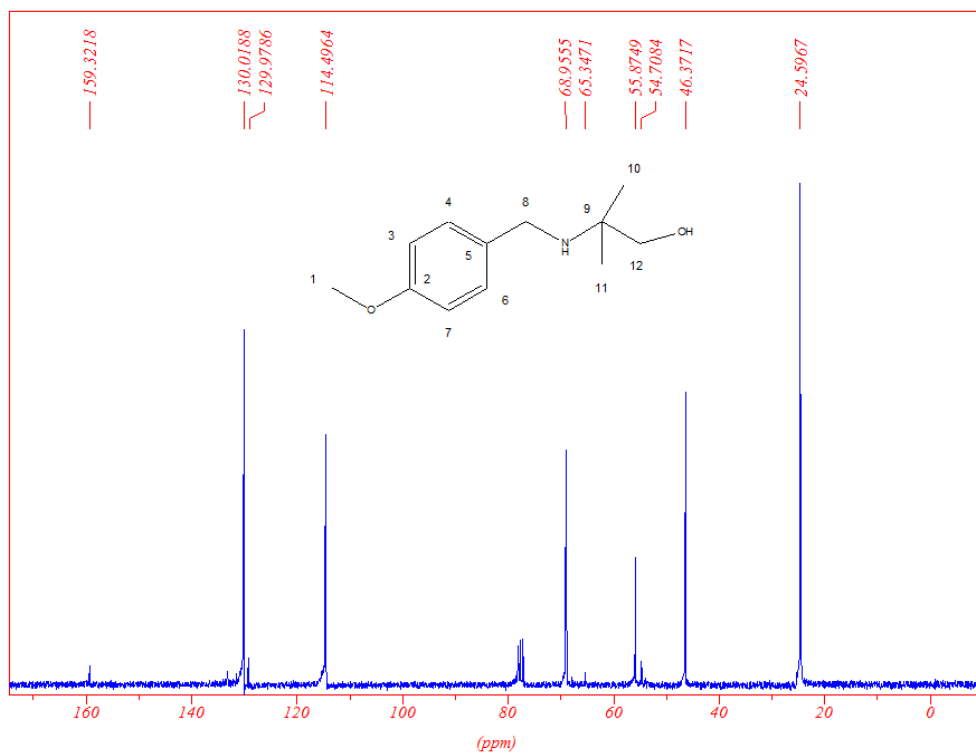


Figura 15 Espectro de RMN de ^{13}C de **16c** (75 MHz, CDCl_3 , δ CDCl_3 77,00).

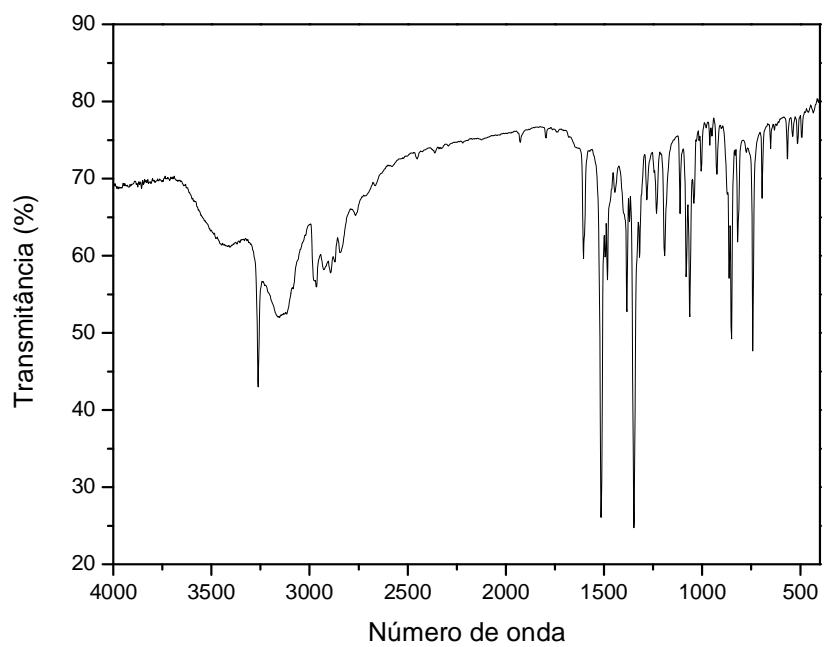


Figura 16 Espectro no IV de **16c** (KBr).

No espectro na região do infravermelho em KBr (Figura 16) observam-se bandas de absorção em 3381 cm^{-1} e 3270 cm^{-1} referente as deformações axiais de O-H e N-H de aminas, respectivamente; em 2971 e 2857 cm^{-1} observam-se os estiramentos C-H de aromático e alifático, uma banda em 1520 cm^{-1} indicando deformação angular de NH, em 1247 cm^{-1} observa-se uma banda de absorção referente à deformação axial de C-N.

3.1.4 Síntese e caracterização do *N*-(4-nitrobenzil)octilamina **17b**

O composto **17b**, obtido por condensação do 4-nitrobenzaldeído **13** com a octilamina **14b** seguido por redução com NaBH_4 foi isolado com rendimento de 76%, sob a forma de sólido amorfo.

A comprovação da síntese do composto **17b** foi obtida analisando o espectro de RMN de ^1H (Figura 17), sendo observado em δ 0,87 um tripleto de constante de acoplamento 6,81 Hz referente aos hidrogênios metílicos; entre δ 1,27 e 1,61 um multipletto referente aos hidrogênios metilênicos da cadeia alifática; em δ 2,62 um tripleto referente aos hidrogênios metilênicos H_8 ($J = 7,0\text{ Hz}$); em δ 3,89 observa-se um simpleto referente aos hidrogênios metilênicos H_7 , enquanto entre δ 7,51 e 8,17 observam-se os sinais dos hidrogênios do anel aromático de $J = 8,7\text{ Hz}$.

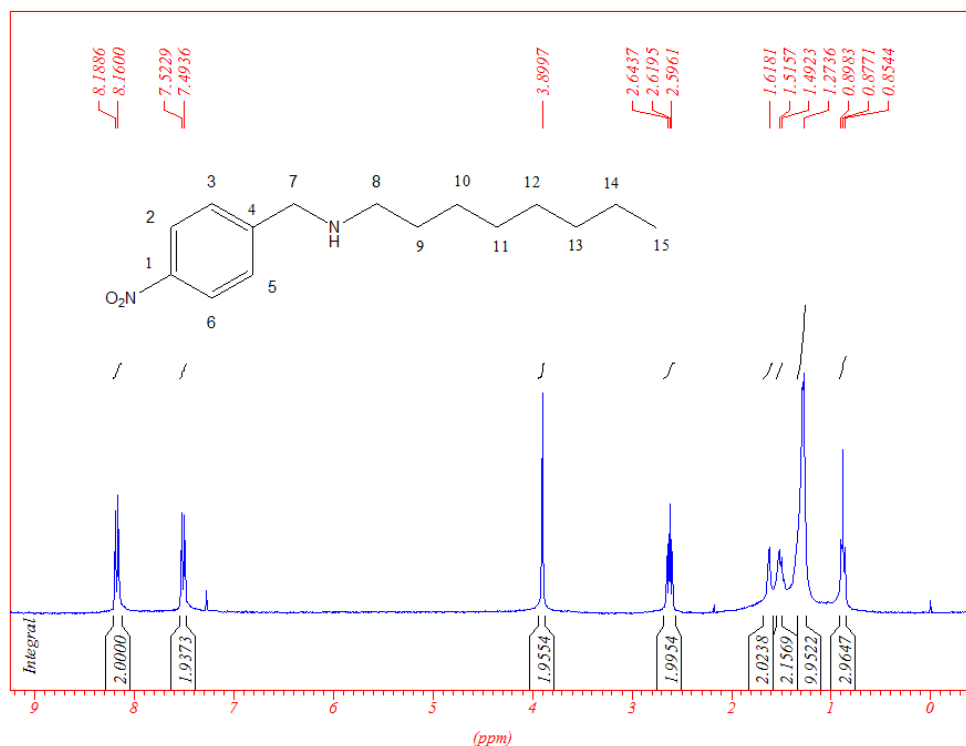


Figura 17 Espectro de RMN ^1H de **17b** (300 MHz, CDCl_3 , δ CDCl_3 7,26).

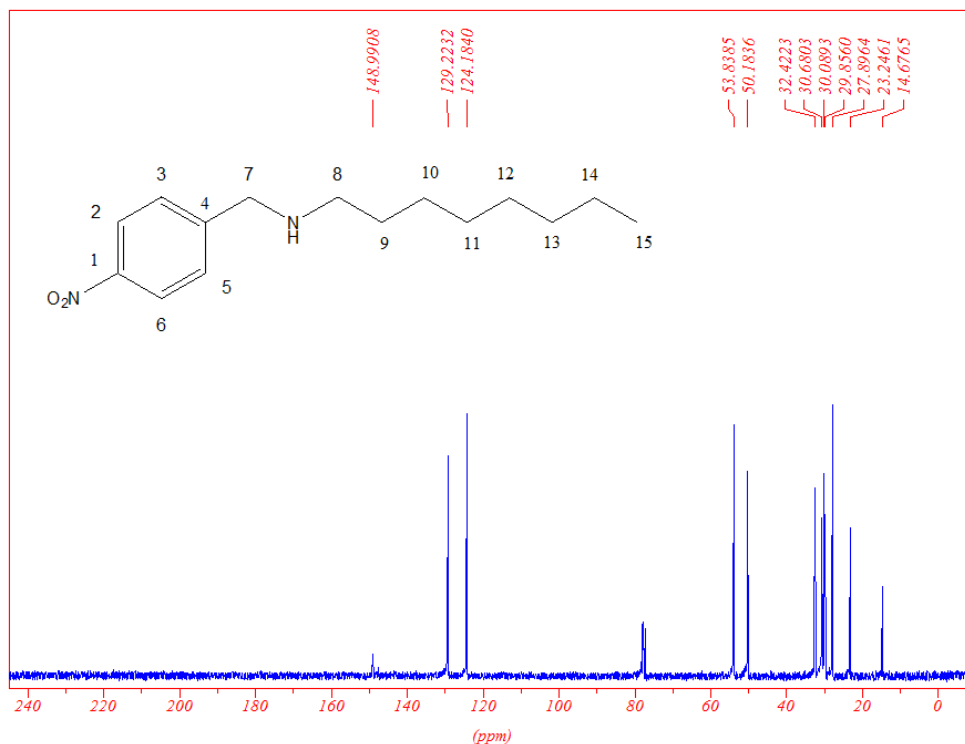


Figura 18 Espectro de RMN de ¹³C de **17b** (75 MHz, CDCl₃, δ CDCl₃ 77,00).

No espectro de RMN de ¹³C do composto **17b** (Figura 18) observa-se sinais entre δ 14,7 e 32,4 correspondentes aos carbonos da porção alquila; bem como um sinal em δ 50,2 correspondente ao carbono metilênico ligado ao anel aromático. Há ainda, um sinal em δ 53,8 correspondente ao carbono metilênico C₈; já entre δ 124,2 e 148,9 os sinais dos carbonos da porção aromática.

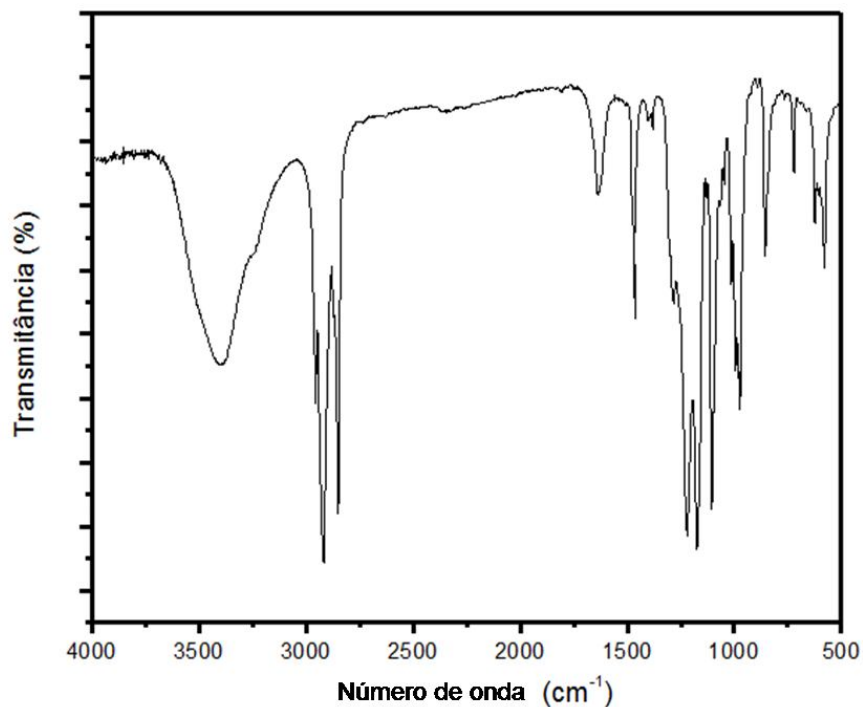


Figura 19 Espectro no IV de **17b** (KBr).

No espectro na região do infravermelho em KBr (Figura 19) observaram-se bandas de absorção em 2928 e 2857 cm^{-1} correspondentes as deformações axiais C-H de aromático e alifático, respectivamente e banda em 1520 cm^{-1} referente a deformação angular N-H, observa-se em 1350 e 1500 cm^{-1} deformações axial simétrica e assimétrica característico da presença de NO_2 , em 1262 cm^{-1} observa-se estiramento axial de CN.

3.1.5 Síntese e caracterização do *N*-(4-piridilmetilamino)-2-metilpropanol **20c**

O composto **20c** foi sintetizado através da condensação do aminoálcool **14c** com a piridina-4-carbaldeído **18**. O produto foi obtido com rendimento de 58 %, na forma de óleo.

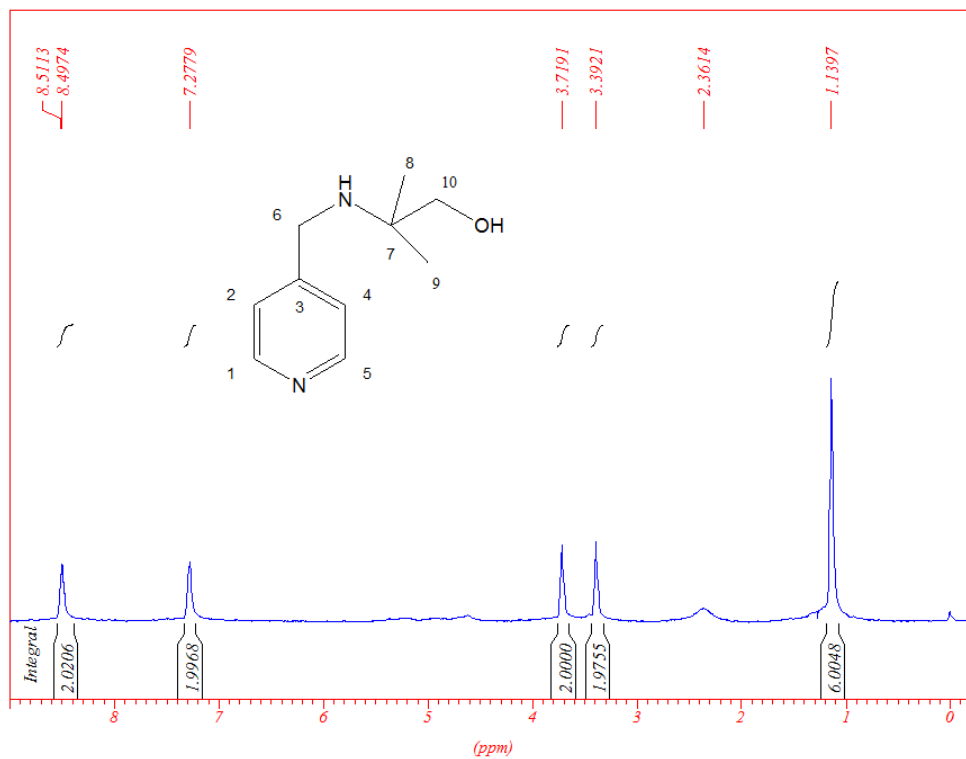


Figura 20 Espectro de RMN ^1H de **20c** (300 MHz, CDCl_3 , δ CDCl_3 7,26).

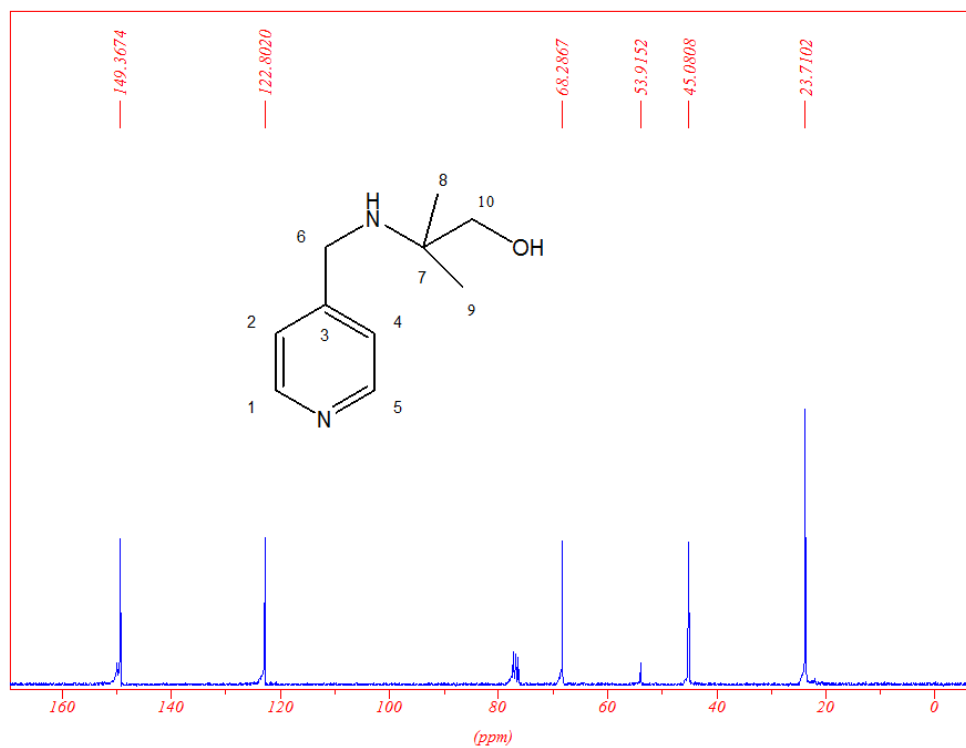


Figura 21 Espectro de RMN de ^{13}C de **20c** (75 MHz, CDCl_3 , δ CDCl_3 77,00).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 20) do composto **20c** observa-se a presença de um simpleto em δ 1,14 referente aos hidrogênios dos grupos metila, sinal largo em δ 3,39, referente aos dois hidrogênios do grupo metilênico da porção aminoálcool; um sinal em δ 3,72 referente aos dois hidrogênios metilênicos ligados ao nitrogênio. Pode-se observar também em δ 7,28 e 8,49 dupletos característicos dos hidrogênios do anel da piridina com $J = 8,3$ Hz.

