UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

AGNES CECHETO TRINDADE

# SÍNTESE DE NOVOS FOTOSSENSIBILIZADORES ESTERICAMENTE IMPEDIDOS DE AUTO-AGREGAÇÃO DERIVADOS DE MALEIMIDAS N-SUBSTITUÍDAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU

São José dos Campos, Dezembro/2021

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

AGNES CECHETO TRINDADE

# SÍNTESE DE NOVOS FOTOSSENSIBILIZADORES ESTERICAMENTE IMPEDIDOS DE AUTO-AGREGAÇÃO DERIVADOS DE MALEIMIDAS N-SUBSTITUÍDAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientador: Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes

São José dos Campos, Dezembro/2021

# UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

# AGNES CECHETO TRINDADE

# SÍNTESE DE NOVOS FOTOSSENSIBILIZADORES ESTERICAMENTE IMPEDIDOS DE AUTO-AGREGAÇÃO DERIVADOS DE MALEIMIDAS N-SUBSTITUÍDAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Orientador: **Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes** Universidade Anhembi Morumbi

#### Profa. Dr. Luciana Coutinho de Oliveira

Research Scientist at NMX Research and Solutions Inc.

MBA candidate at Concordia University

Prof. Dr. Miguel Juan Beltrán-García

Universidade Autônoma de Guadalajara

## **Prof. Egberto Munin**

Universidade Anhembi Morumbi

## Coordenador: Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro

Universidade Anhembi Morumbi

# Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (Suplente)

Universidade Anhembi Morumbi

# Prof. Dr. Divinomar Severino (Suplente)

Universidade de São Paulo

# São José dos Campos, Dezembro/2021

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade Anhembi Morumbi, da autora Agnes Cecheto Trindade e do orientador Prof. Adjaci Uchôa Fernandes.

# Agnes Cecheto Trindade

Bacharel em Química Industrial pela Universidade do Vale do Paraíba de São José dos Campos, com experiência em laboratório de síntese orgânica e engenharia, atuando em pesquisa e desenvolvimento de novos compostos orgânicos.

# Ficha Catalográfica

# Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca UAM com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T833s Trindade, Agnes Cecheto fotossensibilizadores Síntese novos de estericamente impedidos de auto-agregação derivados de maleimidas n-substituídas / Agnes Cecheto Trindade. - 2021. 100f. : il.; 30cm. Orientador: Adjaci Fernandes Uchoa. Dissertação (Mestrado em **ENGENHARIA** BIOMÉDICA) - Universidade Anhembi Morumbi, São José Dos Campos, 2021. Bibliografia: f.59 1. Maleimidas. 2. Clorinas. 3. TFD. 4. Bactérias. 5. Câncer. CDD 610.28

#### AGRADECIMENTOS

Á Deus, por me conceder a benção de poder iniciar o mestrado e concluilo.

Ao Prof. Dr. Adjaci Uchoa por compartilhar seus conhecimentos e sempre estar à disposição para me orientar nessa trajetória do mestrado.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem em todos os momentos da minha vida e proporcionarem oportunidades para meu crescimento e desenvolvimento.

Aos meus amigos, que sempre me incentivaram e me inspiraram no crescimento pessoal e profissional.

Á todos os professores do programa de pós-graduação da Universidade Anhembi Morumbi (UAM), por dividirem os conhecimentos que me foram agregados.

E especialmente a minha tia Alcione Angélica, por me apresentar o curso e me apoiar a ingressar no programa de pós-graduação.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

Eu faço parte dos que acham que a ciência é belíssima.

Marie Curie

#### RESUMO

A disseminação de bactérias resistentes a antibióticos configura uma ameaça considerável a humanidade, como principal consequência a alta morbidade e mortalidade. A síntese de novos compostos com atividade biológica capazes de desativar enzimas e inibir vias metabólicas de bactérias e fungos com alta seletividade no corpo humano pode gerar promissores agentes antimicrobianos e antifúngicos. Os derivados de maleimida possuem em sua estrutura o grupo - CO-N (R) -CO- sendo R um hidrogênio, grupo alquila ou arila. A ligação dupla presente no anel maleimida é propensa a ser atacado por espécies nucleofílicas como o grupo tiol, presente na estrutura do aminoácido cisteína. Deste modo a atividade enzimática de cisteína proteases bacterianas é alterada e conseguentemente o crescimento da bactéria é inibido. A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica terapêutica consolidada para o tratamento de vários tipos de câncer, sendo uma alternativa cada vez mais utilizada em detrimento dos tratamentos tradicionais. A TFD é baseada na fotooxidação de matéria biológica, como por exemplo, membrama celular e é decorrente da atividade de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são geradas in situ e ocasionam a morte celular por luz visível em presença de um fotossensibilizador (Fs) e de oxigênio. Entre esses Fs mais utilizados em TFD, estão as porfirinas, que são macrociclos aromáticos com 18 elétrons  $\pi$  ressonantes mais 4 elétrons  $\pi$  conjugados e possuem quatro bandas de absorção Q na região do visível ideal para TFD. A clorina por sua vez, possui características fotofísicas consideradas de grande importância para TFD, visto que as clorinas apresentam forte absortividade molar dentro da janela terapêutica (600-800nm) onde ocorre maior penetração da luz no tecido, o que proporciona o tratamento de tumores mais profundos. No entanto, um fator limitante e abrangente dos fotossensibilizadores é a formação de auto-agregação, que ocorre devido à forte interação entre macrocíclicos aromáticos. Trabalhos recentes demonstram que a reação de Diels-Alder, por ser régio-seletiva, pode ser utilizada para a obtenção de clorinas isentas de auto-agregação. A utilização de derivados de maleimidas como dienófilos na síntese destes macrociclicos pode potencializar a ação do Fs devido suas interações com domínios hidrofóbicos das enzimas presentes em tumores, resultando na inativação de grupos sulfidrila essenciais para suas atividades catalítica.

Palavras-chave: Maleimidas, Clorinas, TFD, Bactérias, Câncer

# SYNTHESIS OF NEW PHOTOSENSITIZERS STRICTLY EXEMPT FROM SELF-AGGREGATION DERIVED FROM N-SUBSTITUTED MALEIMIDES ABSTRACT

The spread of antibiotic-resistant bacteria poses a considerable threat to humanity, as the main consequence of high morbidity and mortality. The synthesis of new compounds with biological activity capable of deactivating enzymes and inhibiting the metabolic pathways of bacteria and fungi with high selectivity in the human body can lead to promising antimicrobial and antifungal agents. Maleimide derivatives have the group - CO-N (R) -CO- in their structure, with R being a hydrogen, alkyl or aryl group. The double bond present in the maleimide ring is prone to be attacked by nucleophilic species such as the thiol group present in the structure of cysteine amino acid. Thus, the enzymatic activity of bacterial cysteine proteases is altered, which may lead to inhibition of bacterial growth. Photodynamic Therapy (PDT) is a consolidated therapeutic technique for the treatment of various types of cancer, being an increasing alternative used in cancer as compared to the traditional treatments. PDT is based on the photooxidation of biological matter and results from the activity of reactive oxygen species (ROS) that are generated in situ and cause cell death by visible light in the presence of a photosensitizer (Fs) and oxygen. Among these Fs, the porphyrins are the ones mostly used in PDT, which are aromatic macrocycles with 18 resonant  $\pi$  electrons plus 4 conjugated  $\pi$  electrons possessing four absorption bands Q in the visible region ideal for PDT. Chlorine, in turn, has photophysical characteristics considered to be of great importance for PDT, since chlorines have strong molar absorption within the therapeutic window from 600 to 800nm where there is greater penetration of light into the tissue, being an interesting approach for the treatment of deeper tumors. However, a common limitation factor of photosensitizers is the formation of self-aggregates, which occurs due to the strong interaction between aromatic macrocyclics. Recent work demonstrates that the regio-selectiviness of Diels – Alder reaction is an important characteristic to obtain chlorines free from self-aggregation. The use of maleimide derivatives as dienophiles in the synthesis of these macrocyclics can enhance the action of Fs due to their interactions with hydrophobic domains of enzymes present in tumors, resulting in the inactivation of sulfhydryl groups essential for their catalytic activities.

Keywords: Maleimides, Chlorines, TFD, Bacteria, Cancer

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVOS	3
1.1	.2 OBJETIVO GERAL	3
1.1	.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1	DOENÇAS BACTERIANAS	3
2.2	INFECÇÕES BACTERIANAS EM HOSPITAIS	4
2.3	REAÇÃO DE MICHAEL E DIELS-ALDER	7
2.4	IMIDAS CÍCLICAS	8
2.5	MALEIMIDAS	9
2.6	SÍNTESE DE MALEIMIDAS	10
2.7	TERAPIA FOTODINAMICA	11
2.7	PORFIRINAS	14
2.8	CLORINAS	16
2.9	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	18
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	REAGENTES E SOLVENTES	18
3.2	DETERMINAÇÃO ESPECTROSCÓPICAS	18
3	8.2.1 ESPECTRO DE MASSA	18
3	3.2.2 ESPECTRO INFRAVERMELHO	19
3	3.2.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAF	२ १९
3.3	SÍNTESE DE MALEIMIDAS	19
3.4	TESTE DIFUSÃO EM DISCO	21

	3	5 SÍNTESE DAS DORFIRINAS	າງ
	5.		<u> </u>
	3.	6 SINTESE DAS CLORINAS	23
	4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
	4.	1 SÍNTESES, SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO	24
		4.1.2 Síntese e caracterização do composto 1:	24
		4.1.3 Síntese e Caracterização composto 2:	27
		4.1.4 Síntese e Caracterização do composto 3	30
		4.1.5 Síntese e Caracterização do composto 4	32
	5.	TESTE DIFUSÃO EM DISCO DERIVADOS DE MALEIMIDAS	35
	6.	SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS	37
	7.	SÍNTESES DOS FOTOSSENSIBILIZADORES CLORINICOS 3	38
	7.	1 Sínteses e Caracterização do composto 5A	39
	7.	2 Sínteses e Caracterização composto 5B	42
	7.	3 Sínteses e Caracterização composto 6A	46
	7.	4 Sínteses e Caracterização composto 6B	48
	7.	5 Sínteses e Caracterização Vinilclorinas: Compostos 7A e 7B	52
	7.	6 Sínteses e Caracterização Cloroclorinas: Compostos 8A e 8B:	52
	8.	ESPECTRO DE ABSORÇÃO E EMISÃO DE PORFIRINA	Е
CLOR	INA	53	
	9.	PLATAFORMA DE COMPOSTOS SINTETIZADOS.	55
	10.	CONCLUSÕES	57
	11.	REFERÊNCIAS	59
	ANE	EXO IA - ESPECTRO DE MASSA FENILMALEIMIDA	67
	ANE	EXO IB - ESPECTRO DE MASSA FENILCLORINA A	68
	ANE	EXO IC - ESPECTRO DE MASSA FENILCLORINA B	70
	ANE	EXO ID - ESPECTRO DE MASSA NITROFENILCLORINA A	72
	ANE	XO IE - ESPECTRO DE MASSA NITROFENILCLORINA B	73

ANEXO IF - ESPECTRO gCOSY FENILCLORINA A	74
ANEXO IG - ESPECTRO gNOESY FENILCLORINA A	75
ANEXO IH - ESPECTRO gHSQC FENILCLORINA A	76
ANEXO IJ - ESPECTRO gHMBC FENILCLORINA A	77
ANEXO IK - ESPECTRO DEPT FENILCLORINA A	78
ANEXO IL - ESPECTRO gCOSY FENILCLORINA B	79
ANEXO IM - ESPECTRO gNOESY FENILCLORINA B	80
ANEXO IN - ESPECTRO gHSQC FENILCLORINA B	81
ANEXO IO - ESPECTRO gHMBC FENILCLORINA B	82
ANEXO IP - ESPECTRO DEPT FENILCLORINA B	83
ANEXO II – ARTIGO	84

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estrutura química antibiótico oxacilina	. 4
Figura 2 Estrutura química antibiótico vancomicina	. 5
Figura 3 Estrutura química antibiótico carbapenêmicos	. 5
Figura 4 Estrutura química antibiótico cefalosporinas	. 6
Figura 5 Anel dihidrotiazina	. 6
Figura 6 Estrutura química imidazol (A), benzimidazol (B) e maleimida (	(C)
 	. 6
Figura 7 Estrutura química sulfonas (A) e fumaratos (B)	. 7
Figura 8 Reação de adição tiol-Michael	. 7
Figura 9 Reação Diels-Alder	. 8
Figura 10 Estrutura geral grupo Imida	. 8
Figura 11 Reação adição de Michael entre maleimida e cisteína	10
Figura 12 Síntese de maleimida reação de adição de Michael	10
Figura 13 Síntese de maleimidas via reação de Diels-Alder	11
Figura 14 Diagrama de Jablonski	13
Figura 15 Estrutura porfirina e clorina	14
Figura 16 Produto principal - Clorina "L" conformação endo	17
Figura 17 Rota para síntese dos compostos 1, 2, 3 e 4	20
Figura 18 Funcionalização da porfirina	22
Figura 19 Espectro de massa composto 1	25
Figura 20 1H-NMR (500 MHz) em CDCl3 do composto 1	25
Figura 21 13C-NMR (125 MHz) em CDCI3 do composto 1	26
Figura 22 1H-NMR (500 MHz) em CDCl3 do composto 2	27
Figura 23 C-NMR (125 MHz) em CDCl <sub>3</sub> do composto 2	28
Figura 24 Espectro de massa composto 3	30
Figura 25 Espectro IV do composto 3	31
Figura 26 Espectro RMN 1H do composto 3 em CDCl3	32
Figura 27 Espectro de massa de 4 - Clorofenilmaleimida (Composto	4)
 	33
Figura 28 Espectro IV do 4 – Clorofenilmaleimida (composto 4)	33
Figura 29 Espectro RMN 1H do composto 4 em CDCl3	34