No espectro de RMN de ^{13}C de **9c** (Figura 21) observa-se um sinal em δ 23,7 referente aos carbonos metílicos em δ 45,1 um sinal correspondente ao carbono metilênico ligado a piridina e ao nitrogênio da porção aminoálcool; em δ 53,9 observa-se sinal referente ao carbono não hydrogenado da porção aminoálcool, em δ 68,3 sinal indicando a presença do carbono metilênico da porção aminoálcool, em δ 122,8 e 149,4 verificam-se sinais referentes aos carbonos do anel piridínico.

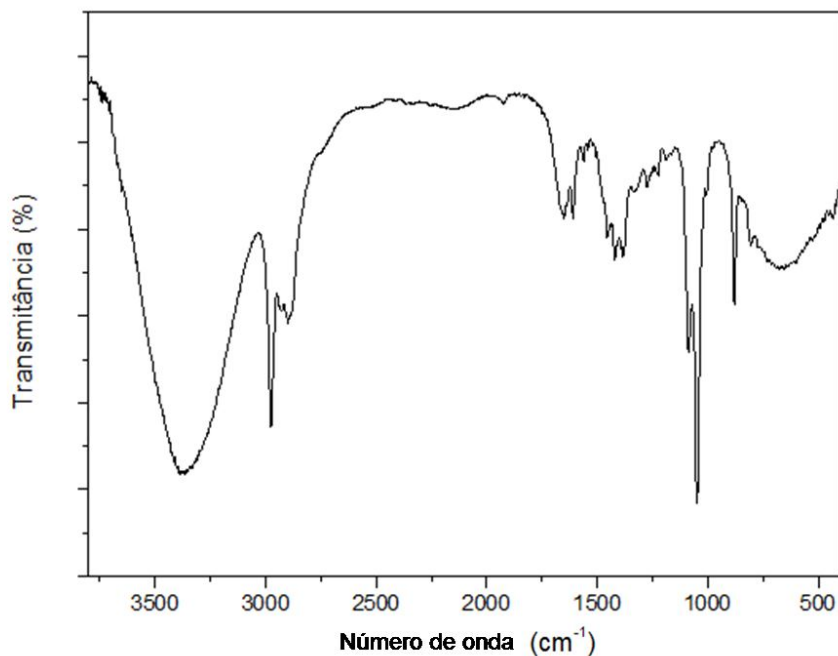


Figura 22 Espectro no IV de **20c** (KBr).

No espectro na região no infravermelho (Figura 22) em KBr observam-se em 3370 cm^{-1} sobreposição de bandas de absorção do estiramento O-H e deformação axial de N-H de aminas; em 2917 e 2885 cm^{-1} observam-se bandas relativas as deformações axiais de C-H de aromático e alifático.

3.1.6 Síntese e caracterização do *N*-(2-piridilmetil)octilamina **21b**

O composto **10b** foi sintetizado a partir da condensação da octilamina **14b** ao aldeído piridina-2-carbaldeído **20** com rendimento de 47 %.

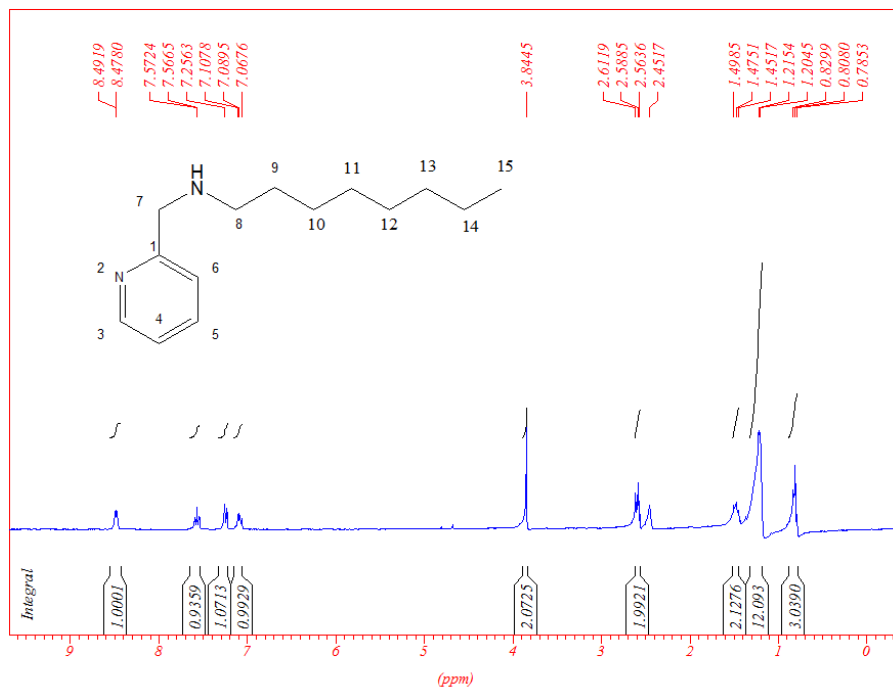


Figura 23 Espectro de RMN de ¹H de **21b** (300 MHz, CDCl₃, δ CDCl₃ 7,26).

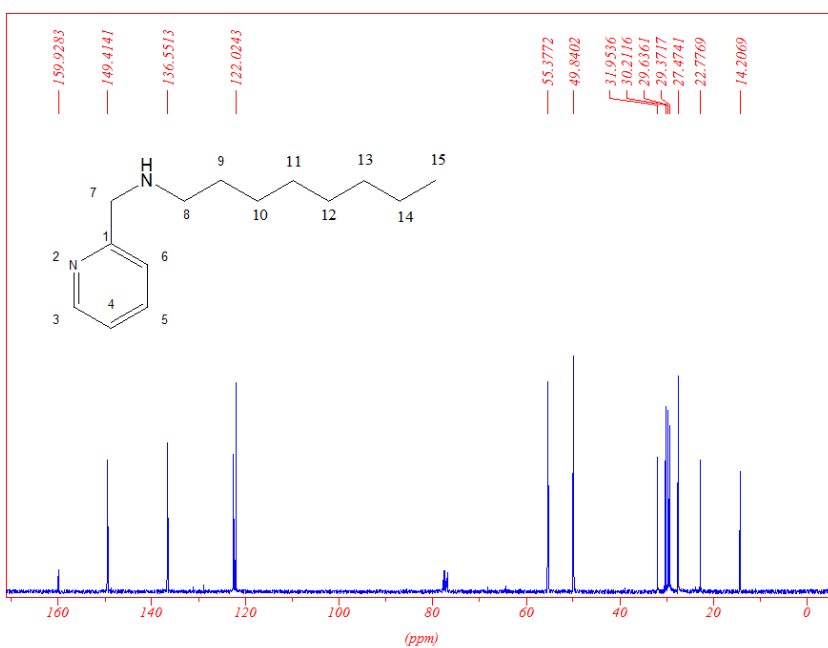


Figura 24 Espectro de RMN de ¹³C de **21b** (75 MHz, CDCl₃, δ CDCl₃ 77,00).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 23) do composto **21b** observa-se um tripleto em δ 0,81 com $J = 6,6$ Hz correspondente aos hidrogênios metílicos, um sinal largo em δ 1,21 referente aos hidrogênios metilênicos da porção alifática; um tripleto em δ 2,58 com constante de acoplamento de 7,0 Hz referente aos hidrogênios metilênicos da porção alquila ligada ao grupo amino, um simpleto em 3,84 ppm característico dos hidrogênios metilênicos ligados a porção alquila e ao anel piridínico, observa-se entre 7,07 e 8,49 sinais dos hidrogênios do heterociclo.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 24) de **21b** observam-se sinais entre δ 14,2 a 31,9 referentes aos carbonos da porção alifática, um sinal em δ 49,8 correspondente ao carbono metilênico C_8 ; já em δ 55,4 um sinal correspondente ao carbono metilênico C_7 ligado ao heterociclo. Há ainda, sinais na região de δ 122,0 à δ 159,9 referentes aos carbonos da porção heteroaromática.

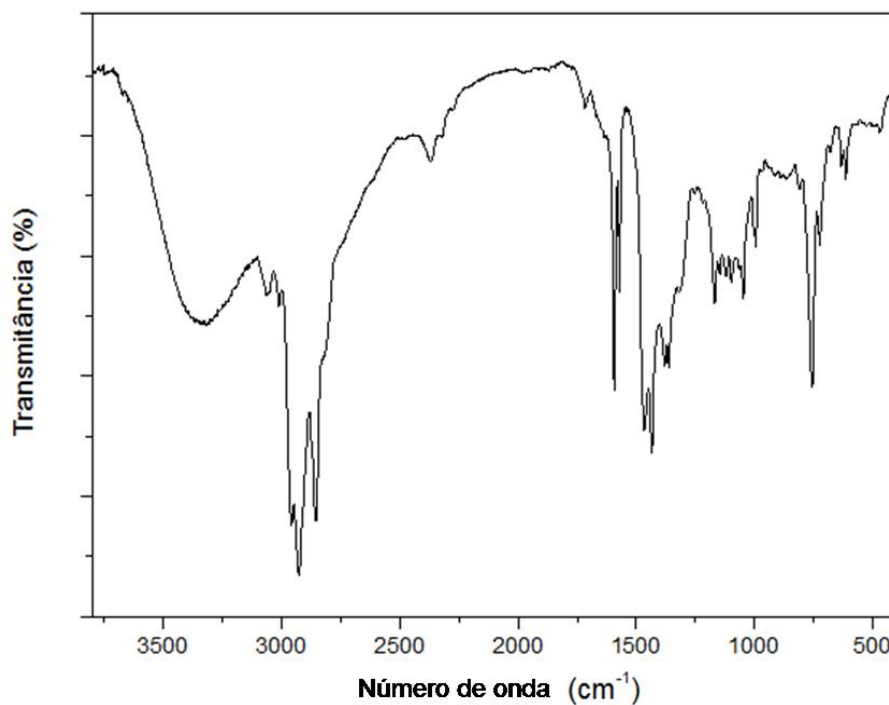


Figura 25 Espectro no IV de **21b** (KBr).

No espectro na região do infravermelho em KBr (Figura 25) observam-se bandas de absorção em 3349 cm^{-1} referente a banda de absorção de deformação da ligação N-H de amina; em 2917 e 2851 observam-se bandas relativas às deformações axiais de C-H de aromático e alifático.

3.2 SÍNTESE DE DERIVADOS DO METRONIDAZOL

3.2.1 Síntese de aminoalcoóis e amina

Em um primeiro momento, foi empregado o iodometronidazol **22**, fornecido pelo Professor Dr. Ricardo José Alves do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG. Esse composto apresenta a vantagem de ser facilmente funcionalizado por substituição nucleofílica, já que o iodo é um bom grupo abandonador. O tratamento do iodeto **22** com 1 a 3 equivalentes dos aminoalcoóis **14a** e **14c** e com a amina **14b**, sob refluxo do THF ou em temperatura ambiente, levou a formação de misturas de difícil separação (Tabela 1). Esperando uma reatividade mais moderada e um menor número de compostos formados, a reação foi testada usando o mesilmetronidazol (MTMz) **23**. A reação não ocorreu em temperatura ambiente, e uma mistura complexa foi obtida sob refluxo do dimetilformamida. Adicionando 1 equivalente de piridina a reação foi possível isolar o composto desejado com rendimento de 5%.

Tabela 1. Tentativas de obtenção de aminoalcoóis derivados do metronidazol

Substrato	Nucleófilo	Solvente	Aquecimento	Resultado
22	1 eq. 14a	THF	refluxo	mistura de difícil separação.
22	3 eq. 14b	THF	refluxo	mistura de difícil separação.
22	3 eq. 14b	THF	Temperatura ambiente	decomposição na purificação.
22	1 eq. 14b (adição de py)	THF	refluxo	mistura de difícil separação.
22	1 eq. 14c	THF	refluxo	composto não identificado
22	3 eq. 14c	THF	refluxo	decomposição na purificação
23	1 eq. 14c	DMF	Temperatura ambiente	nada ocorreu em 48h.
23	1 eq. 14c	DMF	refluxo	mistura de difícil separação.
23	1 eq. 14c (adição de py)	DMF	refluxo	5% rendimento

Diante do rendimento muito baixo (5%) tentamos a reação usando a irradiação por micro-ondas como fonte de aquecimento. As micro-ondas são uma forma de radiação eletromagnética de comprimento de onda entre 1 mm a 1 m. A tecnologia foi desenvolvida na década de 40 e passou a ser utilizada por químicos em reações na década de 80. Esse processo tem sido empregado na síntese de compostos orgânicos, em especial compostos heterociclos (Sanseverino *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2008, Duarte *et al.*, 2010). A vantagem da utilização deste em síntese é a alta velocidade com que as reações se processam, com altos rendimentos, formação de poucos subprodutos, diminuição dos resíduos, etc.

Diferentemente do aquecimento convencional, no qual a transferência de calor ocorre por convecção, condução e radiação; o aquecimento por micro-ondas ocorre através de dois mecanismos: rotação de dipolo e condução iônica.

Na rotação de dipolo ocorre alinhamento da molécula com o campo elétrico. Com a remoção do campo, as moléculas voltam ao estado desordenado, liberando energia na forma de calor (Figura 26). Para que ocorra rápido aquecimento, os equipamentos que se destinam a este fim estão programados para oscilar o campo cerca de $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo. No mecanismo de condução iônica, o calor é gerado através de atrito intermolecular.

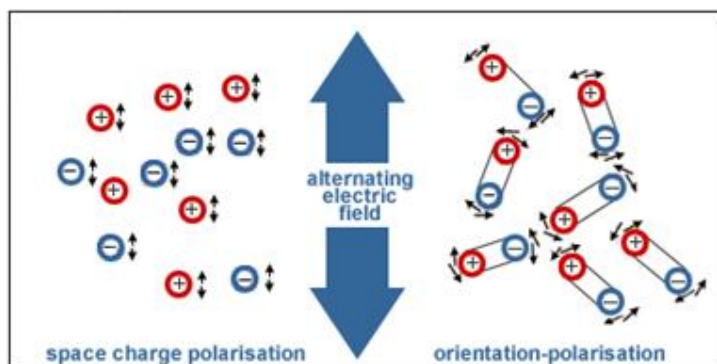
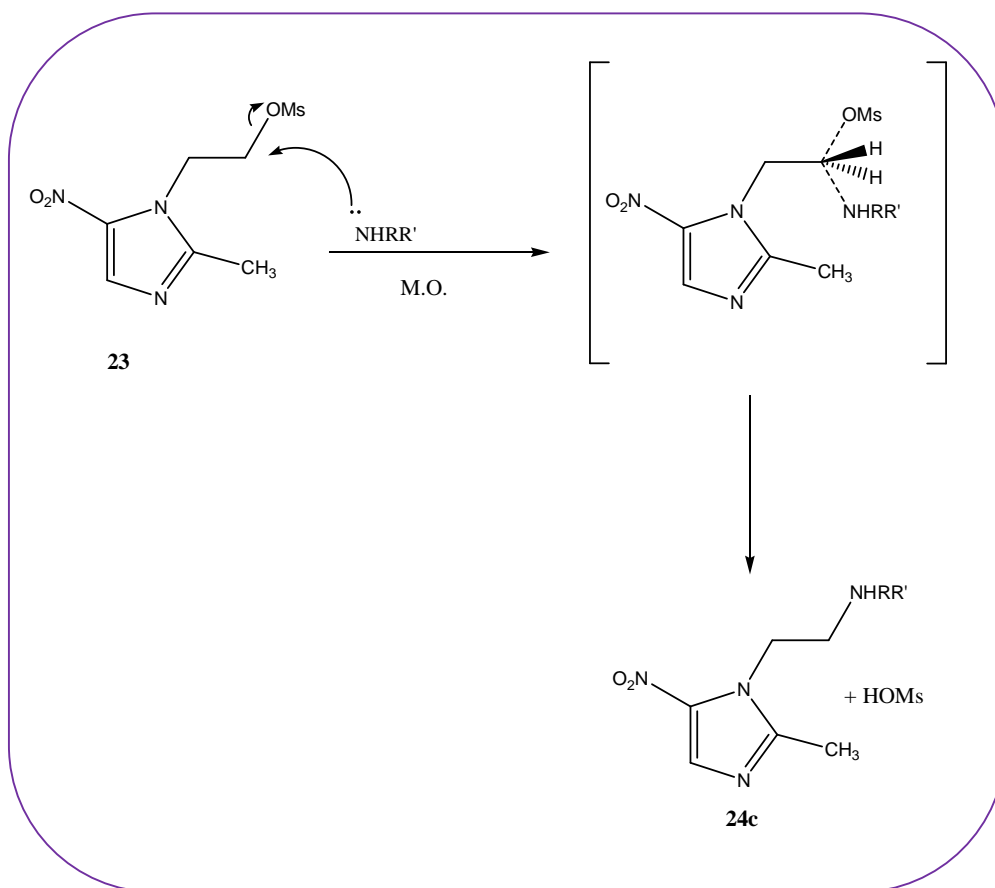


Figura 26 Moléculas sob influência do campo elétrico.

http://www.pueschner.com/basics/phys_basics_en.php

O MZTMS **23** foi tratado com 1 equivalente molar do aminoálcool **14c** em DMF por 90 minutos sob irradiação micro-ondas a 100°C. Após evaporação do DMF a mistura reacional foi submetida a extração e purificada por coluna cromatográfica, fornecendo o composto **24c** com rendimento moderado de 30 %. O aminoálcool **24c** foi caracterizado por RMN de ^1H (Figura 28) e RMN de ^{13}C (Figura 29).

O procedimento foi repetido para o aminoálcool **14a** porém, não foi possível isolar o produto almejado. Uma nova tentativa foi realizada utilizando a octilamina **14b** e a dietanolamina **14d**, fornecendo os compostos **24b** e **24d** com rendimentos moderados de 30 e 28%, respectivamente. Acredita-se que o maior rendimento esteja relacionado ao maior impedimento estérico do aminoálcool empregado na síntese e à natureza do grupo retirante. Sabe-se que a estabilização das cargas no estado de transição, é um fator importante, uma vez que diminui a energia livre de ativação, aumentando a velocidade da reação (**Esquema 13**).



Esquema 13 Proposta de mecanismo para a reação de substituição nucleofílica entre MTZMs e 2-amino-2-metilpropanol.

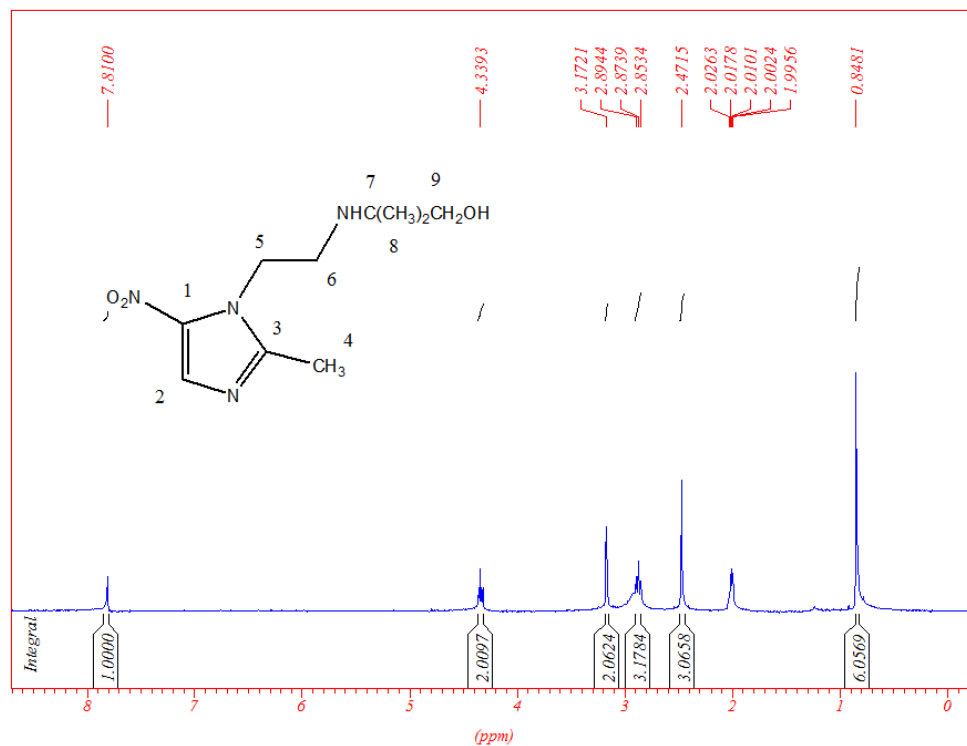


Figura 27 Espectro de RMN ^1H de **24c** (300 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$).

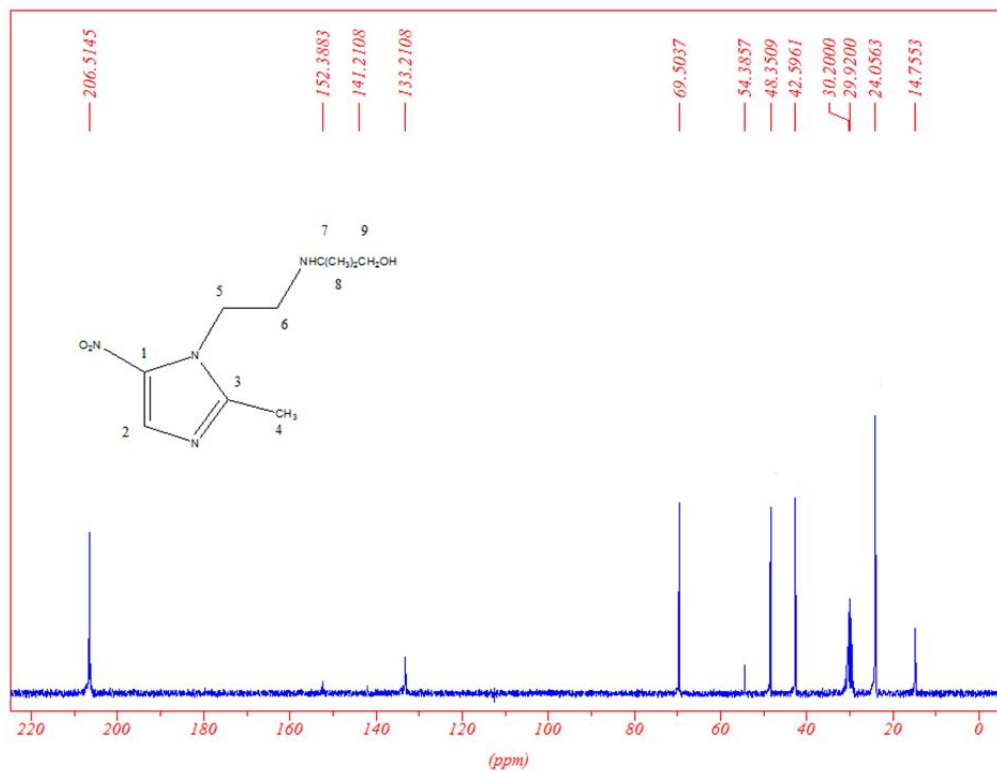


Figura 28 Espectro de RMN de ^{13}C de **24c** (75 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$).

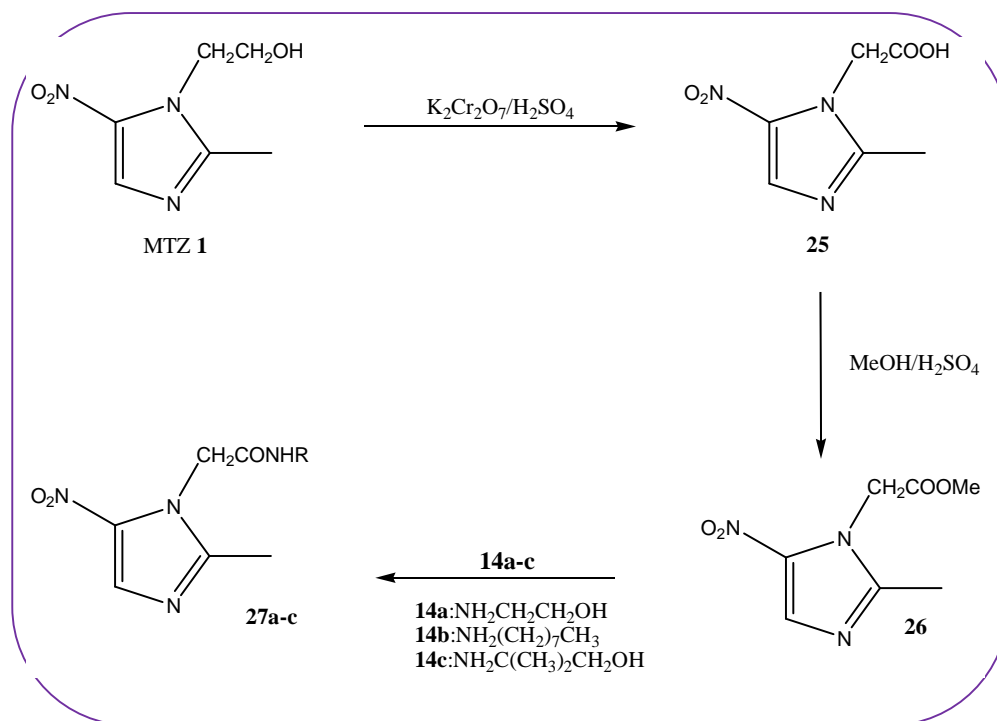
No espectro de RMN de ^1H (Figura 27) do composto **24c** observa-se a presença de um simpleto em δ 0,84 referente aos hidrogênios dos dois grupos metila, um sinal em δ 2,47, referente aos hidrogênios H_4 do grupo metila do heterociclo; um tripleto em δ 2,87 referente aos dois hidrogênios metilênicos H_6 , $J = 6,2$ Hz. Pode-se observar também em δ 3,17 um simpleto referente aos hidrogênios metilênicos da porção aminoálcool, um tripleto em δ 4,33 referente aos hidrogênios metilênicos H_5 , e um simpleto em 7,81 correspondente ao hidrogênio H_1 da porção heteroaromática.

No espectro de RMN de ^{13}C de **24c** (Figura 28) observa-se um sinal em δ 14,7 referente ao carbono metílico ligado à porção heteroaromática, em δ 24,0 um sinal correspondente aos carbonos metílicos da porção aminoálcool; sobreposição de sinais do solvente e do sinal referente ao C_5 em δ 29,9; em δ 42,6 sinal referente ao carbono C_6 , entre δ 122,8 e 149,4 verificam-se sinais referentes aos carbonos do anel imidazólico.

Devido as dificuldades encontradas na obtenção de aminoalcoóis derivados do metronidazol, resolvemos mudar de estratégia e tentar a síntese de amidas derivadas do metronidazol.

3.2.2 Preparação de amidas derivadas do metronidazol

Para essa nova metodologia usamos o metronidazol **1** como material de partida. Planejou-se oxidar o álcool a ácido carboxílico, em seguida esterificar e realizar a reação de amidação (Esquema 14).



Esquema 14 Proposta de síntese dos derivados metronidazoles.

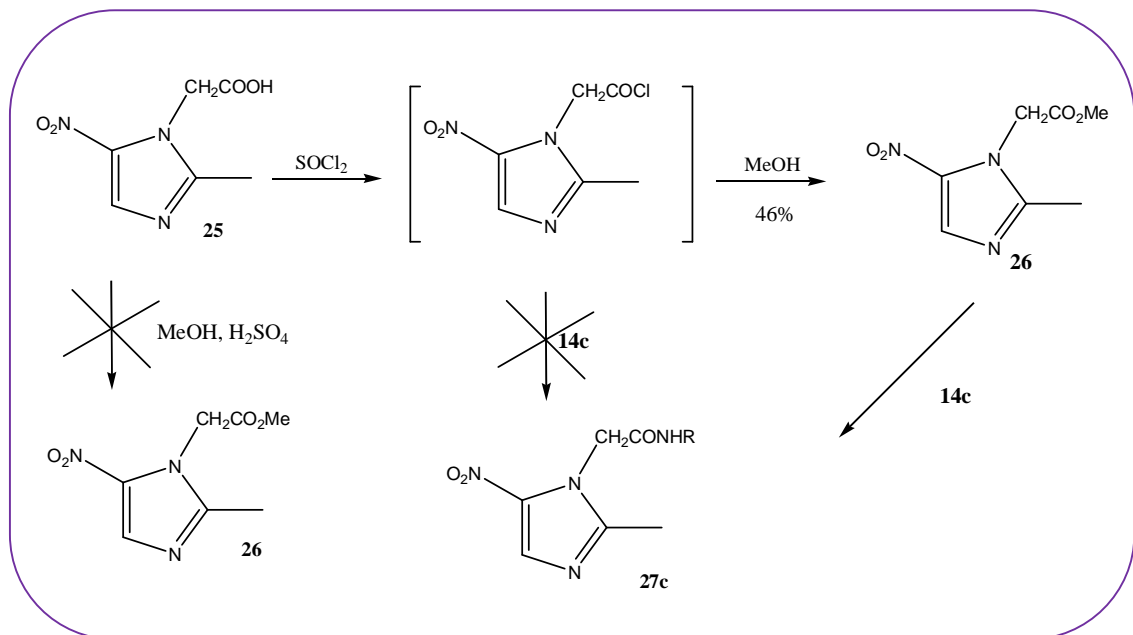
3.2.2.1 Síntese do ácido 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-il)acético **25** (Mirzaei *et al.*, 2007 e Luo *et al.*, 2001).

O metronidazol foi oxidado com ácido crômico formado a partir de dicromato de sódio e adição lenta de ácido sulfúrico. Após neutralização com uma solução de NaOH e extração (AcOH/THF 1:1 v/v), o composto **25** foi purificado por recristalização em diclorometano com rendimento de 58% e caracterizado por comparação da faixa de fusão 175-178°C (Literatura: 176 - 178°C) e espectrometria de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C .

3.2.2.2 Síntese do 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetato de metila **26**

O composto **25** foi dissolvido em metanol anidro com uma quantidade catalítica de ácido sulfúrico e a mistura foi aquecida sob refluxo e agitação magnética por 24h (Esquema 15). Verificou-se por CCD (eluente: AcOH/MeOH 8:2 v/v; revelador: UV), que a reação não ocorreu. Uma nova tentativa foi realizada na qual reagiu-se o ácido carboxílico **25** com cloreto de tionila. O cloreto de ácido formado foi tratado com um excesso de metanol, sob refluxo e agitação. Após purificação por recristalização, o éster metílico **26** foi obtido com 46 % de rendimento. Comprovou-se a formação do composto **26** por RMN de ^1H e de ^{13}C . As

amidas **27 a-c** foram obtidas por reação do éster **26** com os nucleófilos **14a-b**. Os compostos foram purificados e confirmado a síntese por RMN de ^1H e de ^{13}C .



Esquema 15 Tentativa de síntese do metil-2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)acetato.

3.2.2.3 Síntese e caracterização do *N*-[(2- hidroxi-1,1-dimetil)etil]-2-[2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il]acetamida 27c

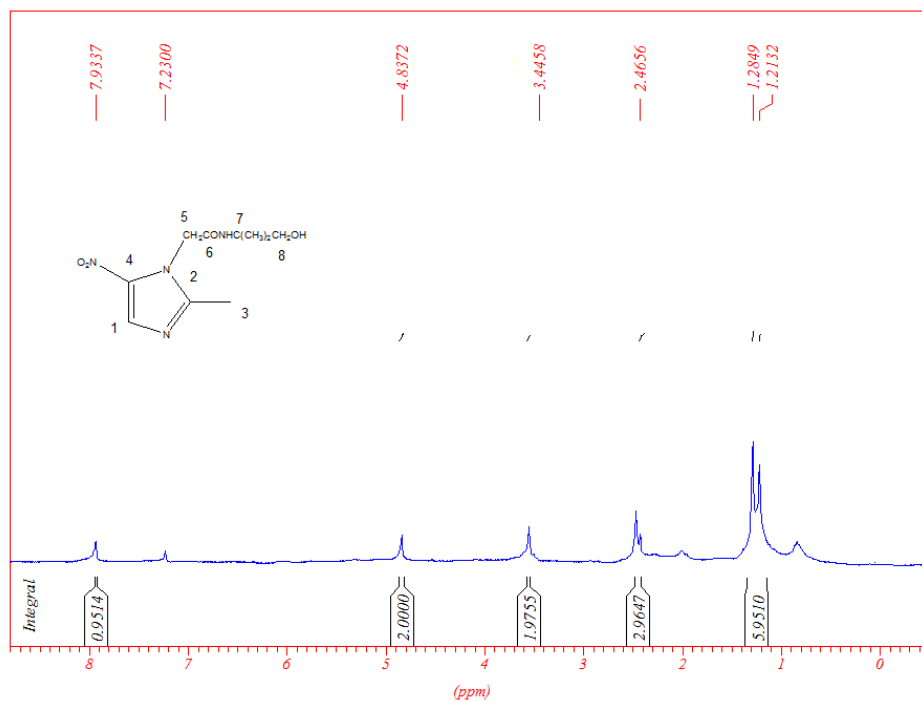


Figura 29 Espectro de RMN ¹H de 27c (CDCl₃, 300 MHz).

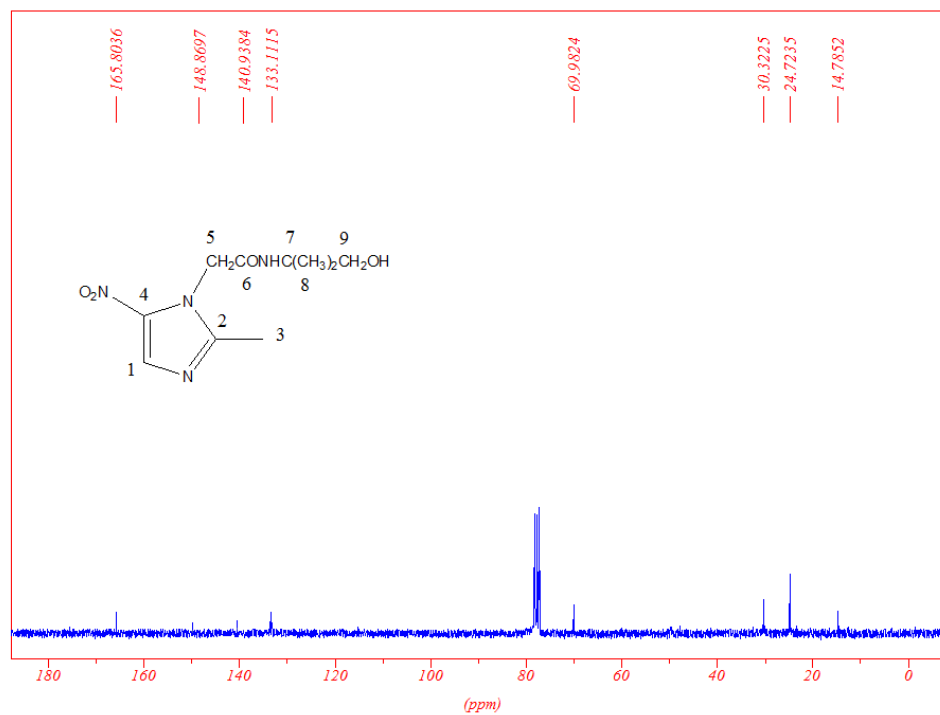


Figura 30 Espectro de RMN de ¹³C de 27c (CDCl₃, 75 MHz).

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 29**) do composto **15c** observam-se a presença de sinais entre δ 1,21-1,28 referente aos hidrogênios H_7 e H_7' dos dois grupos metila, um sinal em δ 2,47, referente aos hidrogênios H_3 do grupo metila do heterociclo; um simpleto em δ 3,44 referente aos dois hidrogênios metilênicos H_8 . Pode-se observar também em δ 4,84 simpleto referente aos hidrogênios metilênicos H_5 , sinal em δ 7,93 referente ao hidrogênio H_1 .

No espectro de RMN de ^{13}C de **15c** (**Figura 30**) observa-se um sinal em δ 14,8 referente ao carbono metílico, C_3 , ligado à porção heteroaromática, em δ 24,7 um sinal correspondente aos carbonos metílicos H_8 ; em δ 30,3 sinal referente ao carbono metilênico, C_5 , em δ 69,9 sinal indicando a presença metilênico ligado a hidroxila; entre 133,1 e 148,9 verificam-se sinais referentes aos carbonos do anel imidazólico; em δ 165,8 sinal correspondente ao C_6 .