Figura 30 Teste difusão em disco placa de petri
Figura 31 Técnica de cromatografia em coluna e cromatografia em placa
de sílica
Figura 32 Esquema dos principais parâmetros físicos relevantes no
equilíbrio monômero-agregado
Figura 33 Esquema reacional de entre dienos e dienófilios
Figura 34 Espectro de massa para a fenilclorina A 40
Figura 35 Espectro RMN $^{1}$ H do composto 5A a 500.13 MHz em CDCl <sub>3</sub> 41
Figura 36 Espectro <sup>13</sup> C do composto 5A a 125.77 MHz em CDCl <sub>3</sub> 41
Figura 37 Espectro de massa para a fenilclorina B 43
Figura 38 Espectro RMN <sup>1</sup> H do composto 5B a 500.13 MHz em CDCl344
Figura 39 Espectro <sup>13</sup> C do composto 5B a 125.77 MHz em CDCl3 45
Figura 40 Espectro de Massa da nitrofenilclorina A 47
Figura 41 Espectro RMN <sup>1</sup> H do composto 6A a 500.13 MHz em CDCl347
Figura 42 Espectro <sup>13</sup> C do composto 6A a 125.77 MHz em CDCl3 48
Figura 43 Espectro de Massa da nitrofenilclorina B 48
Figura 44 Espectro RMN <sup>1</sup> H do composto 6B a 500.13 MHz em CDCl349
Figura 45 Espectro <sup>13</sup> C do composto 6B a 125.77 MHz em CDCl3 50
Figura 46 Espectro de absorção porfirina (A) e clorina (B) 53
Figura 47 Estrutura dos compostos sintetizados

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Rendimentos obtenção maleimidas	21
Tabela 2 Teste difusão em disco compostos 3 e 4	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **AM –** Anidrido Maleico
- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CDC Centro para Controle e Prevenção de Doenças
- CI Cloro
- E.coli Escherichia coli
- FS Fotossensibilizador
- P. aeroginosa Pseudomonas aeruginosa
- RNS Espécies reativas de nitrogênio
- ROS Espécies reativas de oxigênio
- S.aureus Staphylococcus aureus
- SCoN Staphylococcus coagulase positiva
- TFD Terapia Fotodinâmica
- UTI Unidade de Terapia Intensiva
- DD Dubleto de Dubleto
- δ Deslocamento Químico

#### 1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que a disseminação de bactérias resistentes a antibióticos configura uma ameaça considerável à humanidade, como principal consequência a alta morbidade e mortalidade. Estudos sobre infecções e resistência microbiana estão voltados para as enzimas bacterianas e fúngicas encarregadas de catalisar as principais reações bioquímicas em células micróbicas (1). Compostos com atividade biológica capazes de desativar essas enzimas e inibir a via metabólicas em bactérias e fungos com alta seletividade no corpo humano são promissores agentes antimicrobianos (2). Os derivados de maleimida possuem em sua estrutura o grupo - CO-N (R) -CO- sendo R um hidrogênio, grupo alquila ou arila. A ligação dupla presente no anel maleimida é propensa a ser atacado por espécies nucleofílicas como o grupo tiol, presente na estrutura do aminoácido cisteína. Deste modo a atividade enzimática de cisteina-proteases bacterianas é alterada e o crescimento bacteriano é inibido (2). O grupo maleimida se liga de maneira eficiente e específica com biomoléculas que contenham o grupo tiol e formam uma ligação covalente estável e irreversível (3).

As maleimidas alcançaram relevantes atividades biológicas, incluindo atividades antimicrobianas e inibição enzimática. O mecanismo antimicrobiano foi estudado e elucidado que as maleimidas poderiam interagir preferencialmente com os domínios hidrofóbicos das enzimas alvo, resultando na inativação de grupos sulfidrila essenciais para suas atividades catalíticas (4). As atividades são bastante afetadas pela estrutura da ligação dupla C=C presente no anel maleimida (4). Existe uma variação da capacidade da atividade biológica de cada maleimida dependendo do grupo ligado ao nitrogênio. No caso dos compostos propostos nesse estudo, a presença do cloro assim como, a presença do grupo vinil, podem potencializar o ataque do grupo tiol, à dupla ligação no anel maleimida (5).

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica terapêutica consolidada para o tratamento de vários tipos de câncer, sendo uma alternativa cada vez mais utilizada em detrimento dos tratamentos tradicionais. A TFD é baseada na fotooxidação de matéria biológica e é decorrente da atividade de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são geradas *in situ* e ocasionam a morte celular por luz visível em presença de um fotossensibilizador (Fs) e de oxigênio. Inúmeros pesquisadores estão focando no estudo e desenvolvimento de novos Fs, sistemas carregadores dos Fs e compreensão dos mecanismos de sensibilização e de morte celular(6–9)

Entre esses Fs mais utilizados em TFD, estão as porfirinas, que são macrociclos aromáticos com 18 elétrons  $\pi$  ressonantes mais 4 elétrons  $\pi$  conjugados e possuem quatro bandas de absorção Q na região do visível ideal para TFD. A hidrogenação do anel da porfirina conduz a uma clorina ou anel clorínico. A clorina por sua vez, possui características fotofisicas consideradas de grande importância para TFD, visto que as clorinas apresentam forte absortividade molar dentro da janela terapêutica (600-800nm) onde ocorre maior penetração da luz no tecido, o que contribui para o tratamento de tumores mais profundos(10).

No entanto, um fator limitante e abrangente dos fotossensibilizadores é a formação da auto-agregação, que ocorre devido à forte interação entre macrocíclicos aromáticos. Essa agregação altera as propriedades fisicoquímicas do Fs, induzindo um decréscimo nos rendimentos quânticos de fluorescência do estado triplete, de oxigênio singlete e, consequentemente, a atividade do Fs(11).

Trabalhos recentes demonstram que a reação de Diels-Alder, por ser régio-seletiva, pode ser utilizada para a obtenção de clorinas isentas de autoagregação. A utilização de derivados de maleimidas como dienófilos na síntese destes macrociclicos pode potencializar a ação do Fs devido suas interações com domínios hidrofóbicos das enzimas presentes em microrganismos, resultando na inativação de grupos sulfidrila essenciais para suas atividades catalíticas(12).

#### **1.1 OBJETIVOS**

#### 1.1.2 OBJETIVO GERAL

Obtenção de novos fotossensibilizadores clorinicos para terapia fotodinâmica com fotofísica maximizada e atividade sinérgica com antibióticos.

#### **1.1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Sintetizar novas maleimidas com potencial atividade biológica.
- Sintetizar novos fotossensibilizadores clorinicos a partir destas maleimidas.
- Determinar a atividade biológica dessas maleimidas frente as bácterias Gram-positivas e Gram-negativas.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 2.1 DOENÇAS BACTERIANAS

O aumento das bactérias resistentes por uso inadequado de antibióticos pela população, leva a um impacto negativo sobre a morbidade, mortalidade e na economia(13). Segundo, Luepke et al. (2016) da década de 1980 ao início de 2000, houve um declínio de 90% na aprovação de novos antibióticos e bem como a reduções de descobertas de novas classes(13). Nos Estados Unidos, o Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estimou que 2 milhões de pacientes por ano contraíram infecções devido as bactérias resistentes aos

medicamentos e 23 mil morreram por ano, como consequência. Os custos estimados no país chegam a 55 bilhões de dólares (14).

No Brasil, ainda não são encontrados dados sobre o número de vítimas por bactérias resistentes, mas a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) alerta sobre o crescente número de casos de infecções por essas bactérias principalmente nos hospitais (1).

#### 2.2 INFECÇÕES BACTERIANAS EM HOSPITAIS

A ANVISA relata que, as infecções causadas por bactérias do tipo Grampositiva em adultos hospitalizados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e tratados com antibiótico oxacilina, estrutura representada na Figura 1, apresentaram resistência a este anibiotico. Especificamente, cerca de 74,9% das amostras de *Staphylococcus coagulase* positiva (SCoN) e 57,4% das amostras de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) apresentaram resistência a oxacilina.



Figura 1 Estrutura química antibiótico oxacilina

Cerca de 28.8% de amostras de pacientes infectados por *Enterococcus spp,* outra bactéria gram-positiva, apresentaram resistência ao antibiótico vancomicina, mostrado na figura 2.



Figura 2 Estrutura química antibiótico vancomicina

Em 2015 foram observadas altas taxas de resistência para os bacilos Gram-negativos aos carbapenêmicos, onde a estrutura química está representada na Figura 3, assim como nos anos anteriores. Taxas de resistência aos carbapenicos de 77,4% para *Acinetobacter spp.* e 39,1% para *Pseudomonas aeruginosa* foram reportadas (*P. aeroginosa*).



Figura 3 Estrutura química antibiótico carbapenêmicos

Para bactérias gram-negativas pertencentes à família Enterobacteriaceae, as taxas de resistência aos carbapenêmicos e às cefalosporinas, Figura 4, foram de 9,7% para *Escherichia coli (E.coli*), 43,3% para *K.pneumoniae* e 21,6% para *Enterobacter spp*(1).



Figura 4 Estrutura química antibiótico cefalosporinas

A descoberta de novos compostos químicos vem abrindo o caminho para classes alternativas de agentes bactericidas com novo mecanismo de ação e atividade contra essas espécies de bactérias resistentes (15). Estudos utilizando síntese de derivados de dihidrotiazina, Figura 5, composto químico conhecido com atividade bactericida apresentou potente inibição contra bactérias do tipo Gram-positivas, dentre elas o *S. aureus*.



Figura 5 Anel dihidrotiazina

Compostos derivados de imidazol, figura 6 (A), e benzimidazol, figura 6 (B) apresentaram atividade de inibição considerável contra o *S. aureus*. Os derivados de maleimidas, Figura 6 (C), são também reportados por pesquisadores como compostos químicos de alta atividade contra bactérias resistentes dos tipos Gram positivas e Gram-negativas (16–21).



Figura 6 Estrutura química imidazol (A), benzimidazol (B) e maleimida (C)

## 2.3 REAÇÃO DE MICHAEL E DIELS-ALDER

A química da reação de Michael envolve a adição de um nucleófilo a uma ligação dupla eletrofílica carbono-carbono. Em uma típica reação de adição de Michael, o nucleófilo (doador de Michael) é adicionado à ligação dupla carbono-carbono com deficiência de elétrons (aceptor de Michael) para criar uma nova ligação simples carbono-carbono(22). Existem diversos estudos que descrevem a reação envolvendo o grupo tiol (doador de Michael), conhecida como reação tiol-Michael, que envolve a adição do grupo tiol a grupos como vinil sulfonas Figura 7 (A), fumaratos figura 7 (B), e maleimidas que podem atuar como aceptores de Michael(21–23).



Figura 7 Estrutura química sulfonas (A) e fumaratos (B)

A reação genérica de adição tiol-Michael é exemplificada na Figura 8(26).



Figura 8 Reação de adição tiol-Michael

A reação de Diels-Alder é considerada uma das reações mais importantes dentro da química orgânica. A reação de Diels-Alder é dita uma reação pericíclica de cicloadição entre um dieno conjugado com quatro elétrons  $\pi$  e um segundo componente alceno com dois elétrons  $\pi$ , chamado de dienófilo. Essa reação pode ser executada sob condições relativamente simples aquecendo juntos os dois componentes, dieno e dienófilo, em solventes não polares, seguido por evaporação que geralmente leva a altos rendimentos de produtos conforme Figura 9(27).

Estudos reportam a importância da reação de Diels-Alder entre maleimidas carregadoras de drogas e dienos ricos em elétrons presentes em biomoléculas, tornando-se potenciais estratégias na área bioterapêutica(28,29).



Figura 9 Reação Diels-Alder

#### 2.4 IMIDAS CÍCLICAS

As imidas cíclicas, estrutura química Figura 10, são uma classe importante de compostos com ligação bis-amida com nitrogênio comum. São geralmente utilizadas como peças para construção de sínteses de produtos naturais, drogas, polímeros e apresentam uma diversidade de atividades farmacológicas, que incluem efeitos antibacterianos, antifúngicos, anticâncer e anti-inflamatórios(30,31).



Figura 10 Estrutura geral grupo Imida

Os derivados de imidas cíclicas, provaram ser importantes agentes medicinais para uso no tratamento de câncer(32), assim como apresentaram atividade analgésica em camundongos(33), citotoxicidade contra células endoteliais e leucêmicas(34), e também apresentaram evidencias de atividades bactericidas(35). Em virtude das imidas possuírem características hidrofóbicas, podem cruzar membranas biológicas *in vivo* e seus efeitos biológicos estão diretamente relacionados com o tamanho e às características eletrofílicas dos grupos substituintes no anel imida que provocam mudanças em suas propriedades estéricas(35).

#### 2.5 MALEIMIDAS

As maleimidas e seus derivados são compostos químicos que contêm um anel imida e uma estrutura geral –CO-N(R)– CO- sendo o R um hidrogênio, grupo alquila ou arila. São obtidos a partir de anidrido maleico por tratamento com aminas(36).

As maleimidas demonstram reagir diretamente com grupos químicos presentes em biomoléculas, como tióis via reações de adição de Michael ou em estratégias de duas etapas por meio de processos via reação de Diels-Alder. A ligação dupla presente no anel maleimida é atacada por espécies nucleofílicas como o grupo tiol, presente na estrutura do aminoácido cisteína, deste modo à atividade enzimática da protease da cisteína é alterada e o crescimento da bactéria é inibido(35,36).

O grupo maleimida se liga de maneira eficiente e específica com biomoléculas que contenham o grupo tiol terminal e formam uma ligação covalente estável e irreversível como exemplo mostrado na Figura 11(39).



Figura 11 Reação adição de Michael entre maleimida e cisteína

# 2.6 SÍNTESE DE MALEIMIDAS

As maleimidas e seus derivados são obtidos principalmente a partir da reação entre anidrido maleico (AM) e aminas, como já descrito anteriormente, seguido por desidratação. A reação de síntese genérica é detalhada na Figura 12(40).



Figura 12 Síntese de maleimida reação de adição de Michael

Um método de três etapas envolvendo condensação por meio da reação Diels-Alder de anidrido maleico com furano, também leva a formação de maleimidas N-substituídas conforme a Figura 13(41).



Figura 13 Síntese de maleimidas via reação de Diels-Alder

Além da aplicação das maleimidas como substratos para síntese de produtos químicos com atividade biológica, as maleimidas também são utilizadas como reagentes de conjugação para reticulação intramolecular e intermolecular de proteínas(42). Além disso, são utilizadas maleimidas funcionalizadas como reagentes para modificações dirigidas ao local de peptídeos ou proteínas(43).

#### 2.7 TERAPIA FOTODINAMICA

A ação fotodinâmica refere-se à destruição do tecido vivo por luz visível em presença de um fotossensibilizador (Fs) e de oxigênio. A energia luminosa é absorvida pelo Fs e transferida para o meio, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam danos às biomoléculas(44).

O uso deste efeito na medicina - Terapia Fotodinâmica (TFD) - é promissor para o tratamento de vários tipos de câncer, sendo uma alternativa cada vez mais utilizada em detrimento dos tratamentos tradicionais. A busca do conhecimento dos mecanismos de ação da TFD, o desenvolvimento dos Fs e das fontes de luz podem e devem trazer benefícios a muitas pessoas(44). A TFD envolve a administração de um agente fotossensibilizador em um tecido tumoral, seguida da ativação desse agente por uma luz com comprimento de onda específico. O tratamento consiste em duas etapas. Na primeira, o agente Fs acumula-se preferencialmente nas células tumorais após sua administração tópica ou sistêmica. Após a incorporação do fármaco, o tumor é exposto à luz de comprimento de onda que coincide com o espectro de absorção do Fs. Esse agente ativado transfere energia ao oxigênio molecular, gerando as ROS. Essas espécies causam a oxidação dos lipídios, aminoácidos e proteínas da célula tumoral induzindo a necrose e/ou apoptose do tumor(45).

O passo inicial no processo de fotossensibilização é a excitação eletrônica. Uma característica importante do Fs utilizado em TFD é que ele possa ser excitado em comprimentos de onda de maior penetração no tecido biológico. Fotossensibilizadores que absorvem na região do infravermelho próximo permitem o tratamento em tecidos mais profundos (1 centímetro), possibilitando o tratamento de tumores maiores e mais internos(46).

Entre os Fs com estas características destacam-se alguns grupos, tais como as clorinas. Como ilustra o diagrama de Jablonski representado na Figura 14, os processos de desativação das moléculas são simultâneos e competitivos entre si, sendo importante determinar a contribuição de cada processo, ou seja, o rendimento quântico de cada processo. Assim, espera-se que um bom Fs faça cruzamento intersistema, apresentando um alto rendimento quântico do estado triplete e de geração de oxigênio singlete(44).

Outros fatores são também importantes para a eficácia de um Fs. A incorporação em tumores, e a citolocalização celular são dois fatores fundamentais. Os danos causados pelos Fs em biomoléculas podem ocorrer por dois mecanismos principais. No primeiro (mecanismo TIPO I), a energia das moléculas excitadas é transferida para o oxigênio ou outras biomoléculas através da transferência de elétron (mecanismo radicalar) que culmina em danos diretos às biomoléculas através da formação de espécies ativas de oxigênio, por exemplo, radical superóxido. No segundo (mecanismo TIPO II), a energia de excitação é transferida para o oxigênio molecular, resultando na formação de oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), que é extremamente eletrofílico, sendo capaz de causar

danos em membranas, proteínas e DNA, tanto por ação direta quanto por formação de radicais a partir de oxigênio singlete(44).

No tratamento por TFD, o Fs incorporado nas células é irradiado através de um laser ou de outra fonte luminosa que emite na região de absorção do Fs, promovendo a excitação eletrônica. Atingido o estado excitado, diversos processos podem ocasionar a desativação de uma molécula: a energia pode ser devolvida ao ambiente na forma de calor, pode ser liberada na forma luminosa (fluorescência), ou fazer cruzamento intersistema, atingindo o estado triplete, que pode ser desativado por fosforescência. O tempo de vida do estado triplete é grande o suficiente para permitir a supressão por transferência de energia por colisão com o oxigênio (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>), levando à formação de oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)(44).



Figura 14 Diagrama de Jablonski

#### **2.7 PORFIRINAS**

As porfirinas representam um dos sistemas de anéis macrocíclicos mais estudados e conhecidos na área química. O interesse neste macrociclo aromático com 18 elétrons  $\pi$  ressonantes mais 4 elétrons  $\pi$  conjugados de ocorrência natural se deve as suas amplas funções biológicas, bem como de sua capacidade de funcionar como um excelente ligante de complexação de metais, reações catalíticas, dispositivos eletrônicos, conversão de energia solar e terapia fotodinâmica(2).

Quanto à absorção eletrônica, as porfirinas apresentam bandas de extrema intensidade, a chamada Soret ou B-bandas na faixa de 380-500 nm com absortividade molar de  $10^{-5}$  mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Além disso, em comprimentos de onda mais longos, na faixa de 500-750 nm, seus espectros contêm um conjunto de bandas Q menos intensas, com absorvidade molar de  $10^{-4}$  mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Assim, suas bandas de absorção se sobrepõem significativamente ao espectro de emissão da radiação solar que atinge a biosfera, resultando em ferramentas eficientes para conversão da radiação em energia química(47). Uma porfirina difere de uma clorina pela presença de uma ligação  $\beta$ ,  $\beta'$  saturada de um pirrol conforme a Figura 15(48).



Figura 15 Estrutura porfirina e clorina

Os 18 elétrons  $\pi$  estão presentes ao longo deste circuito, e as duas ligações duplas  $\beta$ ,  $\beta'$ -pirrólicas estão efetivamente separadas delas. O esquema mostra que a redução da ligação dupla  $\beta$ ,  $\beta'$ -pirrólica (porfirina  $\rightarrow$  clorina) não altera o sistema de 18 elétrons  $\pi$  e, de fato, a segunda ligação dupla  $\beta$ ,  $\beta'$ -pirrólica também é suscetível a processos de adição sem alterar a aromaticidade do macrociclo(48,49). Uma clorina é uma di-hidroporfirina e em tetrapirróis adequados, onde as características estruturais não impedem a tautomerização, uma clorina pode se formar por tautomerização prototrópica.

As alterações das propriedades fotofísicas em decorrência da redução do macrociclo aromático são consideradas de grande importância para TFD, visto que as clorinas apresentam forte absortividade molar na janela terapêutica (600-800 nm), ideal para TFD, onde ocorre maior penetração da luz no tecido, o que proporciona o tratamento de tumores maiores e mais profundos, tornando as clorinas potenciais Fs.(50,51).

#### 2.8 CLORINAS

Além da sua absorção na faixa do espectro visível, as clorinas e seus derivados são comumente usadas como FS devido ao estado de excitação de tripleto possuir vida longa, sua fototoxicidade ser eficiente para células cancerosas e possuir alta seletividade para tumor maligno(52). Também apresentam baixa toxicidade, uma vez que são facilmente eliminadas dos tecidos e fluidos sanguíneos. Além disso, os compostos a base de clorinas são geradores eficientes de ROS pela absorção de fótons. Esses compostos, à base de porfirina mostram diversos padrões intracelular, predominantemente em lisossomas e mitocôndrias devido sua estrutura lipofílica(53,54).

O fotossensibilizador de primeira geração, Photofrin, um complexo de oligômeros de porfirina, foi aprovado para aplicações clínicas específicas em vários países da Europa, América e Ásia e está sob investigação para outras doenças malignas e não malignas. No entanto, uma série de problemas relacionados com o uso de Photofrin, como fotossensibilidade estendida da pele e má absorção de luz vermelha que penetra no tecido, levaram ao desenvolvimento de novos fotossensibilizadores com características mais favoráveis, especialmente absorção de luz de comprimento de onda mais longo, que penetra mais profundamente no tecido e é eliminado mais rapidamente do tecido normal(55).

Os fotossensibilizadores de segunda geração têm períodos mais curtos de fotossensibilização, comprimentos de onda de ativação mais longos e, portanto, são ativados mais profundamente nos tecidos, maiores rendimentos de oxigênio singlete e seletividade tumoral. As Clorinas apresentam bandas de absorção nas regiões do vermelho e do infravermelho próximo, permitindo melhor penetração da luz nos tecidos, tornando esses fotossensibilizadores candidatos interessantes para a terapia fotodinâmica(56).

A maioria dos medicamentos fotossensíveis, incluindo as clorinas, que são usados na terapia fotodinâmica para aplicação em tumores possuem

algumas limitações como a auto-agregação, que ocorre devido à forte interação entre macrocíclicos aromáticos devido ao extenso sistema  $\pi$  conjugado e a planaridade dos cromóforos, ocorrem fortes interações intermoleculares tipo Van Der Waals, o que induz a auto-agregação, não são fotoestáveis e em soluções simples, bem como em ambientes complexos, os fotossensibilizadores sofrem degradação diminuindo sua absobância inicial e intensidade de fluorescência(57).

Devido a essas limitações se torna essencial o desenvolvimento de compostos derivados que possam solucionar esses obstáculos(58). A síntese de clorinas a partir da reação de Diels-Alder utilizando protoporfirina IX como dieno é estudada como uma estratégia para diminuir a auto-agregação do Fs, isso porque esses novos Fs possuem um substituinte mais volumoso e um núcleo Fs menor, permitindo a síntese de novas moléculas de clorina que têm uma forma não planar e rígida do tipo "L" Figura 16, o que impede a auto-agregação, mesmo em altas concentrações(59,60).



Figura 16 Produto principal - Clorina "L" conformação endo.

# 2.9 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A técnica de cromatografia que permite a separação, identificação e purificação de componentes presentes em misturas, foi aplicada para separar os compostos sintetizados. A cromatografia em coluna e placa utilizada no projeto consiste em uma fase estacionária (coluna ou placa) e uma fase móvel (solvente). Essa aplicação é vantajosa por ser eficiente em separar os compostos e possuir baixo custo (61).

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### **3.1 REAGENTES E SOLVENTES**

Para as sínteses, utilizamos as seguintes aminas: Anilina, 4-nitroanilina, Cloroanilina e 2-propenamina todas de procedência da Sigma Aldrich, reagentes analíticos com alto teor de pureza. Todos os reagentes no início das sínteses foram dissolvidos em éter etílico e, após a síntese extraídos em clorofórmio e diclorometano.

# 3.2 DETERMINAÇÃO ESPECTROSCÓPICAS

#### 3.2.1 ESPECTRO DE MASSA

A massa foi determinada em um espectrômetro de massa Microtof-tof-Alta res. Por injeção direta.

#### 3.2.2 ESPECTRO INFRAVERMELHO

Os compostos sintetizados foram macerados com KBr na proporção de 1,00 mg de cada composto com 100 mg de KBr, preparados em forma de pastilha com auxílio de uma prensa e, então, analisados um a um, por um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo FTIR 1750, na faixa espectral de 4000 a 500 cm-1.

# 3.2.3 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H <sup>13</sup>C e bidimensionais foram obtidos em clorofórmio deuterados, com aproximadamente 2 mg dos compostos dissolvido em 0,7 ml de solvente. A análise foi determinada em um equipamento BRUKER 500 MHz e em um Varian 300 MHz e sendo inspecionados com a ajuda do software MestRe-C (versão 5.0).

#### 3.3 SÍNTESE DE MALEIMIDAS

As maleimidas foram sintetizadas, em duas etapas conforme: 1) a adição da amina ao anidrido maleico para a formação do ácido correspondente e 2) refluxo em anidrido acético para a ciclização do anel imida. Este procedimento foi realizado segundo processo descrito na literatura (40).

Em um erlenmeyer foram dissolvidos 2 Mols de anidrido maleico em éter etílico (50mL) e num segundo erlenmeyer foram dissolvidos 1 Mol da amina correspondente também em éter etílico (50mL). Ambos foram mantidos sob agitação a temperatura ambiente até completa dissolução, aproximadamente 10 minutos. Após a dissolução, ambas soluções foram filtradas, e verteu-se de forma lenta a solução da amina sobre a solução do anidrido maleico que se encontrava sobre agitação.