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para determinar se os compostos sintetizados apresentam atividade antimicrobiana é necessária a realização de testes de sensibilidade *in vitro* (medida do halo de inibição e concentração inibitória mínima, CIM). Estes consistem em analisar a resistência/sensibilidade de cepas de bactérias frente as substâncias testadas. Com este intuito foram escolhidas para avaliação biológica dos compostos sintetizados bactérias de grande interesse farmacológico: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*.

Staphylococcus aureus (Figura 31) é uma bactéria Gram-positiva. Apesar de fazer parte da microbiota humana saudável é a mais virulenta do gênero, sendo responsável por infecções piogênicas e intoxicações alimentares. A contaminação ocorre através de feridas na pele, pelo ar ou pela ingestão. Os principais sintomas da intoxicação são: náusea, vômito, cólica abdominal e prostração. (Raddi, 1988; Lowy, 1998; Naimi *et al.*, 2011).

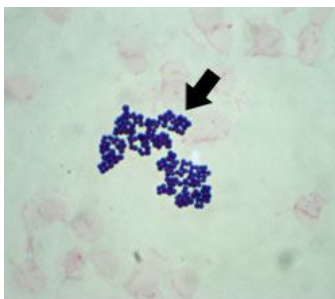


Figura 31 *S. aureus*.

http://www.anvisa.gov.br/servicosaudef/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_w eb/modulo3/gramp_staphylo.htm, acessado em 30/05/12.

Escherichia coli (Figura 32) é um micro-organismo anaeróbico facultativo, gram-negativo que pertence a família Enterobacteriaceae. Pode ser considerada indicador de contaminação fecal, por colonizar a flora intestinal. É transmitida por alimentos contaminados ou secreções de pessoas infectadas. Após contaminação os principais sintomas são a diarreia e náuseas. Pode também causar infecções na pele, urinária, ou doenças respiratórias. A transmissão é por via oral, não sendo transmitido pelo ar (Ormenese, 1999; Murray *et al.*, 2006; <http://www.mdsaude.com/2011/06/bacteria-escherichia-coli.html>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, acessados em 09/06/2012).

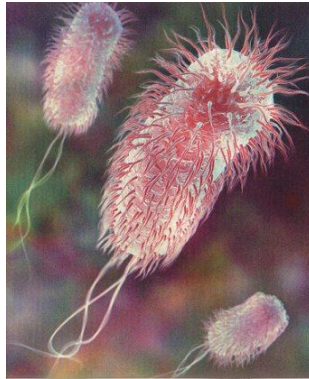


Figura 32 E. coli.

<http://www.mdsaude.com/2011/06/bacteria-escherichia-coli.html> (acessado em 30/05/2012).

Staphylococcus epidermidis (**Figura 33**) é uma bactéria gram-negativa. Considerada a segunda espécie mais importante do gênero, ela habita a flora da pele e mucosa. Não produz toxinas e apesar de menos virulenta que a espécie *S. aureus*, é patogênica, principalmente para pessoas com baixa imunidade, sendo o principal agente causador de sepse tardia em neonatos. Pode também causar endocardite e infecções generalizadas (Cheung *et al.*, 2010; Trablusi e Alterthum, 2004, Brito *et al.*, 2008; Iwase *et al.*, 2010).

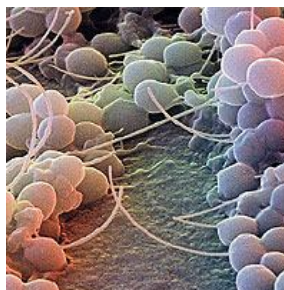


Figura 33 *S. epidermidis*.

<http://docp.edublogs.org/staphylococcus-epidermidis/> acessado em 09/06/12.

A *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 34) é uma bactéria Gram-negativa, encontrada em diversos ambientes, principalmente solo e água, ou ainda associada a plantas e animais. É um patógeno oportunista que apresenta capacidade de formar biofilmes, sendo apontado como uma das principais causas de infecções hospitalares em indivíduos imunocomprometidos. Devido a alta capacidade de sobreviver em ambientes hostis e apresentar diversos mecanismos de resistência a um grande número de antibióticos e antissépticos tem sido apontada como um dos grandes responsáveis por infecções (Murray *et al.*, 2006; Mata e Abegg, 2007; Guimarães, 2010, Segatto, 2008).



Figura 34 *P. aeruginosa*

(<http://pseudomonas.com/>, acessado em 30/05/2012).

3.3.1. Método do halo de inibição (Método de Kirby-Bauer):

A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de difusão em Agar, método amplamente empregado por ser simples, rápido e barato. Porém este é apenas qualitativo, já que depende do gradiente de difusão da substância no meio de cultura (Onofre *et al.*, 1999).

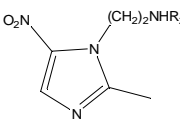
São confeccionados vários poços em um meio de cultura contido numa placa de Petri previamente inoculado com uma das bactérias usadas no ensaio. Durante o período de incubação a 35,5°C, o agente antimicrobiano (substância testada) sofre difusão no poço

para o meio sólido. O crescimento das bactérias que forem sensíveis ao composto sintetizado é inibido formando o halo de inibição na placa. Para as bactérias resistentes a substância testada não haverá formação do halo de inibição.

O controle positivo da inibição foi realizado utilizando nitrofurazona.

Os resultados obtidos para os aminoalcoóis **15a-c**, **16a-c**, **17a-c**, **20a-c**, **21 a-c** e **24 b-d** estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Medida do halo de inibição em mm

	Composto		Bactéria			
			<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	R ₁	R ₂	Gram-negativo		Gram-positivo	
15a	O(CH ₂) ₇ CH ₃	(CH ₂) ₂ OH	21	19	25	27
15b	O(CH ₂) ₇ CH ₃	(CH ₂) ₇ CH ₃	29	9	23	11
15c	O(CH ₂) ₇ CH ₃	C(CH ₂) ₂ CH ₂ OH	9	-	15	-
16a	OCH ₃	(CH ₂) ₂ OH	22	-	-	-
16b	OCH ₃	(CH ₂) ₇ CH ₃	-	-	20	18
16c	OCH ₃	C(CH ₂) ₂ CH ₂ OH	-	-	-	-
17a	NO ₂	(CH ₂) ₂ OH	-	-	-	-
17b	NO ₂	(CH ₂) ₇ CH ₃	22	-	16	14
17c	NO ₂	C(CH ₂) ₂ CH ₂ OH	-	-	-	-
	Het-CH₂NHR₂					
	Het	R ₂				
20a	1,4-pir	(CH ₂) ₂ OH	-	-	-	-
20b	1,4-pir	(CH ₂) ₇ CH ₃	14	-	10	15
20c	1,4-pir	C(CH ₂) ₂ CH ₂ OH	13	-	-	-
21a	1,2-pir	(CH ₂) ₂ OH	-	-	-	-
21b	1,2-pir	(CH ₂) ₇ CH ₃	28	15	22	30
21c	1,2-pir	C(CH ₂) ₂ CH ₂ OH	-	-	-	-
						
24b		(CH ₂) ₇ CH ₂ OH	28	15	22	30
24c		C(CH ₃) ₂ CH ₂ OH	-	-	-	-
24d	C(CH ₂) ₂ CH ₂ OH		-	-	-	-
	Nitrofurazona		35	15	31	25

E. coli: *Escherichia coli* *P. aeruginosa:* *Pseudomonas aeruginosa*
S. Aureus: *Staphylococcus aureus* *S. epidermidis:* *Staphylococcus epidermidis*

Conforme esperado os compostos foram menos ativos contra as bactérias Gram-negativas, o que pode ser explicado pelo fato da constituição da parede celular desta ser mais complexa, podendo diminuir a concentração da substância ativa no interior celular ou mesmo impedir a entrada desta no meio celular (Trabulsi e Alterthum, 2004; Hashimoto *et al.*, 1997).

Os compostos **15a-c**, **16b**, **17b**, **20b**, **21b** e **24b** inibiram os crescimentos de pelo menos duas das bactérias testadas. Os compostos **15a-b**, **21b** inibiram o crescimento das quatro bactérias testadas. Apesar de não ser quantitativo, esse primeiro teste sugere que a presença da cadeia alifática é um fator relevante para a atividade biológica, tanto para as

bactérias Gram-positivas quanto para as Gram-negativas, já que os compostos ativos possuem a cadeia octila, indicando que a lipofilia é uma propriedade de grande importância.

Para a medida da lipofilia utiliza-se o coeficiente de partição, logP, logaritmo da razão entre concentrações de uma substância, em condições de equilíbrio, em um sistema bifásico constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa.

Em muitos casos o funcionamento dos sistemas biológicos está relacionado com as propriedades lipofílicas de seus componentes: o transporte através da membrana lipídica de duas camadas é facilitado para os compostos lipofílicos, enquanto a difusão de moléculas polares é impedida; as interações entre moléculas biológicas (enzima/substrato, antígeno/anticorpo, etc.) também envolvem fenômenos relacionados a lipofilia.

Os compostos que apresentam maior valor de P terão maior facilidade para passar a membrana celular, facilitando a absorção dos compostos na célula bacteriana podendo permitir a ação deste (Crozet *et al.*, 2009; Tavares, 2004; Nogueira, 2009).

O coeficiente de partição tem sido utilizado com sucesso nos estudos da relação estrutura atividade quantitativa (QSAR). Pode ser determinado experimentalmente ou por métodos computacionais. Nesse trabalho os valores de logP foram obtidos utilizando o software ChemDraw 8.0 (Tabela 3). Observou-se que para os compostos ativos os valores de logP variam de 3,17 a 4,38, com a exceção do composto **15b**, o qual, por possuir duas cadeias octila, apresentou um logP de 7,29. Os demais compostos apresentaram logP <1. Esses dados reforçam a hipótese segundo a qual a lipofilia contribui para a atividade biológica.

O método de halo de inibição foi usado para fazer uma triagem das substâncias com potencial efeito antibacteriano. Baseado nisso, a avaliação da CIM foi feita apenas para as substâncias ativas.

Tabela 3: logP calculado por ChemDraw 8.0 (ACD Labs)

Composto	logP	Composto	logP
15a	3,87	20a	-0,26
15b	7,29	20b	3,17
15c	4,40	20c	0,28
16a	0,96	21a	0,17
16b	4,38	21b	3,60
16c	1,49	21c	0,70
17a	0,47	24b	3,17
17b	4,37	24c	0,28
17c	-	24d	-

3.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A microdiluição em caldo é um ensaio biológico utilizado como medida quantitativa da atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano. A técnica permite a determinação de concentração mínima de substância necessária para inibir o crescimento bacteriano. Quanto menor o valor da concentração mínima inibitória, maior é a atividade antimicrobiana do composto avaliado.

Foram selecionados os compostos **15 a-c**, **16b**, **17b**, **20b** e **21b** para realização do ensaio CIM, já que os mesmos apresentaram os melhores resultados no teste de halo de inibição. Devido as poucas quantidades sintetizadas, os derivados de metronidazol não foram incluídos nesse estudo.

Os resultados da CIM para as bactérias testadas estão apresentados na **tabela 4**.

Tabela 4 Concentração inibitória mínima (CIM $\mu\text{g mL}^{-1}$):

Composto	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>
15a	64	128	64	64
15b	32	32	> 512	> 512
15c	64	256	32	64
16b	> 512	> 512	128	32
17b	512	> 512	512	128
20b	> 512	> 512	128	128
21b	128	256	64	128
24b	256	512	256	> 512

Conforme pode ser visualizado na **tabela 3**, os compostos sintetizados foram mais ativos contra as bactérias Gram-negativas *S. aureus* e *S. epidermidis*, confirmando os resultados obtidos no teste de halo de inibição.

A substância **15b** apresentou o melhor resultado de inibição frente as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa*; a substância **15c** foi responsável por inibir melhor a bactéria *S. aureus*, já **16b** se destacou por melhor inibir *S. epidermidis*. Os resultados sugerem que a presença de grupo metoxila (**16b**) ou nitro (**17b**) no ciclo aromático provoca uma diminuição da atividade. O derivado de 1,2 piridina **21b** foi mais ativo do que seu análogo 1,4-piridina **20b**.

3.3.3 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB)

É a menor concentração do composto capaz de eliminar a população bacteriana, exercendo efeito bactericida. A CMB consiste em plaquear os meios contendo inóculo por meio de alça, duas concentrações acima e abaixo do CIM. A leitura se faz após a incubação das placas, sendo considerada CIB a concentração para a qual não houve crescimento bacteriano. O composto foi considerado bacteriostático quando apenas inibiu o crescimento bacteriano. A classificação dos compostos sintetizados quanto ao efeito bactericida ou bacteriostático é apresentada na **tabela 4**.

Tabela 5 Concentração Inibitória bactericida ($\mu\text{g mL}^{-1}$):

Composto	<i>E. Coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>
15a	64	b	64	128
15b*	32	b	32	b
15c	128	b	128	256
16b	b	b	256	b
17b	256	b	b	128
20b	b	b	b	256
21b	128	b	128	b
24b	256	512	256	b

b: Bacteriostático nas concentrações testadas

Dos compostos testados nenhum apresentou efeito bactericida para a bactéria *P. aeruginosa*. As demais bactérias tiveram sensibilidades parecidas frente aos compostos testados. Os compostos menos eficientes foram o derivado metóxi **16b** e a piridina 4-substituída **20b**, que apresentaram efeito bactericida para somente uma bactéria (*S. Aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente).

3.4. Avaliação da atividade antiparasitária

Os derivados benzaldeídos foram avaliadas contra os protozoários Giárdia, Trichomonas e amebas no laboratório de amebíases da Universidade Federal de Minas Gerais. Porém, nenhum dos compostos testados inibiu o crescimento de Giárdia, o composto **15a** inibiu o crescimento de Trichomonas e amebas. Já os compostos **17b** e **17c** foram ativos para Trichomonas. Todas as substâncias foram testadas em triplicata com 50 micromolar.

4 ANÁLISE “in silico” DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS (ADMET)

Apesar de não terem mostrado uma atividade antibacteriana significativa, os compostos sintetizados nesse trabalho têm potencial para outras atividades biológicas (antifúngica, antiparasitária, imunossupressora, etc.)

Nos últimos anos, estudos *in silico* vem sendo usados para a predição de ADME/Tox (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxidez), propriedades fundamentais para o desenvolvimento de novos fármacos. Essas técnicas computacionais permitem um ganho econômico e de tempo, já que podem permitir uma triagem das substâncias planejadas e a redução do número de testes biológicos.

4.1 Regra dos 5 de LIPINSKI

Uma boa disponibilidade oral é um requisito importante para substâncias com potencial terapêutico, pois proporciona uma menor posologia e uma diminuição do custo do tratamento. A regra de Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001), é definida por um conjunto de parâmetros estruturais que permitem detectar quais compostos podem apresentar problemas de absorção, permeabilidade e disponibilidade oral. De acordo com esta regra, para uma boa atividade farmacológica a substância deve apresentar pelo menos três das quatro propriedades seguintes:

- peso molecular menor do que 500 daltons;
- logP menor do que 5;
- máximo de cinco grupos doadores de ligação hidrogênio (expresso pela soma de OH e NH na molécula);
 - máximo de dez grupos aceptores de ligação hidrogênio (expresso pela soma de átomos de N e O).

As regras de Lipinski se baseiam nas propriedades físico-químicas de substâncias que passaram da fase I dos testes clínicos (testes relacionados a toxicidade e absorção). Outra propriedade de grande importância é a área de superfície polar (PSA) que pode ser

considerada na análise da permeabilidade na membrana plasmática celular. É desejável que a substância apresente índices de PSA inferiores a 140 Å².

Os dados para avaliação da “Regra dos Cinco” dos compostos sintetizados nesse trabalho, obtidos usando o Molinspiration podem ser observados na tabela 6.

Tabela 6 Parâmetros calculados pelo Osiris® Property Explorer

Composto	nALH	nDLH	PM (g/mol)	PSA (Å ²)	clogP	logP
15a	3	2	279,42	41,49	4,54	3,87
15b	2	1	347,48	21,26	8,83	7,29
15c	3	2	307,47	41,49	5,25	4,40
16a	3	2	181,23	41,49	0,84	0,92
16b	3	2	249,39	41,49	5,13	5,01
16c	3	2	209,28	21,26	1,54	1,73
17a	5	2	196,20	78,08	0,66	0,82
17b	4	1	264,18	57,85	4,96	1,63
17c	5	2	224,30	78,08	1,37	4,91
20a	3	2	152,19	45,15	-0,58	-0,42
20b	2	1	220,19	24,92	3,72	3,66
20c	3	2	180,25	45,15	1,13	0,38
21a	3	2	152,19	45,15	-0,58	0,17
21b	2	1	220,35	24,92	3,72	3,60
21c	3	2	180,25	45,15	0,13	0,70
24a	7	2	214,11	95,90	-0,57	-
24b	6	1	282,38	75,67	3,61	-
24c	7	2	242,14	95,90	0,14	-
24d	8	2	258,28	107,34	-0,34	-
27b	7	1	296,37	92,75	2,99	-
27c	8	2	256,12	112,98	-0,33	-

- nALH número de grupos aceptores de ligação hidrogênio
- nDLH número de grupos doadores de ligação hidrogênio
- PSA área de superfície polar

Os resultados mostram que todos os compostos seguem as regras de Lipinski, atendendo a pelo menos três dos quatro requisitos detalhados acima e apresentam área de superfície polar inferior a 140 Å². Somente os compostos **15b** (cLogP = 8,83), **15c** (cLogP = 5,25) e **16b** (cLogP = 5,13) apresentaram valores de cLogP maiores do que 5.

4.2 Toxicidade teórica

A avaliação da toxicidade pode ser feita usando o software Osiris Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/>) que compara a substância que se deseja analisar a um banco de dados de 5300 fragmentos moleculares e 18300 fármacos comerciais.

A **tabela 5** mostram os dados tóxicos teóricos obtidos para os compostos sintetizados. Pode-se observar, na **tabela 7**, riscos toxicológicos (mutagênico e tumorigênico) para os derivados nitrados **17a-c**, **24a-c** e **27a-c**. Isso se deve a toxicidade reconhecida do grupo nitro.

É importante destacar que mesmo as substâncias que apresentem baixos riscos toxicológicos não pode-se afirmar que estão isentas de efeitos nocivos ao organismo, uma vez que estudos *in silico* são ferramentas que apenas auxiliam na triagem de substâncias para um posterior estudo, sendo importante a realização de métodos tradicionais para confirmar os resultados obtidos.