A solução resultante foi mantida sobre agitação a temperatura ambiente por um período de aproximadamente 15 minutos para a reação completa da amina com o anidrido e precipitação do produto, o ácido maleâmico correspondente. O precipitado foi filtrado, lavado com 100 mL de éter etílico e seco em estufa por 4 horas. Foi determinado a massa do ácido maleâmico correspondente e submetido à nova reação com anidrido acético/acetato de sódio para ciclização. O meio reacional foi mantido a 72°C, por um período de 4 horas, decorrido este período, o meio reacional foi vertido em um béquer com solução de amônia e gelo. Após a neutralização (pH~7), foi adicionado diclorometano e particionado. O solvente foi eliminado em um rotaevaporador e os resíduos sólidos purificados por cromatografia em coluna usando gel de sílica como suporte e diclorometano/metanol 25:1 como fase móvel. A rota sintética é descrita na Figura 17.



Figura 17 Rota para síntese dos compostos 1, 2, 3 e 4.

Os rendimentos e as respectivas estruturas das maleimidas sintetizadas são apresentados na Tabela 1.

R	Rendimeto %	Nº do composto
H <sub>2</sub> N	74	1
H <sub>2</sub> N NO <sub>2</sub>	78	2
H <sub>2</sub> N	68	3
H <sub>2</sub> N	71	4

Tabela 1 Rendimentos obtenção maleimidas

# 3.4 TESTE DIFUSÃO EM DISCO

O teste de difusão em disco foi realizado utilizando uma metodologia já descrita (16) empregando ágar nutriente, no qual as bactérias foram inoculadas e anteriormente ativadas em caldo Heart Brain Infusion. Após a inoculação das bactérias, foram depositados discos de papel esterilizados e adicionou-se nestes discos uma solução dos compostos dissolvidos em DMSO na concentração de 250 mmol/L. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e foram efetuadas as leituras do raio dos halos de inibição formados em milímetros (mm). Foram realizados controles paralelos com o solvente utilizado para a dissolução dos compostos e um disco para diagnóstico do antibiótico Estreptomicina na concentração de 10mcg. Os experimentos foram feitos em triplicatas para descartar viés experimental ou erro aleatório.

Para o ensaio foram utilizadas as seguintes bactérias: *Pseudomonas aureginosas* ATCC 27853 (Gram-negativa), *Escherichia coli* enteropatogênica ATCC 055 (Gram-negativa), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-

positiva) e *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (Gram-positiva), sendo que a *Listeria monocytogenes* foi infusa em caldo e em ágar nutriente com extrato de levedura. Todas as bactérias foram obtidas no Departamento de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

# **3.5 SÍNTESE DAS PORFIRINAS**

A síntese da porfirina foi realizada a partir da protoporfirina IX (Pp IX), por meio da funcionalização dos grupos carboxilatos nas posições 1 e 8 através de uma reação de esterificação com metanol catalisada por ácido sulfúrico fumegante, como apresentado na Figura 18.



Figura 18 Funcionalização da porfirina

Após o término da reação, os compostos foram particionados em H<sub>2</sub>O/CHCl<sub>3</sub>, a fase orgânica foi coletada e o solvente foi eliminado por rotaevaporação a pressão reduzida. Os resíduos foram purificados por cromatografia e o produto caracterizado por Espectrofotômetro de Massa de Alta Resolução, Espectro Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D os produtos foram utilizados para a obtenção de novas clorinas.
# **3.6 SÍNTESE DAS CLORINAS**

As clorinas foram obtidas por reação de Diels–Alder entre os compostos, sendo eles: Vinilclorina, Cloroclorina, Nitroclorina e Fenilclorina. O sistema reacional foi mantido por ≈12 horas em tolueno seco a 120°C, em um reator selado com atmosfera inerte, como ilustra a Figura 19.



Figura 19 Rota síntese das clorinas

Após o término da reação, os compostos formados foram purificados por cromatografia em coluna com clorofórmio e metanol 50:1, separando o produto dos reagentes e subprodutos. Os isômeros foram separados por cromatografia de camada delgada, utilizando diclorometano e metanol 25:1.

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

# 4.1 SÍNTESES, SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO

**4.1.2 Síntese e caracterização do composto 1:** Fenilmaleimida foi sintetizada, segundo processo ilustrado na Figura 17, purificado por precipitação em meio aquoso recristalização em etanol e posterior separação cromatográfica em coluna (CC) em sílica gel e CHCl<sub>3</sub> como eluente. O rendimento global da reação foi de 74%. O composto obtido apresenta coloração amarela de aspecto cristalino, indicando a sua pureza. A cromatografia analítica em camada delgada (CCD) apresenta uma única mancha circular e bem defina, tanto no visível como no ultravioleta, o que também indica a pureza do composto. A amostra foi analisada por infusão direta e no modo positivo. A massa exata foi calculada como sendo 174,0550 g/mol e determinada em 174,0562 g/mol (Figura 19) para o ion molecular da fenilmaleimida (M+1). Já o pico base em 206,0827 é referente a abertura do anél imida, e a adição de metanol durate o processo de análise. (Anexo IA)



Figura 19 Espectro de massa composto 1

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da fenilmaleimida são apresentados nas Figuras 20 e 21.



Figura 20 1H-NMR (500 MHz) em CDCl3 do composto 1

O espectro de RMN <sup>1</sup>H, mostra uma excelente resolução. Em 6.84 ppm tem um singlete bem definido que integra para dois hidrogênios referente ao grupo vinilico do anel maleimida. Já o sinal centrado em 7.35 ppm integra para três hidrogênios e é atribuído aos hidrogênios **orto** e **para** do anel aromático. Os hidrogênios **metas** aparecem como um dublete sobreposto em 7.47 ppm.



Figura 21 13C-NMR (125 MHz) em CDCl3 do composto 1

No espectro de RMN<sup>13</sup>C, apresenta um sinal em 169.4 ppm referente às carbonilas do anel maleimidas que são equivalentes, visto que são simétricas em relação a molécula. Já em 134.1 ppm apresentam-se dois carbonos sobrepostos referentes aos vinilicos C-2 e C-3. Em 131.1 ppm observa-se o sinal referente ao C-5, sinal com baixa intensidade, visto que não apresenta H acoplados, e consequentemente apresentando maior tempo de relaxação. O sinal em 129.1 ppm é atribuído aos C-6 e C-10, que se encontram na posição **Orto** e são simétricos. Em 127.9 ppm temos o sinal referente ao C-8 da posição **Para** em relação ao anel maleimida. Já em 126.0 ppm encontram-se os sinais

referentes ao C-7 e C-9 que estão sobrepostos. Estes sinais estão Meta. Sendo eles também simétricas em relação a molécula.

**4.1.3 Síntese e Caracterização composto 2:** A Nitrofenilmaleimida foi purificada por cromatografia em coluna (CC) em sílica gel e CHCl<sub>3</sub> como eluente. A reação oferece rendimento global de reação de 78%. Após a purificação, a amostra foi aplicada em uma placa cromatografia de camada delgada (CCD) e eluida. Após a eluição, a placa foi revelada com luz ultravioleta, onde observando-se uma única mancha circular e bem definida, sinal que comprova a pureza da amostra. Após a purificação, o composto foi solubilizado em CDCl<sub>3</sub> e analisado por ressonância magnética nuclear (RMN) do <sup>1</sup>H Figura 22 e <sup>13</sup>C Figura 23.



Figura 22 1H-NMR (500 MHz) em CDCl3 do composto 2

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz. CDCl<sub>3</sub>) da nitrofenilmaleimida apresenta um singlete em 6.93 ppm, atribuídos ao grupo vinilico do anel maleimida. O sinal em 7.69 ppm, integra para dois hidrogênios e apresenta-se como um dublete com J<sup>3</sup>=10.0. Este sinal, foi atribuído aos hidrogênios **Orto**, das posições H-6 e



H-10 do anel benzênico. Em 8.34 ppm tem-se um dublete com J<sup>3</sup>=10.0 atribuído aos hidrogênios H-7 e H-9 Da posição **Meta** do anel benzênico.

Figura 23 C-NMR (125 MHz) em CDCl<sub>3</sub> do composto 2

O espectro de <sup>13</sup>C RMN (125.5 MHz. CDCl<sub>3</sub>) da nitrofenilmaleimida apresenta um sinal de baixa intensidade em 166.4 ppm, referente às carbonilas (2C, C-1 e C-4) do anel maleimida. Em 146.5 ppm tem-se um sinal de baixa intensidade, referente ao C-8, carbono não acoplado a H e deslocado por efeito indutivo do grupo Nitro. O sinal em 137.1 ppm, também apresenta baixa intensidade, sendo atribuído ao C-5, C não acoplado a H. Já o sinal em 134.6, é atribuído aos dois C sobrepostos do grupo vinílico C-2 e C-3. Os carbonos 2C **Orto** (C-6 e C-10) foram assinalados em 125.5 ppm enquanto que os 2C aromáticos **Meta** das posições C-7 e C-9 em 124.5 ppm.

Ambos os espetros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C apresentam excelente resolução. A pureza da amostra foi confirmada pela ausência se sinais não atribuídos a amostra. A caracterização da amostra foi realizada de forma inequívoca por atribuição de cada sinal ao <sup>1</sup>H ou <sup>13</sup>C correspondente. Entre as atribuições podemos destacar no espectro de RMN <sup>1</sup>H, a presença de dois singletes

sobreposto em 6.93 ppm. Este sinal é atribuído ao grupo vinílico do anel maleimida referente aos hidrogênios H-2 e H-3. Portanto, este sinal é considerado um indicativo do anel maleimida. Para este composto, também foi observado uma grande separação entre os sinais do anel benzênico. Foi observado um dublete em deslocamento químico ( $\delta$ ) 7.69 ppm atribuído aos hidrogênios H-6 e H-10, e outro dublete em  $\delta$  8.34 ppm para os hidrogênios H-7 e H-9. Esta grande separação entre os sinais do anel benzênico é justificada pela indução do grupo nitro que é retirador de densidade eletrônica do anel, com maiores influências nas posições **orto** (H-7 e H-9). Assim, estes sinais apresentam-se em campos mais baixos, maiores  $\delta$ . Os sinais para os hidrogênios H-6 e H-10 foram deslocados para 7.69 ppm devido principalmente ao efeito indutivo do grupo (O=C-N-C=O) que se encontra na posição **orto**. Uma vez que estes hidrogênios estão em **Meta** ao grupo nitro, são pouco afetados por este grupo. O espectro de RMN<sup>13</sup>C, apresenta dois sinais em 124.47 e 124.49 ppm, para os carbonos C-7 e C-9, do anele benzênico.

Apesar destes carbonos serem simétricos, estes aparecem separados no espectro. Está excelente resolução, com separação dos sinais, é atribuída a presença de campo nos cones de proteção e desproteção do NO<sub>2</sub>. Os carbonos são simétricos em relação ao anel benzênicos, mas ocorre uma pequena torção quanto ao campo de proteção/desproteção do grupo NO<sub>2</sub>. Em 134.6 ppm, encontra-se um único sinal referente aos carbonos C-6 e C-10, que também são simétricos. No entanto, estes carbonos, não estão susceptíveis aos efeitos de campo. Estes carbonos, apresentam maior distância ao grupo NO<sub>2</sub> e aos grupos C=O. Em 137.1 ppm se encontra o sinal de menor intensidade que corresponde ao carbono C-5, quaternário, que apresenta maior tempo de relaxação. Em 146.5 ppm temos um outro sinal de baixa intensidade paro o carbono C-8, que também é quaternário. Já os carbonos das carbonilas C-1 e C-4 aparecem em 166.5 ppm. A inspeção do espectro 1D se mostrou satisfatória para uma elucidação inequívoca da molécula de nitrofenilmaleimida.

**4.1.4 Síntese e Caracterização do composto 3:** A Vinilmaleimida, molécula nova, foi purificada por cromatografia em coluna (CC) e sua pureza determinada por CCD, onde foi confirmada a presença de uma única mancha, circular e bem definida no visível e confirmada no ultravioleta. O rendimento global da reação foi determinado em 68%. Após a purificação a molécula foi analisada por espectrometria de massa de alta resolução no modo positivo, sendo determinada em 222,0527. A massa teórica foi determinada em 222,0531 g/mol, diferença de 0,00018% porcentagem inferior à tolerância de 0,04%, o espectro de massa esta apresentado na Figura 24.



Figura 24 Espectro de massa composto 3

A análise por Infravermelho (IV) foi realizada em KBr e inspecionado nas suas principais bandas. Foram observadas as bandas em: 3069,94 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>=C), 2353,28 cm<sup>-1</sup> (C-N), 1703,25 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1606,27 cm<sup>-1</sup> (ArC) e 1405,39 cm<sup>-1</sup> (C-N). O espectro IV, apresentado na Figura 25, permite a identificação de todos os grupos funcionais.



Figura 25 Espectro IV do composto 3

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz CDCl<sub>3</sub>) da vinilmaleimida: Observa-se uma excelente resolução dos sinais de 1H conforme a Figura 26. Os sinais do anel benzênico são susceptíveis aos efeitos indutivos, tanto do anel maleimida, como o do grupo vinílico. A conjugação com o grupo vinílico desloca os hidrogênios H-7 e H-9, para  $\delta$  7.51 e 7.48 ppm. Estes sinais aparecem como Dubleto de Dubleto (DD) sobrepostos em um sistema ABC, isto ocorre pelo acoplamento em J<sup>3</sup>, com H-6 e H-10 e os acoplamentos a longa distância (J<sup>4</sup>) do anel benzênico. Os hidrogênios H-6 e H-10, são mais susceptíveis, aos efeitos indutivos de (O=C-N-C=O), e aparecem em  $\delta$  7.32 e 7.29 ppm. Estes hidrogênios também aparecem como DD sobrepostos em um sistema ABC, por J<sup>3</sup> com H-7 e H-9 e os acoplamentos a longa distância (J<sup>4</sup>) do anel benzênico. Em 6.85 ppm observa-se o singlete (s) sobreposto referente aos hidrogênios H-2 e H-3 do grupo vinílico do anel maleimida. O grupo vinílico conjugado ao anel benzênico é perfeitamente caracterizado pelo sinal DD centrado em 6.73 ppm com J<sup>3</sup>= 1,00 referente ao acoplamento em *trans* e J<sup>3</sup>=0,95 referente ao acoplamento em *cis*.