Tabela 7 Toxicidade teórica obtidos com o programa Osiris® Property Explorer

Composto	Risco Mutagênico	Risco Tumorigênico	Risco Irritante	Risco Reprodutivo
15a	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
15b	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
15c	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
16a	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
16b	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
16c	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
17a	Alto	Alto	Baixo	Baixo
17b	Alto	Alto	Baixo	Baixo
17c	Alto	Alto	Baixo	Baixo
20a	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
20b	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
20c	Baixo	Baixo	Alto	Baixo
21a	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
21b	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
21c	Baixo	Baixo	Alto	Baixo
24a	Alto	Alto	Baixo	Médio
24b	Alto	Alto	Baixo	Médio
24c	Alto	Alto	Baixo	Médio
24d	Alto	Alto	Baixo	Médio
27a	Alto	Alto	Baixo	Médio
27b	Alto	Alto	Baixo	Médio
27c	Alto	Alto	Baixo	Médio
Nitrofurazona	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
Nitromidazol	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo

Na **tabela 8** constam os valores teóricos de druglikeness e drugscore. O índice druglikeness indica se a substância tem potencial para se tornar um fármaco (valor positivo). Já o índice drugscore combina os dados calculados pelo Osiris (druglikeness, lipofilia, solubilidade, peso molecular, toxicidade) e permite avaliar se um composto tem

potencial como futura fármaco. Quanto mais próximo o valor estiver de 1, maior será a probabilidade de sucesso (Afonso, 2008; Tonin, 2009).

Tabela 8 Valores de druglikeness e drugscore calculados por Osiris® Property Explorer

Composto	Druglikeness	Drugscore
15a	-18,99	0,39
15b	-18,76	0,18
15c	-17,78	0,35
16a	1,32	0,87
16b	-16,33	0,36
16c	2,57	0,92
17a	1,16	0,30
17b	-16,5	0,10
17c	2,42	0,31
20a	-5,36	0,49
20b	-21,54	0,39
20c	-6,54	0,29
21a	-3,37	0,51
21b	-19,52	0,38
21c	-5,56	0,29
24a	1,06	0,25
24b	-16,3	0,12
24c	-0,98	0,18
24d		
27a	2,82	0,27
27b	-16,22	0,13
27c	2,80	0,27
Nitrofurazona	6,66	0,86
Nitromidazol	2,54	0,94

Os valores de druglikeness variaram de -21,54 a 2,82. Somente sete entre os compostos planejados apresentaram valores positivos. Os valores de drugscore variaram de 0,12 a 0,98. Somente dois compostos, 16a e 16c apresentaram valores próximos de 1 (0,87 e 0,92,

respectivamente), aparecendo como os melhores candidatos para se tornarem fármacos. Esses dois compostos não apresentaram atividade antibacteriana significativa, e deveriam ser testados para outras atividades biológicas.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Métodos gerais

REAGENTES

-Os reagentes utilizados para a síntese dos compostos bem como os solventes P.A. utilizados na purificação são das marcas: Merck, Vetec e Sigma Aldrich. O solvente anidro (metanol) foi obtido por destilação.

TRATAMENTO DO SOLVENTE:

-Metanol (MeOH): em um balão de 2L adaptado a uma montagem de destilação vertical combinou-se 2,0 g de magnésio em pó, 0,3 g de iodo e 17,0 mL de solvente. A mistura foi refluxada até a dissolução de todo o magnésio e o desaparecimento da coloração do iodo. Em seguida, completou-se o volume do solvente para 1,0 L e efetuou-se o refluxo por várias horas, posteriormente o solvente recuperado em um frasco seco contendo peneiras molecular 4Å.

CROMATOGRAFIA

- Para cromatografia em coluna foi utilizada sílica gel 60G 0,063-0,2 m (70-230mesh), Merck.
- Para cromatografia em camada delgada foi utilizada sílica gel G Merck com fluoresceína em lâmina de vidro.
- Em algumas reações foram empregadas placas de cromatofolhas de alumínio revestidas com sílica gel, para o acompanhamento das reações, avaliação do grau de pureza dos compostos sintetizados e purificação.
- Os eluentes empregados foram descritos na discussão dos resultados e também serão apresentados nos procedimentos.
- Foram utilizados lâmpada de ultravioleta (UV) e vapores de iodo para visualizar a CCD.

MICRO-ONDAS

-O aquecimento por irradiação de micro-ondas das reações desenvolvidas neste trabalho foi realizado em um reator CEM, modelo 908005, de potência máxima 300W e alimentação de 120V.

FAIXA DE FUSÃO

-As faixas de temperatura de fusão ou decomposição foram determinadas em um aparelho digital MQAPF-Microquímica, no Departamento de Química da UFJF.

ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

-Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Bomem FT IR MB-102, no Departamento de Química da UFJF. Estes foram realizados na região de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} utilizando pastilhas de KBr previamente dessecada a 500°C .

ESPECTROS DE RMN DE ^1H E ^{13}C

-Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos dissolvendo-se os compostos em CDCl_3 e $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ em espectrômetro Bruker Advance DRX 300 MHz para os espectros de RMN de ^1H 75 MHz para os espectros de ^{13}C no Departamento de Química da UFJF. Os valores de deslocamento químico (δ) são referidos em partes por milhão (ppm), e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As áreas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como:

s = simpleto; d = duplete; t = triplete; q = quinteto; dd = duplete duplo; m = multiplete.

CÁLCULO DE COEFICIENTE DE PARTIÇÃO:

- Os valores de log P foram obtidos a partir do simulador ChemDraw 8.0, versão 2003.

SOFTWARE TESTE "IN SILICIO"

- Foi utilizado o programa Osiris Property Explorer, disponível em <http://www.organic-chemistry.org>, para prever os efeitos de toxicidade das substâncias sintetizadas.

-Para prever parâmetros relacionados à biodisponibilidade oral. Utilizou-se neste estudo o programa computacional *Molinspiration online property calculation toolkit*, disponível em <http://www.molinspiration.com>.

PESQUISAS BIBLIOGRÁFICAS

- Foi utilizado o banco de dados conectado à internet Scifinder fornecendo informações através do acesso a artigos e patentes.

5.2. Procedimento geral para as sínteses

5.2.1. Síntese do *p*-octiloxibenzaldeído (11)

Em um balão de 25,00 mL foram adicionados 2,00 g (0,016mol) de *p*-hidroxibenzaldeído e 4,423 g (0,032 mol) de carbonato de potássio em 8,00 mL de dimetilformamida. O meio reacional foi mantido sob refluxo e agitação magnética por 1h. Em seguida, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e foram adicionados 3,568g (0,024mol) de cloreto de octila e 0,943g (0,008mol) de brometo de potássio. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 3h. Após este período deixou-se sob refluxo e agitação por duas horas quando foi observado o fim da reação por CCD (eluente: hexano/AcOEt 6/4 v/v; revelador: UV). Com o término da reação o carbonato de potássio e o cloreto de potássio foram separados por filtração e o volume de solvente foi reduzido por destilação sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O resíduo obtido foi submetido à extração líquido-líquido em éter e água sucessivas vezes e a fase orgânica foi concentrada sob vácuo. (91 % de rendimento – 3,480 g). Verificou-se por CCD (eluente: hexano/AcOEt 6/4 v/v; revelador: UV) que o produto desejado encontrava-se com grau de pureza satisfatório, não necessitando de purificação.

5.3. Procedimento geral para reação de aminação reductiva:

Ao aldeído aromático dissolvido em metanol anidro (5,00 mL) foram adicionados 1 equivalente de aminoálcool ou octilamina e 1 g de sulfato de sódio anidro, sob agitação e resfriamento em banho de gelo. Já que o processo ocorre acompanhado por liberação de calor. O meio reacional foi mantido por quatro horas, quando foi observado o término da reação por CCD (eluente: CH₂Cl₂; revelador: iodo e UV). Em seguida, dois equivalentes de borohidreto de sódio (NaBH₄) foram lentamente adicionados. Manteve-se a mistura sob agitação magnética a temperatura ambiente. Acompanhou-se a reação por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9/1 v/v; revelador: iodo e UV). Ao observar o fim da reação o agente secante foi removido por filtração e evaporou-se o metanol. O material obtido foi submetido à extração com CH₂Cl₂ e solução aquosa (%) de NH₄Cl. Concentrou-se a fase orgânica sob

pressão reduzida. O produto foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica utilizando um gradiente de CH₂Cl₂ e MeOH ou através de recristalização em acetona.

Para a síntese dos derivados heterociclos (**20 a-c** e **21 a-c**), seguiu-se procedimento descrito acima, porém após a extração os compostos encontraram-se na fase aquosa. Essa foi evaporada sob pressão reduzida. O composto de interesse foi obtido após purificação em coluna cromatográfica utilizando um gradiente de CH₂Cl₂ e MeOH.

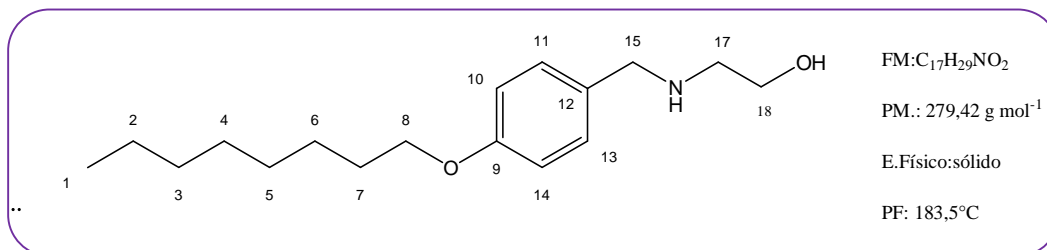
As quantidades dos compostos desejados; de cada aldeído, amina ou aminoálcool utilizados na síntese estão descritas na Tabela 11, bem como o rendimento obtido em cada reação.

Tabela 9 Estequiometria das reações de aminação reductiva

Composto	Fórmula Molecular	Aldeído	Amina/ Aminoálcool	Rendimento (%)
15a	C ₁₇ H ₂₉ NO ₂	1,68 mmol	1,68 mmol	48,9
15b	C ₂₃ H ₄₁ NO	1,68 mmol	1,68 mmol	49,5
15c	C ₁₉ H ₃₃ NO ₂	1,68 mmol	1,68 mmol	58,1
16a	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	2,21 mmol	2,21 mmol	83,6
16b	C ₁₆ H ₂₇ NO	2,21 mmol	2,21 mmol	47,0
16c	C ₁₂ H ₁₉ NO ₂	2,21 mmol	2,21 mmol	86,4
17a	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₃	2,65 mmol	2,65 mmol	63,0
17b	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	2,65 mmol	2,65 mmol	76,1
17c	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₃	2,65 mmol	2,65 mmol	61,0
20a	C ₈ H ₁₂ N ₂ O	1,87 mmol	1,87 mmol	79,3
20b	C ₁₄ H ₂₄ N ₂	1,87 mmol	1,87 mmol	85,7
20c	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O	1,87 mmol	1,87 mmol	83,2
21a	C ₈ H ₁₂ N ₂ O	1,87 mmol	1,87 mmol	80,5
21b	C ₁₄ H ₂₄ N ₂	1,87 mmol	1,87 mmol	85,4
21c	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O	1,87 mmol	1,87 mmol	87,3

5.3.1. Caracterização das substâncias obtidas por aminação reductiva

2-[(4-octiloxibenzilamino)etanol] 15a (Almeida *et al.*, 2011)

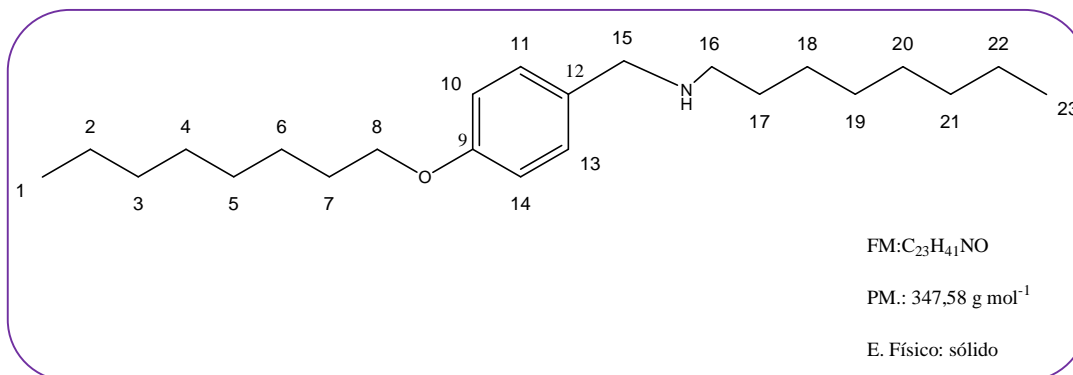


RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ 7,26), δ (ppm): 0,86 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, H₁); 1,28 – 1,44 (m, 10H, H₂₋₆); 1,77 (m, 2H, H₇); 2,77 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H, H₁₇); 3,65 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H, H₁₈); 3,90 (s, 2H, H₈); 3,93 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, H₈); 6,83 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H₁₀ e H₁₄); 7,23 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H, H₁₁ e H₁₃).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ δ 77,0), δ (ppm): 14,3 (C₁); 22,8 – 32,0 (C₂₋₇); 50,4 (C₁₇); 52,9 (C₁₅); 60,7 (C₁₈); 68,2 (C₈); 114,9 (C₁₀ e C₁₄); 129,7 (C₁₁ e C₁₃); 131,1 (C₁₂); 158,7 (C₉).

IV KBr ν (cm⁻¹): 3336 (def. axial, O-H); 3229 (def. axial, N-H), 2924 (def. axial, C-H_{arom.}); 2861 (def. axial, C-H_{alif.}); 1263 (def. axial, C-N); 1183 (def. axial, C-O).

N-[(4-octiloxi)benzil]octilamina 15b (Almeida *et al.*, 2011)

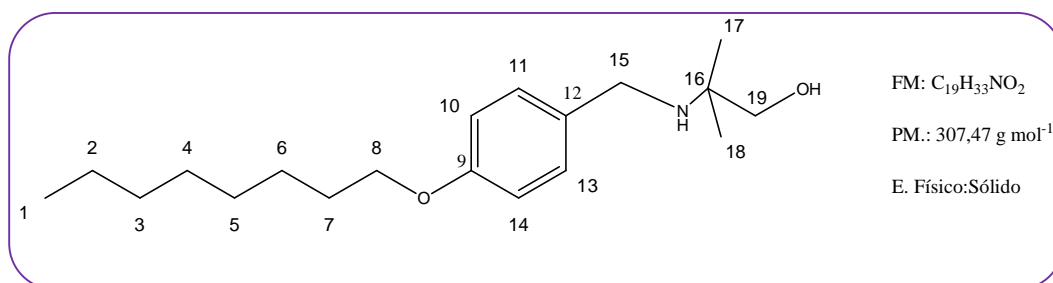


RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ 7,26), δ (ppm): 0,88 (sl, 6H, H₁ e H₂₃); 1,24-1,74 (m, 26H, H₂₋₇ e H₁₇₋₂₂); 2,67 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H, H₁₆); 3,89 (m, 4H, H₈ e H₁₅); 6,88 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H, H₁₀ e C₁₄); 7,38 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H, H₁₁ e H₁₃).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 δ 77,0), δ (ppm): 14,3 (C_1 e C_{23}); 22,8–32,0 (C_{2-7} e C_{17-22}); 47,3 (C_{16}); 51,4 (C_{15}); 68,2 (C_8); 114,9 (C_{10} e C_{14}); 131,1 (C_{11} e C_{13}); 159,5 (C_9).

IV KBr ν (cm^{-1}): 3148 (def. axial, N-H), 2933 (def. axial, C-H); 2861 (def. axial, C-H); 1254 (def. axial, C-N); 1183 (def. axial, C-O).

***N*-((4-octiloxi)benzilamino)2-metilpropanol 15c (Almeida *et al.*, 2011)**

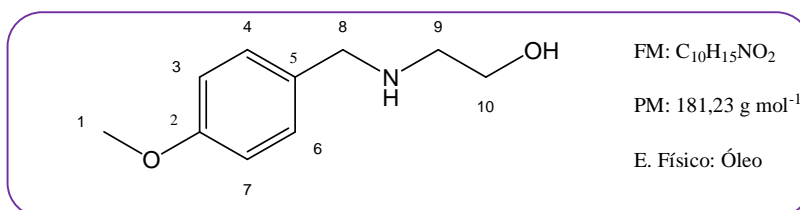


RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ 7,26), δ (ppm): 0,87 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H, H_1); 1,30 (sl, 16H, H_{2-6} e H_{17-18}); 1,72 (m, 4H, H_7); 3,51 (s, 2H, H_{19}); 3,84 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, H_8); 3,92 (s, 2H, H_{15}); 6,83 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H_{10} e H_{14}); 7,50 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H_{11} e H_{13}).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 δ 77,0), δ (ppm): 13,8 (C_1); 20,8 (C_{17} e C_{18}); 22,4–31,6 (C_{2-6}); 45,3 (C_{15}); 67,7 (C_{16}); 114,5 (C_{10} e C_{14}); 128,4 (C_{10} e C_{14}); 131,87 (C_{11} e C_{13}); 159,6 (C_9).

IV KBr ν (cm^{-1}): 3200 (def. axial, O-H), 3368 (def. axial, N-H), 2967 (def. axial de aromático, C-H), 2926 (def. axial de alifática, C-H), 1522 (def. angular, N-H), 1262 (def. axial de éter).

***N*-(4-metoxibenzilamino)etanol 16a (McCalmont *et al.*, 2005)**

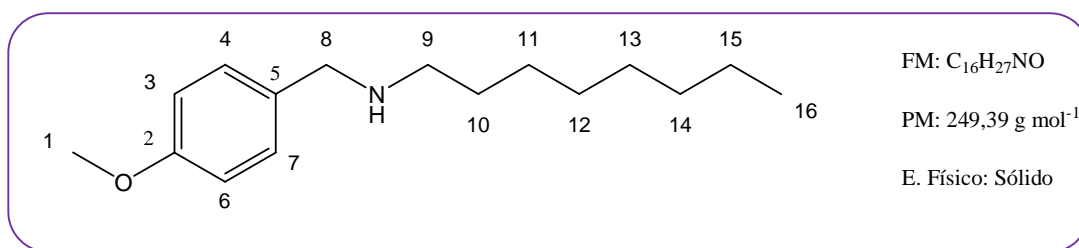


RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ 7,26), δ (ppm): 2,70 (t, $J = 5,2$ Hz, 3H, H_9); 3,65 (t, $J = 5,2$ Hz, 2H, H_{10}); 3,69 (s, 2H, H_8); 3,74 (s, 3H, H_1); 6,80 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H_3 e H_7); 7,20 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H_4 e H_6).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ 77,0), δ (ppm): 50,1 (C_9); 52,8 (C_8); 55,4 (C_1); 60,7 (C_{10}); 114,1 (C_3 e C_7); 129,7 (C_4 e C_6); 131,4 (C_5); 159,0 (C_2).

IV KBr ν (cm^{-1}): 3332 (def. axial, O-H), 2937 (def. axial, C-H_{arom}), 2831 (def. axial, C-H_{alif}), 1508 (def. angular, N-H) e 1256 (def. axial, C-N).

***N*-(4-metoxibenzil)octilamina 16b (Alonso *et al.*, 2008)**

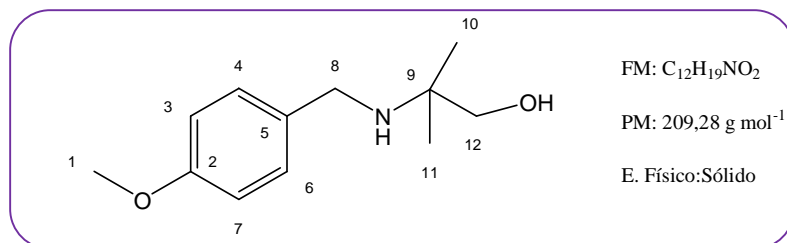


RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ 7,26), δ (ppm): 0,81 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, H_{16}); 1,18 (sl, 14H, H_{10-15}); 2,69 (sl, 2H, H_9); 3,71 (s, 3H, H_1); 3,91 (s, 2H, H_8); 6,87 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H_3 e H_6), 7,49 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, H_4 e H_7).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ 77,0), δ (ppm): 14,1 (C_{16}); 22,2–31,3 (C_{10-15}); 46,6 (C_9); 49,7 (C_8); 55,4 (C_1); 114,2 (C_3 e C_6); 124,2 (C_5); 131,7 (C_4 e C_7); 159,8 (C_2).

IV KBr ν (cm^{-1}): 2961 (def. axial, C-H_{arom}), 2921 (def. axial, C-H_{alif}), 1520 (def. angular, N-H), 1344 (def. angular, $-\text{CH}_3$), 1262 (def. axial de ésteres).

***N*-(4-metoxibenzilamino)-2-metilpropanol 16c (Francis *et al.*, 2008)**

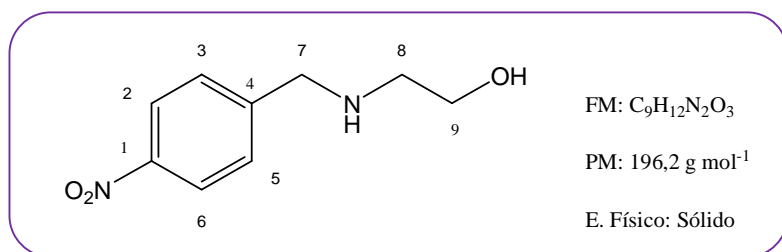


RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ 7,26), δ (ppm): 1,15 (s, H_{11} e H_{12} 6H); 3,39 (s, 2H); 3,81 (s, H_8 , 2H); 7,54 (d, 2H arom, $J = 8,7$ Hz, H_4 e H_6 , 2H); 8,19 (d, 2H arom, $J = 8,7$, H_3 e H_7).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 δ 77,0), δ (ppm): 23,9 (C_{11} e C_{12}); 45,6 (C_8); 54,0 (C_{10}); 68,4 (C_{13}); 123,4 (C_3 e C_7); 128,5 (C_4 e C_6); 148,4 (C_5).

IV KBr ν (cm^{-1}): 3381 (def. axial, O-H), 3270 (def. axial, N-H), 2971 (def. axial, C- H_{arom}), 2857 (def. axial, C- H_{alif}), 1520 (def. angular, N-H) e 1247 (def. axial, C-N).

N-(4-Nitrobenzilamino)etanol 17a (Sato et al., 2008)

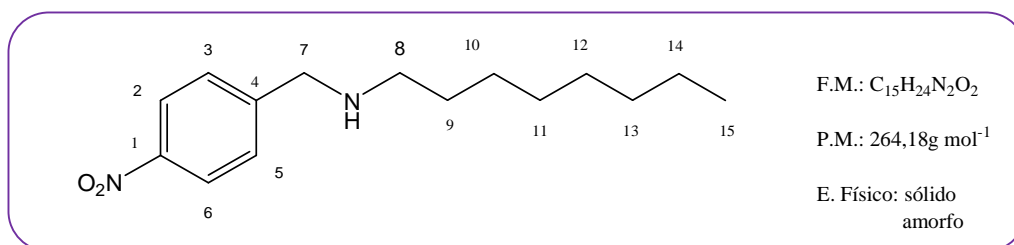


RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ 7,26), δ (ppm): 2,80 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, H_8); 3,69 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, H_9); 3,99 (s, 2H, H_7); 7,63 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H_3 e H_5); 8,21 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H_2 e H_6).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 δ 77,0), δ (ppm): 51,7 (C_8); 53,1 (C_7); 61,0 (C_9); 124,7 (C_3 e C_5); 130,8 (C_2 e C_6); 147,2 (C_4); 148,9 (C_1).

IV KBr ν (cm^{-1}): 3277 (def. axial, C- H_{arom}), 2839 (def. axial, C- H_{alif}), 1513 (def. angular, N-H), 1602 e 1339 (def. angular, NO_2).

N-(4-nitrobenzil)octilamina 17b

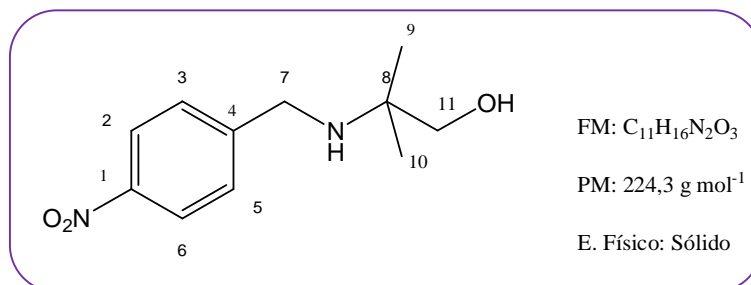


RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ 7,26), δ (ppm): 0,86 (t, $J = 6,81$ Hz, 2H, H_{15}); 1,27–1,51 (m, 12H, H_{9-14}); 2,62 (t, $J =$ Hz, 2H, H_9); 3,90 (s, 2H, H_7); 7,52 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H_3 e H_5); 8,19 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H_2 e H_6).

RMN de ^{13}C ((75 MHz, CDCl_3 , δ 77,0), δ (ppm): 14,7 (C_{15}), 23,2 – 32,4 (C_{9-14}), 50,2 (C_8), 53,8 (C_7), 124,2 - 148,9 (C_{1-6}).

IV KBr ν (cm^{-1}): 2928 (def. axial, C-H_{arom}), 2857 (def. axial, C-H_{alif}), 1520 (def. angular, N-H), 1350 (def. angular, NO_2).

5.3.9 *N*-(4-Nitrobenzilamino)-2-metilpropanol 17c

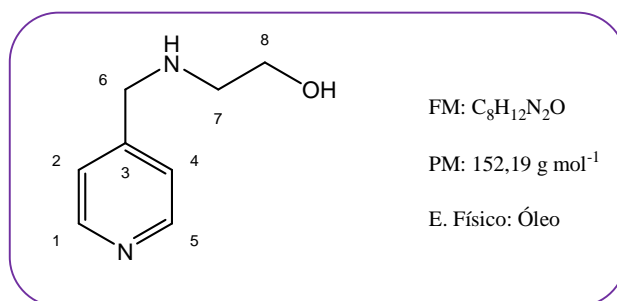


RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ 7,26), δ (ppm): 1,16 (s, 6H, H_9 e H_{10}); 3,39 (s, 2H, H_{11}); 3,81 (s, 2H, H_7); 7,54 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H_3 e H_5); 8,19 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H_2 e H_6).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ 77,0), δ (ppm): 23,9 (C_9 e C_{10}), 45,7 (C_7), 54,0 (C_8), 68,4 (C_{11}), 123,4 (C_3 e C_5), 128,5 (C_2 e C_6), 147,2 (C_4) e 148,4 (C_1).

IV KBr ν (cm^{-1}): 2961 (def. axial, C-H_{arom}), 2928 (def. axial, C-H_{alif}), 1520 (def. angular, N-H), 1350 (def. angular, NO_2) e 1265 (def. axial, C-N).

N-(4-Piridilmetilamino)etanol 20a

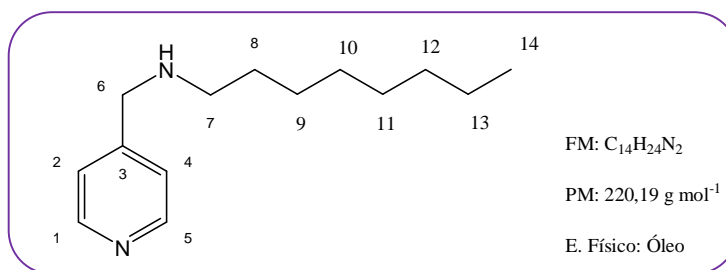


RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ 7,26), δ (ppm): 2,78 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H, H_7); 3,69 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H, H_8); 3,82 (s, 2H, H_6); 7,24 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H, H_2 e H_4); 8,49 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H, H_1 e H_5).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 δ 77,0), δ (ppm): 51,8 (C_7), 53,9 (C_6), 60,4 (C_8), 121,8 (C_2 e 4), 148,9 (C_3), 159,1 (C_1 e 5).

IV KBr ν (cm^{-1}): 3303 (def. axial, N-H), 2942 (def. axial de aromático, C-H), 2855 (def. axial de alifático, C-H).

N-(4-Piridilmetil)octilamina 20b

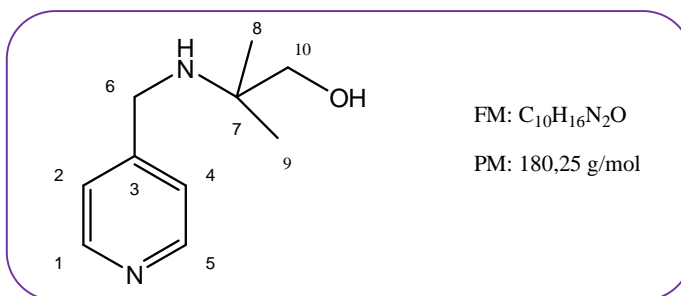


RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ 7,26), δ (ppm): 0,81 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H, H_{14}); 1,21 (sl, 10H, H_{9-13}); 1,48 (m, 2H, H_8); 2,58 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H, H_7); 3,84 (s, 2H, H_6); 7,25 (d, $J = 5,4$ Hz, 2H, H_2 e H_4); 8,48 (d, $J = 5,4$ Hz, 2H, H_1 e H_5).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 δ 77,0), δ (ppm): 14,2 (C_{14}); 22,7 – 31,9 (C_{8-13}); 49,8 (C_7); 55,4 (C_6); 122,0 (C_2 e C_4); 149,41 (C_3), 159,9 (C_1 e C_5).

IV KBr ν (cm^{-1}): 3318 (def. axial, N-H), 2938 (def. axial de aromático, C-H), 2850 (def. axial de alifático, C-H).

N-(4-piridilmetilamino)-2-dimetiletanol 20c

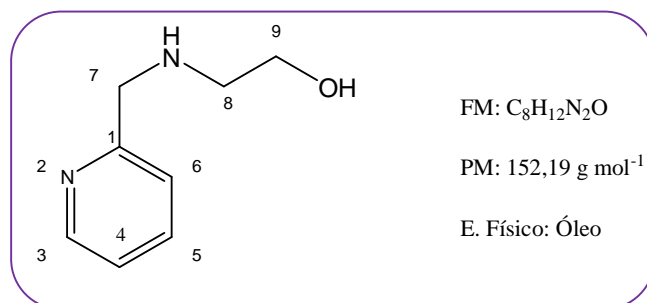


RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ 7,26), δ (ppm): 1,12 (s, 6H, H_{8 e 9}); 3,37 (s, 2H, H₁₀); 3,69 (s, 6H, H₆); 7,26 (m, H_{2 e 4}); 8,47 (d, J = 4,2 Hz, 2H, H_{1 e 5});

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ δ 77,0), δ (ppm): 23,7 (C_{8 e 9}); 45,1 (C₆); 53,9 (C₇); 68,3 (C₃); 122,8 (C_{2 e 4}); 149,4 (C_{1 e 5}).

IV KBr v (cm⁻¹): sobreposição de bandas referentes as deformações axiais N-H e O-H, 2917 (def. axial de aromático, C-H), 2855 (def. axial de alifático, C-H).

N-(2-Piridilmetilamino)etanol 21a

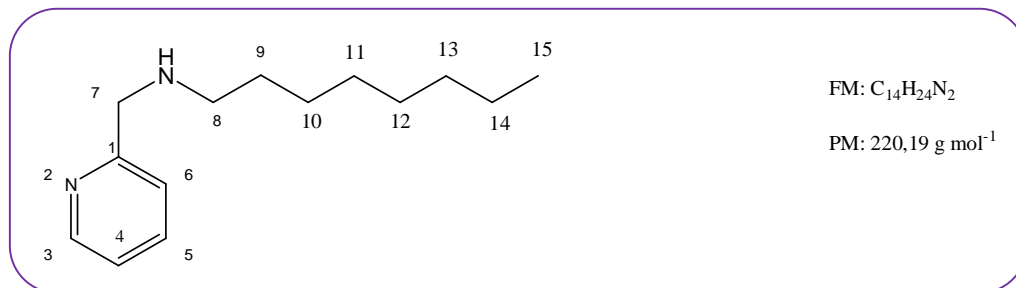


RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ 7,26), δ (ppm): δ 2,77 (t, J = 5,3 Hz, 2H, H₈); 3,62 (t, J = 5,3 Hz, 2H, H₉); 3,88 (s, 2H, H₇), 7,10 (m, 1H, H₄); 7,12 (d, J = 7,4 Hz, 1H, H₆); 7,59 (d, J = 7,4 Hz, 1H, H₅); 8,49 (d, J = 4,8 Hz, 1H, H₃).

RMN de ¹³C: (75 MHz, CDCl₃ δ 77,0), δ (ppm): 50,8 (C₈), 54,0 (C₇), 60,5 (C₉), 121,8 (C₄), 136,4 (C₅), 148,9 (C₃), 159,1 (C₁).

IV KBr v (cm⁻¹): 3318 (def. axial, N-H), 2929 (def. axial de aromático, C-H), 2849 (def. axial de alifático, C-H).

***N*-(2-piridilmetil)octilamina 21b**

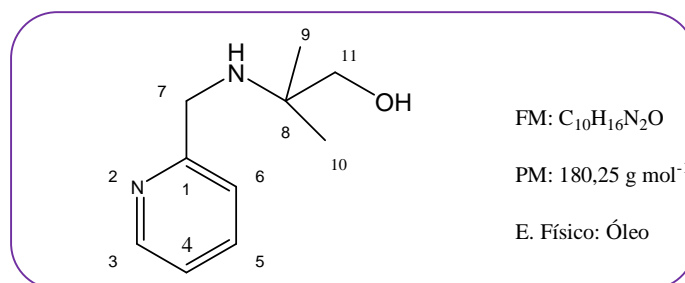


RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ 7,26), δ (ppm): δ 0,81 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, H₁₅); 1,21–1,49 (m, 12H, H₉₋₁₄); 2,58 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, H₈); 3,84 (s, 2H, H₇); 7,07–8,49 (m, 4H, H₃₋₆).

RMN de ¹³C: (75 MHz, CDCl₃ δ 77,0), δ (ppm): 14,2 (C₁₅), 22,8 – 31,9 (C₉₋₁₄), 49,8 (C₈), 88,4 (C₇), 122,3 (C_{4 e 6}), 136,5 (C₅), 148,9 (C₃), 159,1 (C₁).

IV KBr ν (cm⁻¹): 3349 (def. axial, N-H), 2917 (def. axial de aromático, C-H), 2851 (def. axial de alifático, C-H).

***N*-(4-piridilmetilamino)-2-metilpropanol 21c**



RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ 7,26) δ (ppm): 1,11 (s, H_{9 e 10}, 6H); 3,34 (s, 2H, H₁₁); 3,83 (s, 9H, H₇); 7,12 (m, 1H, H₄); 7,16 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, H₆); 7,59 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H, H₅); 8,48 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H, H₃).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ δ 77,0) δ (ppm): 24,4 (C_{9 e 10}); 47,7 (C₇); 54,6 (C₈); 68,3 (C₁₁); 122,3 (C_{4 e 6}); 137,0 (C₅), 149,2 (C₃), 160,4 (C₁).

IV KBr ν (cm⁻¹): 3291 (def. axial, N-H), 2973 (def. axial de aromático, C-H), 2867 (def. axial de alifático, C-H).

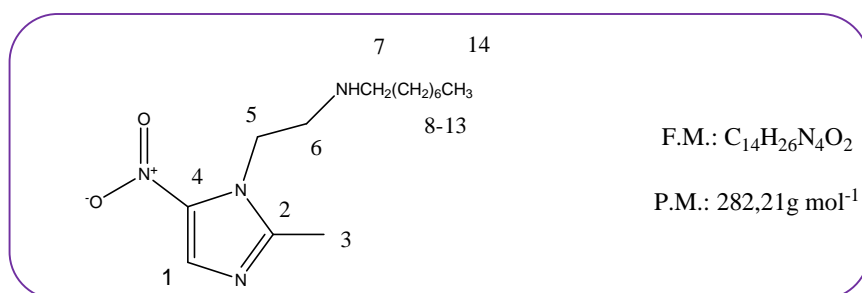
5.4. Síntese dos derivados do metronidazol

5.4.1. Procedimento geral para a síntese de 24b e 24c

Ao mesilmetronidazol **23** dissolvido em DMF (5,00 mL), foram adicionados três equivalentes de amina ou aminoálcool. Manteve-se a mistura sob agitação magnética a 100 °C e irradiação de 150 W por 90 minutos. Acompanhou-se a reação por CCD (eluente: CH₂Cl₂ / MeOH 9/1; revelador: UV e vapores de iodo). O material obtido foi submetido à extração líquido-líquido com CH₂Cl₂ e água. Concentrou-se a fase orgânica sob pressão reduzida. O produto foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica utilizando (CH₂Cl₂ e MeOH).