Figura 26 Espectro RMN 1H do composto 3 em CDCl3

A presença do grupo vinílico conjugado ao anel benzênico, visa ampliar a atividade biológica por aumentar os sítios de ataque enzimático via reação de Michael nas enzimas de microrganismos.

**4.1.5 Síntese e Caracterização do composto 4:** A 4-Clorofenilmaleimida foi caracterizada por espectrometria de massa de alta resolução, sendo sua massa determinada em 208,0154 g/mol. A massa teórica foi calculada em 208,0159 g/mol, diferença de 0,00024% porcentagem inferior à tolerância de 0,04% porcentagem dentro da tolerância. O espectro de massa é apresentado na Figura 27.



Figura 27 Espectro de massa de 4 - Clorofenilmaleimida (Composto 4)

A 4-Clorofenilmaleimida foi também caracterizada por espectroscopia vibracional no infravermelho (IV). O espectro IV está apresentado na Figura 28.



Figura 28 Espectro IV do 4 – Clorofenilmaleimida (composto 4)

O espectro IV apresenta uma banda em 2517,46 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento C-N do anel maleimida. Já a banda referente às carbonilas (C=O) encontrou em 1712,8 cm<sup>-1</sup>. Já o anel benzênico foi caracterizado1596,62 cm<sup>-1</sup>, sendo confirmado também pela banda em ≈3080 referente a carbono sp<sup>2</sup>. Já as bandas em 1309,79 cm<sup>-1</sup> e 708,77 cm<sup>-1</sup> são referentes ao estiramento (C-CI). A inspeção do espectro confere para a 4–Clorofenilmaleimida como já indicada no espectro de massa.

A confirmação de forma inequívoca da molécula 4- clorofenilmaleimida foi determinada por espetroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). O espectro de RMN<sup>1</sup>H, está apresentado na Figura 29.



Figura 29 Espectro RMN 1H do composto 4 em CDCl3

No espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz. CDCl<sub>3</sub>): Os hidrogênios benzênicos são desdobrados por efeitos indutivos do cloro e do anel maleimidas e encontrando-se em 4 conjuntos de sinais centrados em  $\delta$  7.46; 7.43; 7.33 e 7.30 ppm. Os sinais referentes ao H-7 e H-9, que são localizados na posição Orto ao Cloro, são observados em  $\delta$  7.46 e 7.43 ppm no espectro de RMN 1H sendo mais susceptíveis aos efeitos indutivos do Cloro apresentando  $\delta$  em 7.46; 7.43 ppm. Já os hidrogênios H-6 e H-10, encontram-se em  $\delta$  7.33 e 7.30 ppm do espectro de RMN 1H. O anel benzênico compõe um sistema AABB. A sobreposição de sinais centrais apresenta maior intensidade. Apesar do anel

benzeno apresentar um plano de simetria, os hidrogênios aromáticos sofrem um novo desdobramento. Um dos lados do anel está mais afetado pelo campo da carbonila que o outro, assim sofrendo um novo desdobramento apresentando 4 sinais para os hidrogênios aromáticos. Já os 2 hidrogênios referente ao grupo vinil do anel maleimida encontra-se como um singlete em  $\delta$  6.86 ppm.

O composto 4, por apresentar em sua estrutura o halogênio cloro (Cl), e este possuir uma alta eletronegatividade, causa um efeito "retirador de elétron" no carbono do anel da maleimida. A presença do cloro, afeta a densidade eletrônica no anel benzeno, assim, é esperado que o composto tenha sua reatividade alterada tanto pela reação Michel com pela reação de Diels-Alder e visto que ambas as reações são susceptíveis à densidade da nuvem eletrônica.

## 5. TESTE DIFUSÃO EM DISCO DERIVADOS DE MALEIMIDAS

Os compostos 3 e 4 foram testados em quatro cepas bacterianas diferentes e como controle o antibiótico Estreptomicina. A Figura 30 ilustra uma das placas utilizadas para realização dos testes.



Figura 30 Teste difusão em disco placa de petri

Os resultados dos testes referentes ao raio de inibição em mm e seus respectivos desvios padrões são apresentados na Tabela 2.

Bactérias	Raio de inibição (mm)			
	3	4	DMSO	Estreptomicina
S. Aureus (Staphylococcus Aureus) – Gram positiva.	15,01 ± 0,9167*	16,65 ± 2,7812*	4,63 ± 4,0301*	13,51 ± 0,0000*
Listéria Monocytose – Gram positiva.	17,78 ±1,1263*	20,38 ± 0,5612*	0,00 ± 0,0000*	13,63 ± 0,0000*
Escherichia Coli Enteropatogênica (EPEC) – Gram negativa.	9,84 ± 0,4158*	11,19 ± 1,0336*	0,00 ±0,0000*	16,37 ± 0,0000*
Pseudomonas Aeruginosa – Gram negativa.	10,57 ± 2,3205*	12,83 ± 2,0050*	$0,00 \pm 0,0000^{*}$	15,23 ± 0,0000*

Tabela 2 Teste difusão em disco compostos 3 e 4

Desvio padrão

De acordo com a Tabela 2, a reatividade dos compostos 3 e 4 foi positiva em relação às quatro bactérias testadas. Os compostos 3 e 4 apresentaram maiores reatividades para a bactéria *Listéria Monocytose* - Gram-positiva com um raio de inibição de 17,78 mm e 20,38 mm, respectivamente. O antibiótico Estreptomicina atingiu maior atividade biológica do que os compostos 3 e 4 apenas para a bactéria *Escherichia Coli* Enteropatogênica (EPEC) – Gramnegativa com raio de inibição de 16,37 e para a bactéria *Pseudomonas Aeruginosa* – Gram-negativa apresentando raio de inibição de 15,23. Sendo uma indicação de que os compostos sintetizados possuem uma maior atividade biológica para as bactérias do tipo Gram-positiva.

O solvente DMSO apresentou um raio de inibição apenas para a bactéria *S. Aureus* (*Staphylococcus Aureus*) – Gram-positiva de 4,63 mm. Para assegurar que o DMSO não teve influência na atividade biológica dos compostos 3 e 4, o teste t foi realizado. O resultado do teste retornou um p<0,05 quando comparado os resultados do raio de inibição dos compostos 3, 4 e o DMSO. Assegurando assim que, existe uma diferença significante entre a atividade biológica dos compostos em comparação a inibição do DMSO.

# 6. SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

A separação dos compostos sintetizados através da técnica de cromatografia em coluna e cromatografia em placa é ilustrado na Figura 31.



Figura 31 Técnica de cromatografia em coluna e cromatografia em placa de sílica

A separação foi efetuada pelas técnicas de cromatografia em coluna (CC) e por cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa. Após purificação, as amostras foram aplicadas sobre uma placa CCD analítica e após a eluição, a placa foi analisada no visível/ultravioleta, sendo observado uma única mancha circular e bem definida evidenciando a pureza da amostra. Após a determinação da pureza, as amostras foram encaminhadas para a caracterização estrutural por múltiplas técnicas espectroscópicas. A separação dos compostos foi realizada de forma excecional, "não esperado" para este tipo de composto, visto que, compostos tetrapirrolicos são caracterizados por altos níveis de autoagregação de vido a ampla nuvem  $\pi$  apresenta por estes compostos. Os níveis de auto-agregação estão sujeitos a parâmetros físicos, conforma ilustra o esquema na Figura 32.



Figura 32 Esquema dos principais parâmetros físicos relevantes no equilíbrio monômeroagregado.

A auto-agregação ocorre em ampla extensão (A(n)), influenciando a polaridade quanto a dimensão do agregado.

### 7. SÍNTESES DOS FOTOSSENSIBILIZADORES CLORINICOS.

A reação de Diels-Alder (cicloadição 4 + 2) na clorinização do anel porfirinico, tem como dienófilo o grupo vinil conjugado as carbonilas do anel maleimida. Já a protoporfirina IX, oferece duas possibilidades de dieno que encontram nas posições destacadas na Figura 33 como **A** e **B**.



Figura 33 Esquema reacional de entre dienos e dienófilios

**7.1 Sínteses e Caracterização do composto 5A**: A fenilclorina A (clorina de anel A) e a fenilclorina B (clorina de anel B) foram obtidos pelo processo ilustrado no esquema na Figura 33, purificados por cromatografia em coluna usando gel de sílica como suporte oferecendo um rendimento global de 72%. Os isômeros foram separados por TLC preparativa. A fenilclorina A, foi isolada na mancha inferior, com Rf de 0,38. A caracterização estrutural foi realizada de forma inequívoca por espectrometria de massa de alta resolução, RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DPET 135) e 2D (COSY, NOESY, HMBC e HSQC). Os espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C são apresentados na Figura 34, já os demais espectros, encontram se nos Anexo IF gCOSY, Anexo IG gNOESY, Anexo IH gHSQC, Anexo IJ gHMBC, Anexo IK DEPT 135.



Figura 34 Espectro de massa para a fenilclorina A

A amostra foi analisada por infusão direta e no modo positivo. Apresentando um sinal em 764,3415 Figura 34, para o ion molecular M+1. A massa calculada foi de 764,3443 g/mol. O espectro de massa esta apresentado de forma integra no Anexo IB.

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para a fenilclorina A (composto 5A) é apresentado nas Figuras 35 e 36.



Figura 35 Espectro RMN  $^1\text{H}$  do composto 5A a 500.13 MHz em CDCl\_3



Figura 36 Espectro  $^{13}\text{C}$  do composto 5A a 125.77 MHz em CDCl\_3

A caracterização estrutural foi realizada por diversas técnicas: espectro UV-vis, espectrometria de massa de alta resolução sendo a massa do composto 5A determinada em 764,3415 g/mol e a análise por ressonância magnética nuclear (RMN) do <sup>1</sup>H (Figura 35) e <sup>13</sup>C (Figura 36). Os espectros de RMN do composto 5A apresentaram os seguintes resultados: <sup>1</sup>H NMR (CDCI3, 500.13 MHz)  $\delta$  (ppm): 2.47 e 2.38 (br s, 2H, H-22 e H-24); 2.07 (s, 3H, CH3-25); 3.15 (t, 2H, J = 7.8 Hz, H-132); 3.20 (t, 2H, J = 7.8 Hz, H-172); 3.40 (s, 3H, CH3-25); 3.15 (t, 2H, J = 7.8 Hz, H-132); 3.20 (t, 2H, J = 7.8 Hz, H-172); 3.40 (s, 3H, CH3-121); 3.45 e 3.48 (m, 2H, H-23 $\alpha$  e 23 $\beta$ ); 3.49 (s, 3H, CH3-181); 3.56 (s, 3H, CH3-71); 3.64 e 3.68 (2s, 3H e 3H; OCH3-134 e OCH3-174); 3.89 e 3.96 (m, 1H, H-22); 4.17 (t, 2H, J = 7.8 Hz, H-131); 4.29 e 4.30 (2dt,1H, J=7.8 e 4.4 Hz, H-171 $\alpha$  e 171 $\beta$ ), 4.65 (d, 1H, J = 8.6 Hz, H-21); 6.14 (d, 1H, J = 11.5 Hz, H-82 $\alpha$ ); 6.34 (d, 1H, J = 17.6 Hz, H-82 $\beta$ ); 6.66 e 6.70 (m, 2H, H-29 e 213); 6.94 e 6.97 (m, 3H, H-210,H-211 e H-212); 7.41 (t, 1H, J = 4.9 Hz, H-24); 8.18 (dd, 1H, J = 17.6 e 11.5 Hz, H-81); 9.10 (s, 1H, H-20); 9.33 (s, 1H, H-5); 9.67 (s, 1H, H-15), 9.85 (s, 1H, H-10).

<sup>13</sup>C NMR (CDCI3, 125.77 MHz) δ (ppm): 11.4 (C-121); 11.6 (C-181); 12.3 (C-71); 21.5 (C-171); 21.9 (C-131); 25.6 (C-23); 26.5 (C-25); 36.6 (C-172); 37.0 (C-22); 38.5 (C-132); 50.1 (C-21); 51.6 (C-134); 51.8 (C-174); 52.3 (C-2); 90.5 (C-5); 93.4 (C-20); 97.9 (C-15); 99.8 (C-10); 115.6 (C-24); 121.3 (C-82); 126.0 (C-210 e C-212); 128.1 (C-211); 128.6 (C-29 e C-213); 129.2 (C-7); 129.8 (C-81); 131.0 (C-18); 131.3 (C-28); 132.6 (C-9); 133.8 (C-8); 133.9 (C-16); 136.3 (C-17); 136.5 (C-12); 138.3 (C-6); 138.4 (C-19); 139.6 (C-13); 149.6 (C-14); 152.3 (C-4); 166.1 (C-1); 173.4 (C-133); 173.8 (C-173); 174.9 (C-27); 178.6 (C-26).

**7.2 Sínteses e Caracterização composto 5B**: A fenilclorina B foi isolada na mancha superior e apresenta Rf de 0,54. A caracterização estrutural foi realizada de forma análoga à fenilclorina A, por RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DPET 135) e 2D (COSY, NOESY, HMBC e HSQC) e espectrometria de massas de alta resolução, HPLC-massa. Os espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C são apresentados nas

Figuras 38 e 39, já os demais resultados de espectroscopia, encontram se nos Anexo IL gCosy, Anexo IM gnoesy, Anexo IN gHSQC, Anexo IO gHMBC, Anexo IP DEPT 135. A amostra foi analisada por infusão direta e no modo positivo, apresentando um sinal em 764,3422 m/z na Figura 37, para o íon molecular M+1. A massa calculada foi de 764,3443 g/mol. O espectro de massas está apresentado de forma integra no Anexo IC.





O rendimento global da reação para obtenção de fenilclorina A e B foi de foi de 72%, com os isômeros na proporção de 1:1, cada isômero apresenta um rendimento de 36%. O fator de retenção na TLC (Rf) do composto 5B foi determinado em 0,54. A caracterização estrutural foi realizada por espectro UV-vis, Massa de alta resolução 764,3422 g/mol e análise por ressonância magnética nuclear (RMN): <sup>1</sup>H NMR (CDCI3, 500.13 MHz)  $\delta$  (ppm): 2.43 (br s, 2H, H-21 e H-23); 2.07 (s, 3H, CH3- 25), 3.16 (t, 2H, J = 7.7 Hz, H-122), 3.20 (t, 2H, J = 7.7 Hz, H-82); 3.41 (s, 3H, CH3-131); 3.45 e 3.49 (m, 2H, H-23 $\alpha$  e H-23 $\beta$ ); 3.47 (s, 3H, CH3-71); 3.60 (s, 3H, CH3-171), 3.64 e 3.65 (2s, 3H e 3H; OCH3-124 e OCH3-84); 3.91 e 394 (m, 1H, H-22) 4.18 (t, 2H, J = 7.7 Hz, H-121); 4.32 (t, 2H, J = 7.7 Hz, H-81), 4.65 (d, 1H, J = 8.6 Hz, H-21); 6.10 (d, 1H, J = 11.5 Hz, H-182 $\alpha$ ); 6.32 (d, 1H, J=17.5 Hz, H-182 $\beta$ ) 6.65 e 6.72 (m, 2H, H-29 e 213); 6.92 e 6.99 (m, 3H, H-210, H-211 e H-212); 7.42 (t, 1H, J = 5.0 Hz, H-24) 8.12 (dd, 1H, J = 17.5 e 11.5 Hz, H-181); 9.27 e 9.28 (s, 2H, H-5 e H-20); 9.70 (s, 1H, H-10), 9.75 (s, 1H, H-15).

<sup>13</sup>C NMR(CDCl3, 125.77 MHz) d (ppm): 11.2 (C-131); 11.7 (C-71); 12.4 (C-171); 21.6 (C-81); 21.9 (C-121); 25.6 (C-23); 26.5 (C-25); 36.7 (C-82); 37.0 (C-122); 38.6 (C-22); 50.1 (C-21); 51.6 (C-124); 51.7 (84); 52.2 (C-2); 90.0 (C-5); 94.2 (C-20); 98.4 (C-10); 99.4 (C-15); 116.0 (C-24); 120.9 (C-182); 126.0 (C-29 e 213); 128.1 (C-211); 128.5 (C-210 e 212); 129.9 (C-181); 131.3 (C-9); 131.4 (C-17); 133.4 (C-16); 133.9 (C-8); 136.1 (C-19); 137.5 (C-13); 137.9 (C-7); 139.1 (C-12); 139.7 (C-14); 149.7 (C-11); 151.2 (C-4); 163.9 (C-6); 165.9 (C-1); 173.4 (C-83); 173.8 (C-123); 174.7 (C-26); 178.6 (C-27).



Figura 38 Espectro RMN <sup>1</sup>H do composto 5B a 500.13 MHz em CDCl3



Figura 39 Espectro <sup>13</sup>C do composto 5B a 125.77 MHz em CDCl3

As fenilclorina A e B fornecem um modelo para a síntese de clorinas a partir de maleimidas. Todas as estruturas obtidas foram caracterizadas de forma inequívoca, por RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DPET 135) e 2D (COSY, NOESY, HMBC e HSQC) e massa de alta resolução, HPLC-massa.

A fenilclorina com um menor fator de retenção (Rf), fenilclorina A, apresenta no espectro NOESY correlaçãoes do hidrogênio meso na posição H-20 (9.10 ppm) com H-2<sup>1</sup> (4.65 ppm) e H-20 com a metila do anel clorinico em 2<sup>5</sup> (3.15 ppm). A correlação entre H-2<sup>1</sup> e H-2<sup>2</sup>/H-2<sup>5</sup> confirma a adição cis-endo. Para o produto de maior Rf, O hidrogênio em H-2<sup>4</sup> (vinílico) do anel formado a partir da cicloadição, apresenta correlação com H-5, no entanto, H-5 na apresenta correlação com os hidrogênios vinílicos H-8<sup>1</sup> e H-8<sup>2</sup>.

A metila em 7<sup>1</sup> apresenta correlação com 5-H e H-8<sup>2β</sup>, já a correlação entre o H-10 com H-8<sup>1</sup>, confirma a posição do grupo vinílico. A análise do NOESY, juntamente com os demais espectros bidimensionais (gCosy, gHMBC e gHSQC) confirma de forma inequívoca que os compostos com menor Rf, são produtos da reação da maleimida com o anel A da Pp IX dimetil ester. Já o isômero de maior Rf, foi atribuído pela mesma estratégia, e mostra correlação NOE entre H-2<sup>1</sup> com o meso H-20.

A correlação entre H-2<sup>1</sup> e H-2<sup>2</sup>/H-2<sup>5</sup> confirma a adição cis-endo. O H-2<sup>4</sup> do novo grupo vinílico formado pela reação de ciclo adição, apresenta correlação com o H-5. A correlação entre o17<sup>1</sup> com H-5/H-18<sup>2β</sup>, e a correlação entre o vinilico H-18<sup>1</sup> com H-20, define que este isômero se refere ao produto da reação de cicloadição no anel B da Pp IX dimetil ester, a análise das demais espectroscopias nos anexos confirmam a caracterização estrutural.

**7.3 Sínteses e Caracterização composto 6A**: Pela mesma rota sintética descrita anteriormente, onde o Pp IX etil ester foi utilizado como dieno e a 4-Nitro-fenilmaleimida como dienófilo, foram obtidas clorinas funcionalizadas com grupo nitro: 4-Nitro-fenilmaleimidaclorina A. O espectro de massa de alta resolução, foi realizado no modo positivo apresentando um sinal em 837,3623 m/z para o íon molecular (M + 1) ilustrado na Figura 40, a massa calculada foi de 837,3606 (Anexo ID).



Figura 40 Espectro de Massa da nitrofenilclorina A





Figura 41 Espectro RMN <sup>1</sup>H do composto 6A a 500.13 MHz em CDCl3



Figura 42 Espectro <sup>13</sup>C do composto 6A a 125.77 MHz em CDCl3

**7.4 Sínteses e Caracterização composto 6B**: O composto 4-Nitrofenilmaleimidaclorina B (composto 6B), também foi obtido a partir de Pp IX etil ester como dieno e 4-Nitro-fenilmaleimida com dienófilo. O espectro de massa de alta resolução, foi realizado no modo positivo apresentando um sinal em 837,3618 m/z, Figura 43, para o íon molecular (M + 1). A massa calculada foi de 837,3606 (Anexo IE). Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C são apresentados nas figuras 44 e 45.



Figura 43 Espectro de Massa da nitrofenilclorina B

A reação ocorreu com excelente rendimento de 76% para a 4-Nitrofenilmaleimidaclorina , obtendo-se os isômeros nas proporções de 1:1. O maior rendimento, pode ser atribuido ao efeito retirador de elétrons do grupo nitro posibilitanto uma melhor aproximação entre o HOMO e LUMO. Além de oferecer melhor rendimento, o grupo nitro, aumenta a polaridade da molécula, permitindo assim uma melhor interação com sistema fisiológico (polar). Outro fator, é que o grupo nitro oferece uma série de possibilidades de reações possibilitando conectar a molécula com outras moléculas biodirecionadoras. A caracterização foi realizada por RMN <sup>1</sup>H a 500 MHz e RMN <sup>13</sup>C.



Figura 44 Espectro RMN <sup>1</sup>H do composto 6B a 500.13 MHz em CDCl3



Figura 45 Espectro <sup>13</sup>C do composto 6B a 125.77 MHz em CDCl3

O rendimento global do composto 6A foi de 76%. O fator de retenção na TLC (Rf) foi determinado em 0,42. A caracterização estrutural foi realizada por espectro UV-vis, Massa de alta resolução e análise por ressonância magnética nuclear (RMN): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz), $\delta$  (ppm) 2.45 e 2.36 (br s, 2H, H-22 e H-24); 1.17 e 1.18 (2t, 6H, CH<sub>3</sub>-135 e CH<sub>3</sub>-175); 2.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-25); 3.14 (t, 2H, J = 7.5 Hz, H-132); 3.19 (t, 2H, J = 7.5 Hz, H-172); 3.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-25); 3.14 (t, 2H, e 3.49 (m, 2H, H-23 $\alpha$  e 23 $\beta$ ); 3.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-181); 3.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-71); 3.97 e 4.01 (m, 1H, H-22); 4.12 e 4.18(m, 6H, H-131, H-134 e H-174); 4.32 (m, 2H, J=7.0 Hz H-171) 4.71 (d, 1H, J = 8.5 Hz, H-21); 6.16 (dd, 1H, J = 11.5 e 1.5 Hz, H-82 $\alpha$ ); 6.35 (dd, 1H, J = 17.7 e 1.5 Hz, H-82 $\beta$ ); 6.99 (d, J = 9.5 2H, H-29 e 213); 7.42 (t, 1H, J = 3.5 Hz, H-24); 7.82 (d, J = 9.5 2H, H-210 e H-212); 8.18 (dd, 1H, J = 17.7 e 11.5 Hz, H-81); 9.08 (s, 1H, H-20); 9.33 (s, 1H, H-5); 9.71 (s, 1H, H-15), 9.87 (s, 1H, H-10).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125.77 MHz) δ (ppm): 11.4 (C-121); 11.7 (C-181); 12.3 (C-71); 14.1 (C-175); 14.2 (C-135), 19.9 (C-171), 21.5 (C-131) 21.8 (C-171); 22.7 (C-131); 25.7 (C-23); 26.4 (C-25); 36.8 (C-172); 37.2 (C-22); 38.6 (C-132); 50.2 (C-21); 52.3 (C-2); 60.4 (C-174); 60.6 (C-134); 90.4 (C-5); 93.1 (C-20); 98.2 (C-15); 99.9 (C-10); 115.3 (C-24); 121.4 (C-82); 123.7 (C-210 e C-212); 126.5 (C-29 e C-213); 129.4 (C-7); 129.7 (C-81); 130.0 (C-18); 130.9 (C-28); 132.6 (C-9); 133.8 (C-8); 134.0 (C-16); 136.4 (C-17); 136.6 (C-12); 136.8 (C-11); 138.3 (C-6); 138.5 (C-19); 139.9 (C-13); 146.5 (C-211); 149.7 (C-14); 151.5 (C-4); 151.8 (C-3); 165.4 (C-1); 172.9 (C-133); 173.3 (C-173); 174.1 (C-27); 177.9 (C-26).

O rendimento global do composto 6B foi de 76%. O fator de retenção na TLC (Rf) foi determinado em 0,59. A caracterização estrutural foi realizada por espectro UV-vis, Massa de alta resolução e análise por ressonância magnética nuclear (RMN) do <sup>1</sup>H Figura 44 e do <sup>13</sup>C Figura 45, que apresentaram os seguintes resultados: <sup>1</sup>H NMR (CDCl3, 500 MHz),  $\delta$  (ppm): 2.45 (br s, 2H, H-21 e H-23); 1.15 e 1.17 (2t, 6H, CH3-125 e CH3-85); 2.10 (s, 3H, CH3-25), 3.15 (t, 2H, J = 8.0 Hz, H-122), 3.19 (t, 2H, J = 8.0 Hz, H-82); 3.43 (s, 3H, CH3-131); 3.47 (s, 3H, CH3-71); 3.48 e 3.50 (m, 2H, H-23 $\alpha$  e H-23 $\beta$ ); 3.62 (s, 3H, CH3-171), 3.95 e 4.00 (m, 1H, H-22) 4.10 e 4.19(m, 6H, H-121, H-124 e H-84); 4.32 (t, 2H, J = 8.0 Hz, H-81), 4.68 (d, 1H, J = 8.5 Hz, H-21); 6.12 (dd, 1H, J = 11.5 e 1.5 Hz, H-182 $\alpha$ ); 6.34 (dd, 1H, J = 17.5 e 1.5 Hz, H-182 $\beta$ ); 6.97 (d, J = 9.0 2H, H-29 e 213); 7.41 e 7.43 (m, 1H, H-24); 7.80 (d, 2H, J = 9.0, H-210 e H-212); 8.11 (dd, 1H, J = 17.5 e 11.5 Hz, H-181); 9.27 (s, 2H, H-5 e, H-20); 9.74 (s, 1H, H-10), 9.78 (s, 1H H-15).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl3, 125.77 MHz) δ (ppm): 11.3 (C-131); 11.7 (C-71); 12.4 (C-171); 14.1 (C-175); 14.2 (C-135); 21.5 (C-81); 21.8 (C-121); 25.6 (C-23); 26.6 (C-25); 36.8 (C-82); 37.2 (C-122); 38.7 (C-22); 50.1 (C-21); 52.2 (C-2); 60.6 (C-124); 60.6 (84); 90.1 (C-5); 94.4 (C-20); 98.7 (C-10); 99.6 (C-15); 115.8 (C-24); 120.7 (C-182); 129.8 (C-28); 129.9 (C-181); 123.4 (C-210 e C-212); 126.5 (C-29 e C-213); 133.6 (C-16); 133.9 (C-8); 136.8 (C-19); 146.5 (C-211);149.8 (C-4); 172.9 (C-83); 173.3 (C-123); 174.0 C-26); 177.8 (C-27).