5.4.2. Caracterização dos derivados metronidazólicos

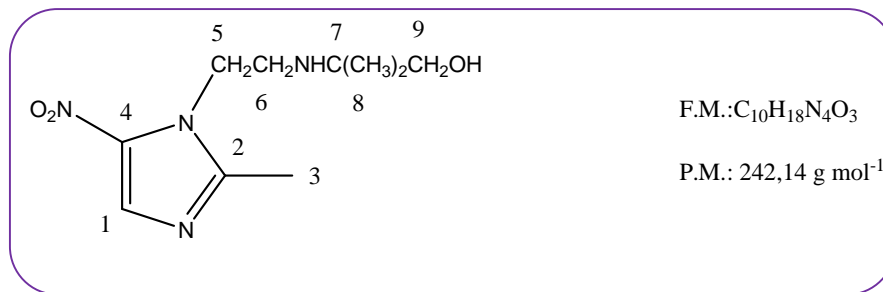
N-[2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil]octan-1-amina 24b



RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ 7,26) δ (ppm): 0,81 (t, J = 6,5 Hz, H₁₄, 3H); 1,20–1,41 (m, 12H, H₈₋₁₃); 2,48 (s, 3H, H₃); 2,58 (t, J = 5,28 Hz, 2H, H₇); 2,95 (t, J = 7,9 Hz, 1H, H₆); 4,39 (m, 2H, H₅); 7,9 (s, 1H, H₁).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃ δ 77,0) δ (ppm): 13,8 (C₁₄); 22,3–48,7 (C₈₋₁₃); 49,6 (C₆); 132,7 (C₁); 141,3 (C₄) 150,1 (C₂).

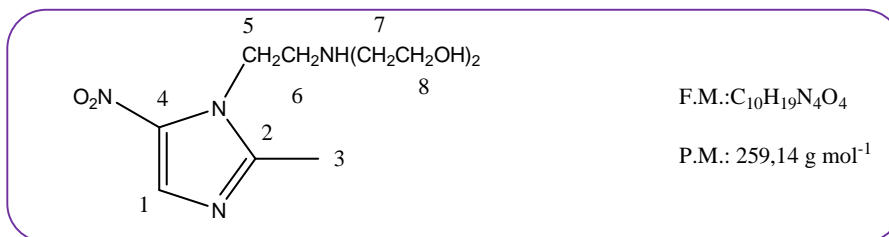
2-(2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etilamino)-2-metilpropan-1-ol 24c



RMN de ¹H : (300 MHz, CDCl₃): δ 0,84 (s, 3H, H₃); 2,47 (s, 6H, H_{8 e 8'}); 2,87 (t, 3H, H₆); 3,17 (s, 2H, H₉); 4,33 (m, 2H, H₅); 7,81 (s, 1H, H₁).

RMN de ¹³C: (75 MHz, CDCl₃ δ 77,0): δ 14,7 (C₃), 24,0 (C_{8 e 8'}), 29,9 (C₅), 42,6 (C₆), 54,4 (C₇), 69,5 (C₉), 122,8 (C₁), 149,4 (C₂).

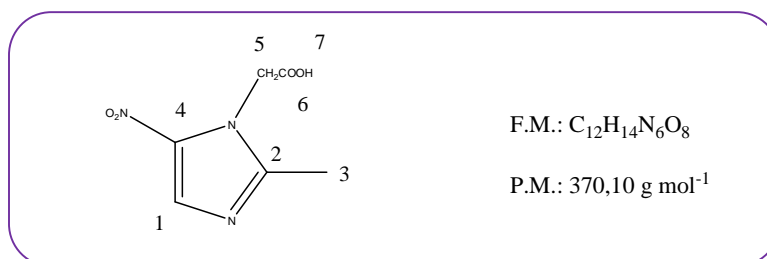
8-(2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etilamino)octan-1-ol 24d



RMN ¹H : (300 MHz, CDCl₃, δ 7,26): δ 2,43 (s, H₃, 3H); 2,63 (sl, 4H, H₇); 2,79 (sl, 2H, H₆); 3,57 (m, 1H, H₈); 3,95 (sl, 2H, H₅); 7,81 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C: (75 MHz, CDCl₃ δ 77,0): δ 14,7 (C₃), 24,7 (C₅), 54,3 (C₆), 58,9 (C₇), 60,3 (C₈) 133,1 (C₁), 140,9 (C₄), 148,9 (C₂).

5.4.3. Procedimento geral para a síntese do ácido 2-(2-metil-5-nitro-1H-il)acético 25



A 2,00 g de metronidazol foram dissolvidos em solução de 1,78 g de dicromato de sódio solubilizados em 8,50 mL de água destilada, seguida de adição lenta de 3,60 mL de solução de ácido sulfúrico, 50%. O meio reacional permaneceu em agitação magnética por 18 h, sendo neutralizada após este período com solução de hidróxido de sódio (4 molL⁻¹). A mistura foi submetida a extração (Acetato de etila/THF 1:1 v/v). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio e evaporado sob pressão reduzida. O precipitado formado foi recristalizado em diclorometano. Obtendo assim, o composto **25** com 58,0 % de rendimento.

RMN de ¹H: (300 MHz, CDCl₃, δ 7,26): δ 2,54 (s, H₃, 3H); 5,12 (s, 2H, H₅); 8,10 (s, H₁, 1H).

RMN de ¹³C: (75 MHz, CDCl₃, δ 77,0): δ 14,8 (C₃), 48,1 (C₅), 132,1 (C₁), 141,3 (C₄), 150,1 (C₂), 178,1 (C₆).

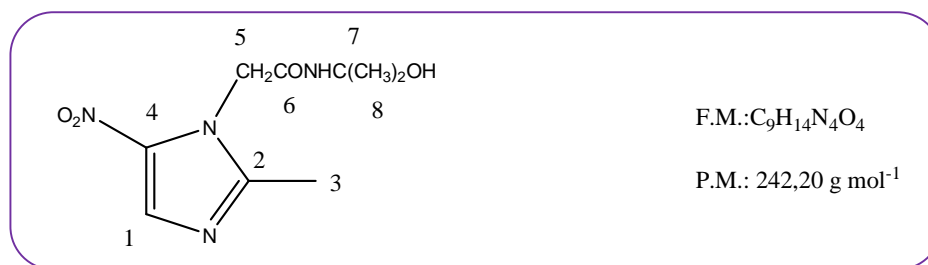
5.4.4. Procedimento geral para a síntese do 2-(2-metil-5-nitro-1H-il)acetato de metila **26 (Mirzaei *et al.*, 2007)**

O ácido carboxílico **25** (1,25 g, 6,76 mmol) foi solubilizado em cloreto de tionila (4,00 mL) e refluxado por 2 horas. A mistura foi concentrada sob pressão reduzida, o resíduo foi solubilizado em metanol e refluxado por 1 hora. Após evaporar o solvente, a mistura foi neutralizada com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio e extraída com diclorometano. A fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida. O sólido branco obtido foi recristalizado em água.

Ponto de fusão: Obtido: 138,2-141°C, Literatura: 139-140°C

5.5 Procedimento geral e caracterização de amida derivada do metronidazol

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 0,20 g do éster **26** em 5,00 mL de metanol, sendo mantidos sob agitação magnética e refluxo. O meio reacional foi mantido por quatro horas, quando foi observado o término da reação por CCD (eluente: AcOH/Metanol, 8/2 v/v; revelador: UV). Concentrou-se a fase orgânica sob pressão reduzida. O material obtido foi submetido à extração com CH₂Cl₂. O produto foi purificado através de placas de cromatofolhas de alumínio revestidas com sílica gel.



RMN ¹H: (300 MHz, CDCl₃, δ 7,26): δ 1,21 (s, H₈, 3H); 1,28 (s, H₈, 3H) 2,47 (s, 3H, H₃); 4,83 (s, 2H, H₅); 7,93 (s, H₁, 1H).

RMN ¹³C: (75 MHz, CDCl₃ δ 77,0): δ 14,8 (C₃), 24,7 (C₈), 30,3 (C₅), 69,9 (C₉), 133,1 (C₁), 140,9 (C₄), 148,9 (C₂), 165,8 (C₆).

5.6. Procedimento geral para realização dos testes biológicos:

5.6.1. Teste halo de inibição

A avaliação de sensibilidade antimicrobiana dos diferentes compostos sintetizados contra cepas de bactérias selecionadas para este estudo foi determinada usando método de difusão em Agar previamente descrito (Alviano *et al.*, 2008).

Preparo meio de cultura

Utilizou-se Tryptic Soy Agar (TSA- Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) para preparar o meio de cultura que foi mantido por 25 minutos na autoclave. Despejou-se 35,00 mL do meio preparado em placas de petri. Após esfriamento do meio a temperatura ambiente, foi conservado em geladeira por 24h.

Preparo do inoculo bacteriano:

Os inóculos bacterianos foram preparados em 5,00 mL de solução salina estéril (NaCl 9%), a partir de cepas bacterianas com 18-24h de crescimento.

A turvação das soluções foi ajustada na escala de turbidez 0,5 Mc Farland (10⁸ CFU/mL), realizada diluição 1:100 (aproximadamente 10⁶ CFU/mL).

Realização do ensaio biológico:

Antes de iniciar os procedimentos tomou-se o cuidado de desinfetar a capela com álcool etílico 70%. Em seguida, foram ligadas as lâmpadas de UV que foram mantidas por 15 minutos. As placas fechadas e a salina foram retiradas da geladeira cerca de vinte minutos antes de serem usadas, para que ocorresse o equilíbrio em temperatura ambiente a fim de minimizar a água de condensação. As células bacterianas foram inoculadas em Tryptic Soy Agar, utilizando a técnica Spread-plate, ou seja, cerca de 1mL de inoculo bacteriano foi disseminada em toda superfície de placa de Petri contendo Agar Mueller Hinton (MHA-Himedia Laboratories, Mumbai, Índia), com auxílio de swab. Em seguida foram incubadas em condição aeróbica a 37°C por 24h. As placas foram deixadas entre abertas a temperatura ambiente para que fossem absorvidos pelo Agar. Após 10 minutos, foram confeccionados poços equidistantes de 5 mm na superfície de Agar e 100µL da solução a ser testada (5mg mL^{-1}) foram inoculados nos mesmos. As placas foram invertidas e incubadas em condição aeróbica a 35,5 °C por 24 h e o halo de inibição avaliado após este período.

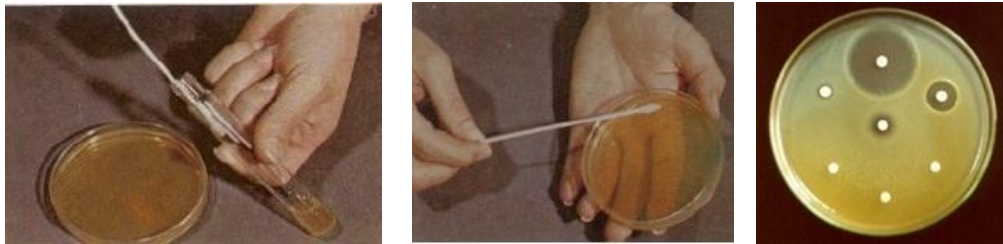


Figura 35 Procedimento ensaio biológico (halo de inibição).

Interpretando os resultados:

Após o período de incubação foi realizado a leitura das placas, sendo observado a formação de halo de inibição onde não houve o crescimento de colônias de bactérias. Os halos foram medidos em milímetros com auxílio de régua. O ensaio microbiológico foi realizado em duplicata.

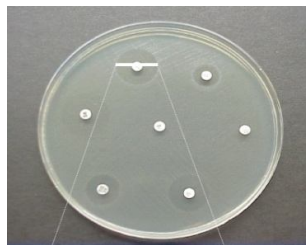


Figura 36 Medida do halo de inibição.

5.6.2. Macrodiluição em caldo (Concentração inibitória mínima)

A determinação de CIM foi realizada conforme descrito pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Utilizou-se a técnica de macrodiluição em caldo e foram avaliadas diferentes concentrações.

Preparo do meio nutriente:

A concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos selecionados foi determinada pelo método de diluição em caldo Mueller Hinton, seguindo as especificações do fabricante.

Foram pipetados 3,00 mL do meio de cultura em tubos de ensaio. Esses foram mantidos na auto-clave por 25 minutos para esterilização.

Realização do ensaio:

Após a desinfecção do local de trabalho com álcool etílico e aplicação de radiação não ionizante de luz UV, foram preparadas suspensões bacterianas ajustadas para turbidez de 0,5 McFarland com solução salina estéril (0,85% NaCl). Foram pipetados 100 µL de solução bacteriana em tubos de ensaio contendo caldo nutriente (Mueller Hinton Broth), previamente esterilizados. Diferentes concentrações do composto (2, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 256 e 512 µg/mL) em etanol foram pipetados nos tubos de ensaio contendo soluções bacterianas e meio nutriente. Também foram preparados o controle positivo e negativo. No primeiro foram pipetados 100µL de inoculo ao meio de cultura. Já no segundo controle foi pipetado apenas a solução contendo o composto a ser testado. Todos os tubos foram encubados a 35,5°C por 24h (NCCL, M7-A).

Leitura do experimento:

Os tubos foram deixados a temperatura ambiente e analisados, comparando os tubos do experimento com os controles. O efeito do composto foi observado perante a não turbidez do meio, indicando o não crescimento do microorganismo. O ensaio foi realizado em duplicata.

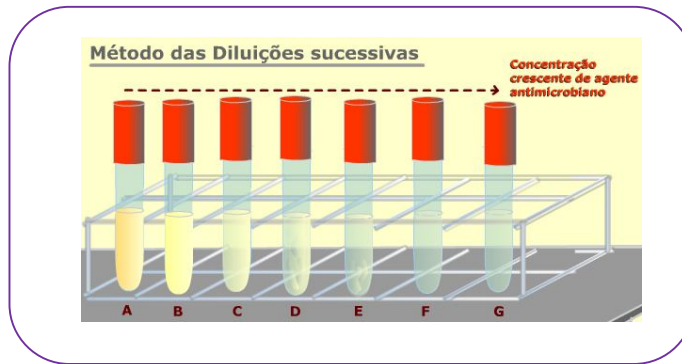


Figura 37 Método diluições sucessivas.

5.6.3 Determinação da concentração mínima bactericida

Realização do ensaio:

Foram plaqueadas com auxílio de swab em placa de Petri contendo meio nutriente, 0,1 mL de solução (duas diluições acima do CIM e duas diluições abaixo do CIM) sendo incubada em 35,5 8°C por 24 h.

Leitura do experimento:

A concentração bactericida de cada substância química, para cada estirpe bacteriana, foi considerada como a menor concentração da droga que resultou no não crescimento bacteriano.

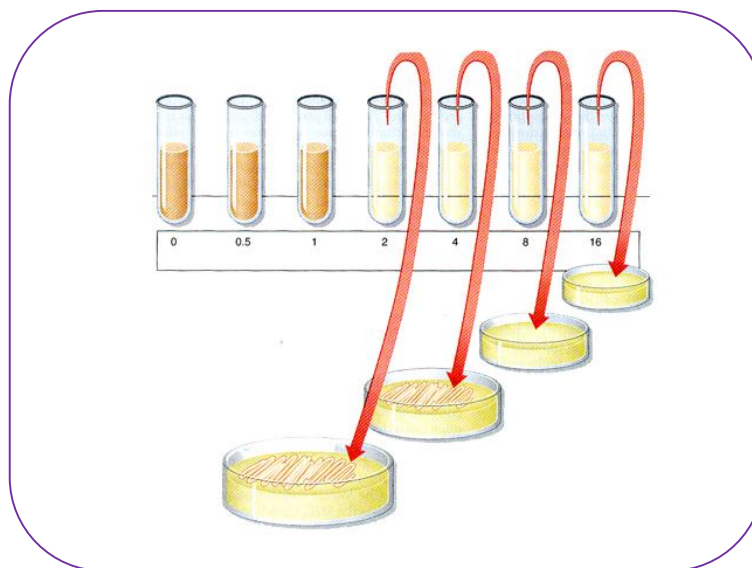


Figura 38 Procedimento determinação da concentração mínima bactericida.

O efeito do composto foi considerado bactericida quando não ocorreu crescimento bacteriano e bacteriostático quando a substância apenas apresentou o efeito de inibir o crescimento em macrodiluição em caldo.

6. CONCLUSÃO

Na primeira etapa do projeto foram obtidos os compostos **15 a-c**, **16 a-c**, **17 a-c**, **20 a-c** e **21 a-c** com rendimentos significativos (47,0 – 87,3 % - **Tabela 9**). As sínteses foram realizadas pelo método de aminação redutiva direta, utilizando metanol anidro e NaBH₄ para reduzir as iminas formadas. Os compostos foram purificados por cromatografia em camada delgada ou recristalização. Todos os compostos foram caracterizados pela análise dos espectros no IV, RMN de ¹H e de ¹³C.

Os compostos foram avaliados quanto a atividade biológica utilizando a técnica de halo de inibição contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*. Os compostos (**15 a-c**, **16b**, **17b**, **20b** e **21b**) apresentaram melhores resultados no teste de halo de inibição (**Tabela 2**), sendo selecionados para realização de ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Não foi observada mudança significativa nos resultados dos testes microbiológicos frente aos substituintes metoxi e nitro.

Os resultados do teste de Kirby-Bauer (**Tabela 2**) evidenciaram que os derivados da octilamina apresentam maiores halos de inibição frente às quatro bactérias testadas.

Os resultados também sugerem que a presença da cadeia alquila é um fator importante para a atividade biológica, já que todos os compostos possuindo a cadeia octila inibiram o crescimento bacteriana. Acredita-se que esteja relacionado ao aumento da lipofilia destes, aumentando o poder de absorção do composto sintetizado na célula bacteriana.

Na segunda parte do trabalho foram sintetizados compostos derivados do metronidazol, substância de amplo espectro de atividade. Os compostos foram obtidos a partir de substituição nucleofílica do mesilato de metronidazol, com diferentes aminoalcoóis e octilamina. A síntese utilizando irradiação de microondas foi mais eficiente na obtenção dos compostos, uma vez que propiciou reação com tempos reacionais menores e mais limpa, o que facilitou a purificação.

Os derivados metronidazólicos foram submetidos ao ensaio de halo de inibição e apenas o composto **24b**, foi efetivo para as bactérias testadas. Assim, como na primeira parte do trabalho, observou-se o composto derivado da octilamina apresentou melhor resultado nos testes biológicos. Confirmando a importância da cadeia alquila (**Tabela 2**). Mais estudos são necessários para avaliar qual o tamanho ideal da cadeia alquila e como estes compostos inibem o crescimento bacteriano.