**7.5 Sínteses e Caracterização Vinilclorinas: Compostos 7A e 7B:** As Vinilclorinas A e B, foram caracterizadas, pelos fatores de retenção (Rf) 0,2 e 0,3 e espectros UV-vis e Espectros de Fluorescência. As demais caracterizações foram limitadas por restrição de acesso a central analíticas do instituto de Química da Universidade de São Paulo.

7.6 Sínteses e Caracterização Cloroclorinas: Compostos 8A e 8B: As cloroclorinas A e B foram caracterizadas, pelos fatores de retenção (Rf) 0,2 e 0,3 e espectros UV-vis e Espectros de Fluorescência. As demais caracterizações foram limitadas por restrição de acesso a central analíticas do instituto de Química da Universidade de São Paulo.

## 8. ESPECTRO DE ABSORÇÃO E EMISÃO DE PORFIRINA E CLORINA

Para os compostos clorinicos, foi observado que ambos isômeros (**A** e **B**) apresentam espectros indistinguíveis tanto para a absorção no UV-Vis quanto para a emissão fluorescente, Figura 46. Estes resultados, mostram que os isômeros apresentam níveis de energia similares tanto para o estado fundamental quanto para o estado excitado.



Figura 46 Espectro de absorção porfirina (A) e clorina (B)

Já a clorinização do anel porfirinico, altera de forma bastante significativa a energia dos orbitais moleculares HOMO e LUMO, de modo que, fica impossibilitada uma segunda reação do outro dienofilo. Assim o anel clorinico fica estabilizado. Uma segunda reação, levaria ao anel bacterioclorinico. Desta forma, estima-se que, ocorreu alteração nos orbitais moleculares (Homo e LUMO) de tal forma que que fica impossibilitada uma sobreposição com os orbitais do dienófilo, agora do anel clorinico, como o dienófilo (maleimida), quesito necessário para a cicloadição 4 + 2 (reação de Diels–Alder).

A porfirina possui sua banda soret na faixa de (380-500) nm como ilustrado no espectro da Figura 46, sento esta banda resultante da transição  $\pi$  $\rightarrow \pi^*$ , a sua posição está sujeita a grande deslocamento por fatores de agregação; visto que, a auto-agregação é atribuída a interação entre os sistemas  $\pi$  do macrocíclico. Assim, dependendo da natureza da agregação, se tipo J ou tipo H, pode ocorrer deslocamentos batocrômicos ou hipsocrômico. Isto ocorre por incremento ou redução da energia de transição entre o Homo e o Lumo. Já as clorinas sintetizadas a partir das porfirinas apresentam a banda soret com máximo de absorção estabilizados em 402 nm. Esta estabilização da banda, decorre da estabilização da energia de transição entre o Homo e Lumo. Uma vez que, neste macrociclico o sistema  $\pi$  está estericamente impedidos de autoagregação por fatores geométricos, visto que, a referida clorina não apresenta a planaridade típica dos fotossensibilizadores tradicionais. Já as 4 bandas Qs, também característico do anel porfirínico, e decorrente de transições proibidas tipo n $\rightarrow \pi^*$  são afetadas por eliminação da dupla conjugada ao macrociclico aromático. Para estas clorinas as bandas Q1 e Q2, não apresentam maiores alterações em relação a porfirina de origem. Já a banda Q3 apresenta um deslocamento batocrômico acentuados e a banda que Q4 sofre um deslocamento batotocrômico de 630 para 666 nm (36 nm), com um incremento acentuado no épsilon. Resultado de uma maior probabilidade e da transição proibida tipo  $n \rightarrow \pi^*$  referente a esta banda. Por apresentar forte absorção na banda Q4 (elevado épsilon) na faixa terapêutica de (600-800 nm) é considerada ideal para aplicação em TFD(12).

Já o espectro de emissão fluorescente, apresentado à direita da Figura 46 B, apresenta máximo em 671 nm. Desta forma o deslocamento de Stokes, definido como a diferença entre os comprimentos de onda em que se encontram os picos de absorção e emissão é de 5 nm. Isto nos mostra que a molécula é bastante rígida, e indica que as perdas de energia por desativação do estado excitado através dos processos vibracionais deve ser baste reduzidas. Está rigidez é justifica pela pelo fato do produto de reação ser exclusivamente endo, apresentar e carbono sp3 em C-23. Assim os Hs da fusão do anel maleimida com o novo anel resultante (A ou B) são co-planares, ocupando uma mesma cara da molécula.

### 9. PLATAFORMA DE COMPOSTOS SINTETIZADOS.

A Figura 47 Ilustra de forma esquemática, o processo de obtenção e estrutura dos compostos sintetizados neste trabalho.



Figura 47 Estrutura dos compostos sintetizados

Os compostos foram caracterizados, polo espectro no ultravioleta visível, fluorescência, espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear. No entanto, as vinilclorinas (compostos 7A e 7B) e as clororoclorinas (composto 8A e 8B), estão pendentes para caracterização por espectrometria de massa e espectroscopia por ressonância magnética nuclear. Esta caracterização será realizada logo após o reestabelecimento destas atividades para ao público externo na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

A caracterização pendente é necessária para que os resultados sejam apresentados na íntegra, no entanto, a caracterização das estruturas que estão pendentes de Massa de alta resolução e RMN, pode ser confirmada de forma indireta, visto que, o dieno e o dienófilo foram caracterizados na íntegra. Adicionalmente, a clorinização pela cicloadição (4+2) pode ser confirmada através dos espectros de absorção e de emissão das moléculas resultantes. Já a pureza dos compostos foi caracterizada por cromatografia (CCD).

Na reação de clorinização, reação de Diels-Alder (cicloadição 4 + 2), foi observado que ambos os dienos oferecem a mesma probabilidade de reagirem com o dienófilo, resultando nas proporções de 1:1 entres os isômeros **A** e **B**. Já a polaridade dos isômeros é afetada pela posição da ciclização. Esta ligeira diferença de polaridade permite que os isômeros sejam separados por cromatografia.

Outro fato de interesse, é que, os novos anéis formados (A e B) possuem apenas um carbono sp<sup>3</sup>. Como o ângulo de um tetraedro é de 109,5°, pode-se estimar que o anel maleimida e o tetrapirrolico estejam em posições ortogonais e rígidas. Devido a esta conformação, estes compostos encontram-se estericamente impedidos e menos propensos a formarem estados agregados. Desta forma, as forças intermoleculares entre estes compostos assumem unicidade permanente, viabilizando uma perfeita separação por cromatografia. Os efeitos geométricos da molécula, também são evidenciados no espectro de RMN (ver espectros), para estes compostos, os espectros de RMN apresentam uma excelente resolução, não comum aos tetrapirrolicos. Está melhor resolução foi atribuída ao fato de as densidades da nuvem eletrônicas sobre os núcleos não serem alteradas com a concentração da amostra. A conformação dos anéis, impossibilita interações das nuvens  $\pi$ , de forma que interfere no efeito anisotrópico do dos anéis aromáticos.

#### 10. CONCLUSÕES

A platafoma de compostos sintetizada é composta por maleimidas e fotossensibilizadores clorinicos derivados de maleimidas. Estes compostos, foram caracterizados de forma direta e/ou indireta. Para as maleimidas foi determinada a atividade bactericida destes como sendo ligeiramente superior à estreptomicina. Sabe-se que, a atividade destas maleimidas é atribuída a ataque nucleofílicos de tioproteínas via reação tipo Michael. Já os fotossensibilizadores clorinicos também apresentam grupos vinílicos e/ou cabonílicos em anéis de 5 membros. Da mesma forma que as maleimidas, estes grupos estão susceptíveis ao ataque por espécies nucleofílicas. Assim, é esperado que seja mantido a atividade bactericida.

Foram obtidos 8 fotossensibilizadores clorinicos estericamentes impedidos de auto-agregação, sendo que 4 destes novos. Estes compostos estão impedidos de interações  $\pi$ - $\pi$ , desta forma, ficam reduzidas as forças intermoleculares entre moléculas do soluto e maximizada a interação com as moléculas do solvente. Estas propriedades são inéditas, e orientam para aplicações maximizando permeabilidade e difusão nos tecidos biológicos. Os fotossensibilizadores apresentam moléculas angulares e rígidas, com deslocamentos de Stoks de 4 nm, isto indica que que a molécula apresenta fotofísica maximizada, por redução dos modos vibracionais.

Além dos ganhos físicos e fotofisicos destes fotossensibilizadores, é esperado que os mesmos apresentem atividade bactericida no escuro e assim

tenhamos um efeito sinérgico entre a reação de Michael e os efeitos fotodinâmicos.
# **11.REFERÊNCIAS**

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015. In: Equipe Técnica Gvims/ggtes, editor. São Paulo; 2015.
- Aly K, Sayed M, Mohamed M, ... SK-M and, 2020 undefined. A facile synthetic route and dual function of network luminescent porous polyester and copolyester containing porphyrin moiety for metal ions sensor and dyes. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387181120300664
- Xu H, Baidoo KE, Wong KJ, Brechbiel MW. A novel bifunctional maleimido CHX-A" chelator for conjugation to thiol-containing biomolecules. Bioorganic Med Chem Lett. 2008 Apr 15;18(8):2679–83.
- 4. Fan Y, Lu Y, Chen X, Tekwani B, Li X-C, Shen Y. molecules Anti-Leishmanial and Cytotoxic Activities of a Series of Maleimides: Synthesis, Biological Evaluation and Structure-Activity Relationship. mdpi.com [Internet]. 2018 Nov 5 [cited 2021 Jun 9];23(11). Available from: www.mdpi.com/journal/molecules
- Sintesis (, Antimikrob K, Sebelas T, Maleimida T, Tang ), Chin S, et al. MALAYSIAN JOURNAL OF ANALYTICAL SCIENCES SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ELEVEN N-SUBSTITUTED MALEIMIDES. Malaysian J Anal Sci [Internet]. 2016 [cited 2021 Jun 9];20(4):741–50. Available from: http://dx.doi.org/10.17576/mjas-2016-2004-06
- Issa M, Dermatologia MM-A-AB de, 2010 undefined. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. SciELO Bras [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0365-05962010000400011&script=sci\_arttext&tlng=pt
- Liu W, Lei T, Song Z, Yang X, Wu C, ... XJ-O, et al. Visible light promoted synthesis of indoles by single photosensitizer under aerobic conditions. ACS Publ [Internet]. [cited 2021 Jun 22]; Available from: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.orglett.7b01367

- Feng X, Shi Y, Xie L, Zhang K, Wang X, Liu Q, et al. Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of a Porphyrin-Based Photosensitizer and Its Isomer for Effective Photodynamic Therapy against Breast Cancer. J Med Chem. 2018 Aug 23;61(16):7189–201.
- Wang Y, Xu S, Shi L, Teh C, Qi G, Liu B. Cancer-Cell-Activated in situ Synthesis of Mitochondria-Targeting AIE Photosensitizer for Precise Photodynamic Therapy. Angew Chemie. 2021 Jun 25;133(27):15072–80.
- Sessler JL, Seidel D. Synthetic Expanded Porphyrin Chemistry. Vol. 42, Angewandte Chemie - International Edition. 2003. p. 5134–75.
- Banfi S, Caruso E, Caprioli S, ... LM-B& medicinal, 2004 undefined. Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089604005012
- Uchoa AF, De Oliveira KT, Baptista MS, Bortoluzzi AJ, Iamamoto Y, Serra OA. Chlorin Photosensitizers Sterically Designed To Prevent Self-Aggregation. J Org Chem [Internet]. 2011 Nov 4 [cited 2021 Jun 10];76(21):8824–32. Available from: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo201568n
- Luepke KH, Suda KJ, Boucher H, Russo RL, Bonney MW, Hunt TD, et al. Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. Pharmacotherapy. 2017 Jan 1;37(1):71–84.
- Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for emerging pathogens. Vol. 325, Science.
   2009. p. 1089–93.
- Zhang G, Zhang S, Pan B, Liu X, medicinal LF-E journal of, 2018 undefined. 4-Quinolone derivatives and their activities against Gram positive pathogens. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523417309856
- Sintesis (, Antimikrob K, Sebelas T, Maleimida T, Tang ), Chin S, et al. MALAYSIAN JOURNAL OF ANALYTICAL SCIENCES SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ELEVEN N-SUBSTITUTED MALEIMIDES. Malaysian J Anal Sci [Internet]. 2016 [cited 2021 Jun 10];20(4):741–50. Available

from: http://dx.doi.org/10.17576/mjas-2016-2004-06

- 17. Tacconelli E, Mendelson M, Kluytmans J, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis Pacbio SequeITM View project Antimicrobial Resistance View project Gunnar Kahlmeter Clinical microbiology Articles Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Elsevier [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2021 Jun 10];18(3):318–27. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099
- Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. J Antibiot (Tokyo) [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2021 Jun 10];70(1):3– 24. Available from: www.nature.com/ja
- Panov A, Lavrenov S, ... AS-TJ of, 2019 undefined. Synthesis and antimicrobial activity of 3, 4-bis (arylthio) maleimides. nature.com [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.nature.com/articles/s41429-018-0122-3
- Khalafi-Nezhad A, Soltani Rad MN, Mohabatkar H, Asrari Z, Hemmateenejad B. Design, synthesis, antibacterial and QSAR studies of benzimidazole and imidazole chloroaryloxyalkyl derivatives. Elsevier [Internet]. 2005 [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089605000222
- Zhang T, Li C, Tian Y, Li J, Sun L, ... CZ-CC, et al. Synthesis and biological evaluation of dihydrotriazine derivatives as potential antibacterial agents. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001841717301948
- 22. De Mattos MC, Marzorati L. Michael addition. Mechanistic aspects. Quim Nova. 1999;22(5):710–4.
- Frayne SH, Murthy RR, Northrop BH. Investigation and Demonstration of Catalyst/Initiator-Driven Selectivity in Thiol-Michael Reactions. J Org Chem. 2017 Aug 4;82(15):7946–56.
- 24. Guaresti O, Basasoro S, Gonzalez K, ... AE-EP, 2019 undefined. In situ crosslinked chitosan hydrogels via Michael addition reaction based on water-soluble

thiol-maleimide precursors. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305719309565