O composto **27 c**, foi obtido a partir da oxidação do metronidazol a ácido (**25**, 58% de rendimento) utilizando K₂CrO₄/H₂SO₄, em seguida o cloreto de ácido foi sintetizado

empregando-se SOCl_2 e através deste o éster foi obtido (**26**, 46 % rendimento) que foi submetido a reação de substituição para obtenção dos compostos almejados.

Nos últimos anos, estudos *in silicio* vem sendo usados para a predição de propriedades importantes para o desenvolvimento de novos fármacos. Essas técnicas computacionais permitem um ganho econômico e ganho de tempo, já que podem permitir uma triagem das moléculas planejadas e a redução do número de testes biológicos.

Os resultados dos testes “in silicio”, obtidos pelo software Osiris Property Explorer evidenciaram que a maioria dos compostos demonstram características como candidatos a futuros protótipos, uma vez que apresentam baixos riscos de irritabilidade, Tumorigênico, mutagênico e reprodutivo. Apenas as substâncias **20c** e **21c** apresentaram risco irritante alto.

As substâncias foram avaliadas quanto a biodisponibilidade oral empregando-se o programa *Molinspiration online property calculation toolkit*, disponível em <http://www.molinspiration.com> e verificou-se que respeitam a “regra” dos cinco de Lipinski.

O desenvolvimento deste trabalho propiciou desenvolvimento do conhecimento teórico e prático em síntese orgânica, caracterização utilizando técnicas espectrométricas e realização de ensaios microbiológicos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MAGID, A. F. Reductions in organic synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, 1996, ACS Symposium Series, v. 641, p. 201-216.
- ADACHI, K.; KOHARA, T.; NAKAO, N.; ARITA, M.; CHIBA, K.; MISHINA, T.; SASAKI S.; FUJITA T. Design, synthesis, and structure-activity relationships of 2- substituted-2-amino-1,3-propanediols: discovery of a novel immunosuppressant, FTY720. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, 1995, v. 5, p. 853-856.
- ALBERT, R.; COOKE, N. G.; NUESSELEIN-HILDESHEIM, B.; WEILER, S.; *WO 2007/028821* 2007.
- ALMEIDA, C. G.; LE HYARIC, M.; DINIZ, C. G.; GARBOIS, G.; AMARAL, L. M., Relationship between structure and antibacterial activity of lipophilic *N*-acyldiamines. **Science World Journal**, 2010, v. 64, p. 287 - 290.
- ALMEIDA, M. V.; LE HYARIC, M.; AMARANTE, G.; SILVA LOURENÇO, M. C.; LIMA, M. L. Synthesis of amphiphilic galactopyranosyl diamines and amino alcohols as antitubercular agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2007, v. 42, p. 1076-1083.
- ALONSO, F.; RIENTE, P.; YUS, M. Hydrogen-Transfer Reductive Amination of Aldehydes Catalysed by Nickel Nanoparticles. **Synlett**, 2008; v. 39, n. 40, p. 1289-1292.
- ALVIANO W. S. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives Oral of Biology**, 2008, v. 53, n. 6, p. 545-552.
- ANTONIO, N. S.; OLIVEIRA, A. C.; CANESINI, R. R.; JESSÉ R. Mecanismos de resistência bacteriana. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 2009 - <http://www.revista.inf.br/veterinaria12/revisao/pdf/AnoVII-Edic12-Rev101.pdf>
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resistência microbiana mecanismos e impacto clínico. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/laboratorio2.htm> Acesso em 03/06/2012.

- ARANTES, S. F. **Comparação das duas principais rotas de obtenção do megazol**. 2007, Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutico), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, SP, 2007.
- BLOOMFIELD, S. F. Significance of biocide use and antimicrobial resistance in domiciliary environments. **Journal of Applied Microbiology**, 2002, v. 92, p. 144–157.
- BOSQUESI, P. L.; ALMEIDA, A. E.; BLAU, L.; MENEGON, R. F., SANTOS, J. L.; CHUNG, M. C. **Revista de Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, 2008, v. 29, n. 3, p. 231-238.
- BRITO D. V. D.; VON DOLINGER E. J. O.; MACHADO, F. L.; ABDALLAH V. O. S.; FILHO P. P. G. Formação de biofilme em amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de sepse relacionada a cateter vascular central em neonatos críticos Biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* samples isolated from sepsis associated with central vascular catheter (CVC) in critical neonates. **Arquivo Ciência e Saúde**, 2008, v. 14, n. 2, p. 76-80.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**. 21ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- BRUCE, P. Y. **Química Orgânica**, quarta edição, Volume 2, Rio de Janeiro, Pearson Prentice Hall, 641p.
- BUSATTI, H. G. N. O. **Investigação “in vitro” do potencial giardicida de quatro análogos do metronidazol**. 2006. 63f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Faculdade de Ciências Biológicas. UFMG, BH, 2006
- BYARUGABA. D. K. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. **International Journal of Antimicrobial Agents** 2004, 24, p. 105-110.
- CHEUNG, G. Y. C.; RIBGBY K.; WANG, R.; QUECK, S. Y.; BRAUGHTON, K. R.; WHITNEY, A. R.; TEINTZE, M.; DELEO, F. R.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* Strategies to Avoid Killing by Human Neutrophils PLoS Pathogens | www.plospathogens.org 1 October 2010, v. 6, n. 10, 1001133.

- CHIMNI, S.; SINGH, R.J. Bioreduction of a carbon–nitrogen double bond using immobilized baker's yeast—a first report. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 1998, v. 14, n. 2, p. 247-250.
- CHU, P. S.; LOPEZ, M. I.; ABRAHAM, A.; EL SAID, K. R.; PLAKAS, S. M. Residue Depletion of Nitrofurans and Their Tissue-Bound Metabolites in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) after Oral Dosing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2008, v. 56, n. 17, p. 8030-8034.
- COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS M. **Substâncias Carboniladas e Derivados**. Brookman, Artmed Editora S. A., Porto Alegre, 2003, 412p.
- CROZET M. D.; BOTTA, C. L.; GASQUET, M.; CURTI, C.; MUSAT, V. R.; HUTTER, S. B.; CHAPELLE, O.; AZAS, N.; MEO, M. D.; VANELLE, P. Lowering of 5-nitroimidazole's mutagenicity: Towards optimal antiparasitic pharmacophore, **European Journal Medicinal Chemistry**, 2009, v. 44, n. 2, p. 653–659.
- DEL OLMO, E.; MOLINA-SALINAS, G. M.; ESCARCENA, R.; ALVES, M.; LÓPEZ-PÉREZ, J. L.; HERNANDEZ-PANDO, R.; SAID-FERNÁNDEZ, S.; SAN FELICIANO, A. Simple dihydrospingosine analogues with potent activity against MDR-*Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, 2009, v. 19, n. 19, p. 5764-5768.
- DUARTE, P. D.; SANGI, D. P.; CORRÊA, A. G. Síntese de Compostos *N*-Heterociclos Empregando Micro-ondas. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 3, p. 204-213.
- ESPINAL, M. A. In: Epidemiology of multi-drug-resistant tuberculosis in low and middle-income countries. Multidrug-resistant tuberculosis. **The Netherlands: Kluwer Academic Publishers**, 2000.
- ESTEVES-SOUZA, A.; ESCHEVARRIA, A.; SANT'ANNA, C. M. R. Estudo experimental e teórico da redução de bases de Schiff derivadas da 3,3-difenilpropilamina. **Química Nova**, 2004, v. 27, n. 1, p. 72-75.

- GARCÍA-RUBIO, I.; MARTÍNEZ-CÓCERA, C.; MAGADÁN, S. S.; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, B.; CORTEZ, S. V. Hypersensitivity reactions to metronidazole. **Allergol Immunopathol**, 2006, v. 34, n. 2, p. 70 – 72.
- GARDNER, T. B.; HILL, D. R. Treatment of Giardiasis. Division of Infectious Diseases, University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut. **Clinical Microbiology Reviews**, 2001, v. 14, p. 114-128.
- GONÇALVES, P. **Síntese e caracterização de novas iminas fluorescentes e suas aplicações como sensores ópticos**. 2008. 129 f. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Porto Alegre, 2008.
- GRENGA, P. N; SUMBLER, B. L.; BELAND F.; PRIEFER R.; Reductive amination agents: Comparison or Na(CN)BH₃ and Si-CBH. **Tetrahedron Letters**, 2009, v. 50, n. 48, p. 6658-6660.
- GUIDO R. V. C; FERREIRA E. I; NASSUTE J. C; VARANDA E. A; CHUNG M. C. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofuril. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 2001; v. 22, n. 2, p. 319-333.
- GUIMARÃES, D. O. MOMESSO, L. S.; PUPO, M. Y. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e tratamento de novos agentes. **Química Nova**, 2010, v. 33, n. 3, p. 667-679.
- GUIMARÃES, N. C. **Prevalência de Pseudomonas aeruginosa resistente ao imipenem em amostras de pacientes hospitalizados na Santa Casa de Misericórdia de Goiânia-GO**. 2010. 11f. Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2010.
- GUZEN, K. P.; GUAREZEMINI, A. S.; ORFAO, A. T. G.; CELLA, R.; PEREIRA, C. M. P.; STEFANI, H. A. Eco-friendly synthesis of imines by ultrasound irradiation. **Tetrahedron Letters**, 2007, v. 48, n. 10, p. 1845-1848.
- HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends Food Science Technology**, 1994, v. 5, n. 2, p. 42-49.

- HASHIMOTO, H. Acquisition of antibiotic resistance in bacteria by alteration of molecular target, or by the decreased permeability. **Nippon Rinsho**, 1997, v. 55, n. 5, p. 1167-1172.
- IWASE, T.; UEHARA Y.; SHINJI H.; TAJIMA A.; SEO H.; TAKADA K.; AGATA, T.; MIZUNOE, Y. Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization. **Nature**; v. 465, n. 7296, p. 346-351.
- JARRAHPOUR, A. A.; SHEKARRIZ M.; TASLIMI, A.; Asymmetric Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New Mono and Bicyclic β -Lactams. **Molecules**, 2004, v. 9, n. 11, p. 939-948.
- KHABNADIDEH, S.; REZAEI, Z.; KHALAFI, N. A; MOTAZEDIAN, M. H.; ESKANDARI M. Synthesis of metronidazole derivatives as anti-giardiasis agents. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2007, v. 15, n. 1, p. 17-20.
- KOROLKOVAS, A. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1988, p.594
- KRUEGER A.; SCHULKIN J.; JONES J. L. Survey of Obstetrician-Gynecologists about Giardiasis. **Hindawi Publishing Corporation, Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, 2007, 6p.
- LI H. O.; XIAO G. P; FANG R.; ZHU H. L. The Syntheses and Crystal Structures of Metronidazole-derived Compounds. **Journal Chemistry Crystallography**, 2008, v. 38, n. 6, p. 461–466.
- LIPINSKI C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2001, v. 46, p. 3 – 26.
- LIN, J. H.; LU, A. Y. Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. **Clinical Pharmacokinetics**, 1998, v. 35, n. 5, p. 361-390.
- LOWY, F. D. Staphylococcus aureus infections. **The New England Journal of Medicine**, 1998, v. 339, n. 8, p. 520-532.

- LUO, Y.; LI, Y.; QIU, KE-MING.; LU, X.; FU, J.; ZHU, HAI-LIANG. Metronidazole acid acyl sulfonamide: A novel class of anticancer agents and potential EGFR tyrosine kinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2011, v. 19, p. 6069–6076.
- MAH, M. W.; MEMISH, Z. A. Antibiotic resistance: an impending crisis. **Saudi Medical Journal**, 2000, v. 21, n. 12, p. 1125–1129.
- MAILLARD, M.; TUCKER, J. A.; *WO 02/100820 A1* 2002.
- MARCH, J.; SMITH MICHAEL **Advanced Organic Chemistry**. 6° Edição. New Jersey: Wiley-Interscience, 2007, 2357p.
- MARTINS, C. R. F.; FERREIRA, J. A. P. DE S.; SIQUEIRA, L. F. DE G.; FERREIRA, L. A. P.; BAZZO, M. L.; FRANCHINI, M.; BERRO, O. J.; VALLE S. **Técnica de Coloração de Gram**. Brasília: Ministerio da Saúde, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, 2001, 63 p.
- MATA, P. T. G.; ABEGG, M. A. Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*. **Arquivos do Mudi**, 2007, v. 11, n. 2, p. 20-25.
- MATEUS, C. R. **Preparação de Amino Álcoois a partir de adutos de Baylis-Hillman. Aplicação na Síntese de Antibióticos de Largo Espectro**, 2004, Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Departamento de Química Orgânica, Unicamp, Campinas, 2004.
- MELO, N. F. S.; GRILLO, R., MORAES, C. M., BRITO, C. L TROSSINI, G. H. G., MENEZES, C. M. S., FERREIRA, E. I., ROSA, A. H., FRACETO, L. F. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxi-propil-ciclodextrina. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, 2007, v. 28, n. 1, p. 35-44.
- MCEWEN, S.A. E FEDORKA-CRAY, P.J. Antimicrobial Use and Resistance in Animals. **Clinical Infectious Diseases**, 2002, v. 34, n. 2, p. 93–106.
- MITAL A., ChemInform Abstract: Synthetic Nitroimidazoles: Biological Activities and Mutagenicity Relationships. **Scientia Pharmaceutica**, 2010, v. 41, n. 2, p. 497-520.

- MONASTERIUS, M.; ESCORCHE, M.; AVENDAÑO. Conformational analysis, electronic properties and molecular electrostatic potential of nitrofurans derivatives with antibacterial activity. **Journal of Molecular Structure**, 2005, v. 748, n. 1, p. 49 - 55.
- MURILLAS, D. L., L PIÑOL R., ROS B., SERRANO J., SIERRA T.; FUENTE R.; Structure-activity studies of ferroelectric and antiferroelectric imine ligands and their palladium(II) complexes. An antiferroelectric metallomesogen. **Journal of Materials Chemistry**, 2004, v. 14, p. 1117-1127.
- MURRAY P. R.; ROSENTHAL K. S.; PFAÜER, M. A. **Microbiologia Médica**. 5ª edição, Madrid: Elsevier, 2006, 963 p.
- NAIMI, T. S.; LEDELL K. H.; COMO-SABETTI, K.; BORCHARDT, S. M.; BOXRUD, D. J.; ETIENNE, J.; JOHNSON, S. K.; VANDENESCH, F.; FRIDKIN, S.; O'BOYLE, C.; DANILA, R. N.; LYNFIELD, R. Comparison of Community and Health Care-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **Journal of the American Medical Association**, 2011, v. 290, n. 22, p. 2976–2984.
- NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Revista Virtual Química**, 2009, v. 1, n. 3, p. 227-240.
- OLIVEIRA, P. S. M.; FERREIRA V.F.; BATISTA J; SOUZA M. V.; CARVALHO E. M.; Síntese de aminoálcoois derivados do D-manitol. **Química Nova**, 2008, v. 31, n. 4, p. 776-780.
- ONOFRE, S. B.; RIVEROS, R.; COSTA, S. O. P.; BARROS, N. M. Avaliação da atividade antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Sanson. **Arquivo de Ciência da Saúde Unipar**, 1999, v. 3, n.1, p. 29-33.
- ORMENESE, S. S. Escherichia coli 0157:H7 em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 1999, v. 33, n.1, p. 41-49.
- PAULA, R. F.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, 2009, v. 32, n. 4, p. 1013-1020.

- PEDROSA, L. F.; MACEDO, W. P.; BAËSSO, R. M.; CARDOSO, L. M., FIGUEIREDO, A. A. M., CAVALEIRO, J. A. S.; SOUZA, M. C. S. **Uso de Micro-ondas na obtenção por aminação reductiva de novos derivados porfirínicos forforamidatos**. 33° Reunião Anual da Sociedade Brasileira em Química, 2009.
- RADDI, M. S. G.; LEITE, C. Q. F.; MENDONÇA, C. P. *Staphylococcus aureus*: Portadores entre Manipuladores de Alimentos. **Revista Saúde Pública**, 1988, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 36-40.
- SACK, R. B.; RAHMAN, M.; YUNUS, M.; KHAN, E.H., Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease. **Clinical Infectious Diseases** 1997, v. 24, n. 1, p. 102–105.
- SANSEVERINO, A. M.; Micro-ondas em síntese orgânica. **Química Nova**, 2002, v. 25, n. 4, p. 660-667.
- SEGATTO, C. O ataque das superbactérias, uma nova geração de pragas resiste aos antibióticos até se tornar invencível. Por que todos nós estamos vulneráveis. **Época**, 2008.
- SHEARS, P. Antibiotic resistance in the tropics. Epidemiology and surveillance of antimicrobial resistance in the tropics. **The Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2001, v. 95, n. 2, p. 127–130.
- SILVA, A. T. DE A. S. **Síntese de Pró-Fármacos Derivados de Metronidazol**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas), UNESP, Araraquara, 2002.
- STEFANI, H. A., **Introdução à química de compostos heterociclos**. 1^a. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 2008, 286 p.
- TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2000, v. 33, n. 3, p. 281-301.
- TAVARES, L. C. Qsar: A abordagem de Hansch. **Química Nova**, 2004, v. 27, n. 4, p. 631-639.

- TOWNSON, S. M., G. R. HANSON, J. A. UPCROFT, AND P. UPCROFT, A purified ferredoxin from *Giardia duodenalis*. **European Journal Biochemistry**, 1994, v. 220, n. 2, p. 439–446.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. L. **Microbiologia**, 4^o Ed., São Paulo: Atheneu, 2004, 718 p.
- TRIPATHI R. P., SAXENA N., TIWARI V. K.; VERMA S.S., CHATURVEDI V. Synthesis and antitubercular activity of substituted phenylmethyl- and pyridylmethyl amines, **Bioorganic Medicinal Chemistry**, 2006, v. 14, n. 24, p. 8186-8196.
- VIANA, G. H. R. **Estudos para a síntese da viscosamina, de análogos oxigenados e de novos sais de piridínio quirais usando a reação de Zincke**. 2008. 168 f. Dissertação (Doutorado em Química)- Departamento de Química, UFMG, 2008.
- VIDAVER, A.K. Uses of antimicrobials in plant agriculture, **Clinical Infection. Diseases**, 2002, 34, n. 1, p. 107–110.
- WISE, R.; SOULSBY, E. J. Antibiotic resistance-an evolving problem, **Veterinary Record**, 2002, v. 151, n. 13, p. 371–372.