- Sui X, Van Ingen L, Hempenius MA, Vancso GJ. Preparation of a rapidly forming poly(ferrocenylsilane)-poly(ethylene glycol)-based hydrogel by a thiol-michael addition click reaction. Macromol Rapid Commun. 2010 Dec 1;31(23):2059–63.
- Huang W, Wu X, Gao X, Yu Y, Lei H, Zhu Z, et al. Maleimide–thiol adducts stabilized through stretching. nature.com [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.nature.com/articles/s41557-018-0209-2
- Brocksom T, Nakamura J, ... MF-... the BC, 2001 undefined. The Diels-Alder reaction: an update. SciELO Bras [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532001000500004&script=sci\_arttext
- Amant A St., Lemen D, Florinas S, ... SM-B, 2018 undefined. UC Santa Barbara UC Santa Barbara Previously Published Works Title Tuning the Diels-Alder Reaction for Bioconjugation to Maleimide Drug-Linkers. ACS Publ [Internet]. 2018 Jul 18 [cited 2021 Jun 10];29(7):2406–14. Available from: https://pubs.acs.org/sharingguidelines
- Lemen D. A Reactive Antibody Platform for One-Step Production of Antibody-Drug Conjugates Through a Diels-Alder Reaction with Maleimide. researchgate.net [Internet]. 2019 Sep 18 [cited 2021 Jun 10];30(9):2340–8. Available from: https://pubs.acs.org/sharingguidelines
- Hargreaves MK, Pritchard JG, Dave HR. Cyclic carboxylic monoimides. Chem Rev. 1970 Aug 1;70(4):439–69.
- Hassanzadeh F, sciences EJ-J of research in medical, 2018 undefined. Cyclic imide derivatives: As promising scaffold for the synthesis of antimicrobial agents. ncbi.nlm.nih.gov [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6040154/
- 32. De Campos F, Corrêa R, De Souza MM, Yunes RA, Nunes RJ, Cechinel-Filho V. Studies on new cyclic imides obtained from aminophenazone with analgesic properties / Potent effects of a 3,4-dichloromaleimide derivative. Arzneimittel-Forschung/Drug Res. 2002;52(6):455–61.

- 33. Berghot MA, Gouda MA, El-Galil A, Khalil M. Synthesis and study of some new N-substituted imide derivatives as potential antibacterial agents Synthesis of Bioactive Heterocycles View project Synthesis, Antitumor and Antioxidant Evaluation of Some New Antipyrine Based Azo Dyes Incorporating Pyrazolone Moiety View project Synthesis and study of some new AE-substituted imide derivatives as potential antibacterial agents. Chem Pap [Internet]. 2010 [cited 2021 Jun 10];64(5):637–44. Available from: https://www.researchgate.net/publication/227004519
- Yunes JA, Cardoso AA, Yunes RA, Corrêa R, De Campos-Buzzi F, Filho Cechinel V. Antiproliferative effects of a series of cyclic imides on primary endothelial cells and a leukemia cell line. Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci. 2008;63(9– 10):675–80.
- Prado SRT, Cechinel-Filho V, Campos-Buzzi F, Corrêa R, Cadena SMCS, De Oliveira MBM. Biological evaluation of some selected cyclic imides: Mitochondrial effects and in vitro cytotoxicity. Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci. 2004;59(9–10):663–72.
- Mutlaq DZ, Shafiq Abd M. Synthesis and biological activity of some maleimide derivatives [Internet]. Journal of Basrah Researches. 2019 [cited 2021 Jun 10]. Available from: https://www.iasj.net/iasj/download/00d8ca47402e2e56
- 37. Ye X, Li X, Yuan L, Ge L, Zhang B, A SZ-C and S, et al. Interaction of houttuyfonate homologues with the cell membrane of gram-positive and gramnegative bacteria. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775707000179
- Bansode T, Shelke J, medicinal VD-E journal of, 2009 undefined. Synthesis and antimicrobial activity of some new N-acyl substituted phenothiazines. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523409003869
- Xu H, Baidoo K, Wong K, medicinal MB-B&, 2008 undefined. A novel bifunctional maleimido CHX-A "chelator for conjugation to thiol-containing biomolecules. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X08002977

- 40. N-PHENYLMALEIMIDE. Org Synth. 1961;41:93.
- Salewska N, Milewska MJ. Efficient method for the synthesis of functionalized basic maleimides. J Heterocycl Chem. 2014;51(4):999–1003.
- 42. Leavitt FC, Manuel TA, Johnson F, Matternas LU, Lehman DS. Novel Heterocyclopentadienes. II. J Am Chem Soc. 1960 Oct 5;82(19):5099–102.
- Cunha S, Rodovalho W, ... NA-J of the B, 2002 undefined. The Michael Reaction of Enaminones with N-(p-tolyl)-maleimide: Synthesis and Structural Analysis of Succinimide-enaminones. SciELO Bras [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532002000500014&script=sci\_arttext
- 44. FERNANDES AU et al. Terapia fotodinâmica: Mecanismos e perspectivas de desenvolvimento de novos fotossensibilizadores. J Bras Laser. 2007;11.
- 45. Catão M, Lima RF, Almeida CM, Nascimento L V. O Efeito Antimicrobiano da Terapia Fotodinâmica Sobre a Dentina Cariada Antimicrobial Effect of Photodynamic Therapy on Carious Dentin <sup>a</sup>Universidade Estadual da Paraíba, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PB, Brasil [Internet]. Vol. 16, UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde. 2014 [cited 2021 Jun 10]. Available from: https://revista.pgsskroton.com/index.php/JHealthSci/article/view/468
- Issa M, Boechat M, ... AF-S& C, 2016 undefined. Photodynamic therapy in Brazil:
  10 years of history. pdfs.semanticscholar.org [Internet]. 2016 [cited 2021 Jun
  10];8:17–22. Available from: http://dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.201683102
- 47. Schechtman B, Spectroscopy WS-J of M, 1970 undefined. Near infrared to vacuum ultraviolet absorption spectra and the optical constants of phthalocyanine and porphyrin films. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022285270900500
- 48. Mass O, Taniguchi M, Ptaszek M, ... JS-NJ of, 2011 undefined. Structural characteristics that make chlorophylls green: interplay of hydrocarbon skeleton and substituents. pubs.rsc.org [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://pubs.rsc.org/ko/content/articlehtml/2011/nj/c0nj00652a
- 49. Taniguchi M, Lindsey JS. Synthetic chlorins, possible surrogates for chlorophylls,

prepared by derivatization of porphyrins. Vol. 117, Chemical Reviews. American Chemical Society; 2017. p. 344–535.

- Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of Photodynamic Therapy on Inflammatory Signs and Two Selected Periodontopathogenic Species in a Beagle Dog Model. J Periodontol. 2005 Jul;76(7):1100–5.
- 51. Escobar P, Vera A, Neira L, ... AV-E, 2018 undefined. Photodynamic therapy using ultradeformable liposomes loaded with chlorine aluminum phthalocyanine against L.(V.) braziliensis experimental models. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489418301267
- Davia K, King D, Hong Y, Communications SS-IC, 2008 undefined. A porphyrin– ruthenium photosensitizer as a potential photodynamic therapy agent. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138770030800083X
- Singh S, Aggarwal A, Bhupathiraju NVSDK, Arianna G, Tiwari K, Drain CM. Glycosylated Porphyrins, Phthalocyanines, and Other Porphyrinoids for Diagnostics and Therapeutics. Vol. 115, Chemical Reviews. American Chemical Society; 2015. p. 10261–306.
- 54. Ko Y, Yun K, Kang M, Park J, ... KL-B& medicinal, 2007 undefined. Synthesis activities and in vitro photodynamic of water-soluble fluorinated tetrapyridylporphyrins as tumor photosensitizers. Elsevier [Internet]. [cited 2021 10]; Available from: Jun https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X07002661
- 55. Gupta S, Dwarakanath B, ... KM-J of photochemistry, 2003 undefined. Cellular uptake, localization and photodynamic effects of haematoporphyrin derivative in human glioma and squamous carcinoma cell lines. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134402004086
- Strakhovskaya MG, Zhukhovitskii VG, Mironov AF, Seregin AM, Stranadko EF, Rubin AB. Fungicidal activity of khlorin photosensitizers. Dokl Biochem Biophys. 2002;384:155–8.

- Rotomskis R, Bagdonas S, Streckyte G, Wendenburg R, Dietel W, Didziapetriene J, et al. Phototransformation of sensitisers: 3. Implications for clinical dosimetry. Lasers Med Sci. 1998;13(4):271–8.
- Ferreira J, Menezes PFC, Kurachi C, Sibata C, Allison RR, Bagnato VS. Photostability of different chlorine photosensitizers. Laser Phys Lett. 2008 Feb;5(2):156–61.
- 59. Oliveira D. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas Basic Concepts and Applications of Porphyrins, Chlorins and Phthalocyanines as Photosensitizers in Photonic Therapies. Rev Virtual Quim [Internet]. 2015 [cited 2021 Jun 10];7(1):310–35. Available from: http://www.uff.br/rvq
- Taniguchi M, reviews JL-C, 2017 undefined. Synthetic chlorins, possible surrogates for chlorophylls, prepared by derivatization of porphyrins. ACS Publ [Internet]. [cited 2021 Jun 10]; Available from: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.5b00696
- Coskun O. Separation Tecniques: CHROMATOGRAPHY. North Clin Istanbul. 2016;3(2):156–60.

### ANEXO IA - ESPECTRO DE MASSA FENILMALEIMIDA





### ANEXO IB - ESPECTRO DE MASSA FENILCLORINA A

Equipamento: MicroTOF Ic Bruker Daltonics Capillary: 4000V Nebulizer: 0,4 Bar Dry Gas: 5,0 l/min Temp: 180 Data: 16/10/19

Amostra: fenilmaleimida A ESI + MeOH:H2O (50:50)





- 2 765.3450 45.4
- 3 766.3472 11.3
- 4 767.3531 1.9

### ANEXO IC - ESPECTRO DE MASSA FENILCLORINA B

Equipamento: MicroTOF Ic E

Bruker Daltonics

Capillary: 4000V

Nebulizer: 0,4 Bar

Dry Gas: 5,0 l/min

Temp: 180

Data: 16/10/19

# Amostra: 1SB ESI + MeOH:H2O (50:50)





- # m/z I %
  - 1 764.3422 100.0
  - 2 765.3456 50.5
  - 3 765.7245 0.2
  - 4 766.3477 11.9
  - 5 767.3526 1.6

### ANEXO ID - ESPECTRO DE MASSA NITROFENILCLORINA A





### ANEXO IE - ESPECTRO DE MASSA NITROFENILCLORINA B



Amostra: Nitrofenilclorina B ESI + ACN:H2O (50:50)











## ANEXO IH - ESPECTRO gHSQC FENILCLORINA A



### ANEXO IJ - ESPECTRO gHMBC FENILCLORINA A



#### ANEXO IK - ESPECTRO DEPT FENILCLORINA A



ANEXO IL - ESPECTRO gCOSY FENILCLORINA B



### **ANEXO IM - ESPECTRO gNOESY FENILCLORINA B**



### ANEXO IN - ESPECTRO gHSQC FENILCLORINA B



# ANEXO IO - ESPECTRO gHMBC FENILCLORINA B



### ANEXO IP - ESPECTRO DEPT FENILCLORINA B

#### Synthesis of N-substituted Maleimides Potential Bactericide

A.C. Trindade<sup>1</sup> e A.F. Uchoa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Anhembi Morumbi University (UAM), Biomedical Engineering Center - Estrada Dr. Altino Bondensan, 500 Distrito de Eugênio de Melo, CEP: 12.247-016 - São José dos Campos - SP
<sup>2</sup>Center for Innovation, Technology and Education (CITE) - Estrada Dr. Altino Bondensan, 500 - Distrito de Eugênio de Melo, CEP: 12.247-016 - São José dos Campos - SP - Brazil

Abstract- In view of the growing spread of antibiotic resistant bacteria causing high morbidity and mortality, it is essential to develop compounds that are more efficient than those currently on the market. Maleimide derivatives, due to their chemical structure, have biological activity capable of deactivating enzymes and inhibiting the metabolic pathway of these bacteria and fungi. They have high selectivity and are new excellent antimicrobials. In this scenario, the objective of this work was to synthesize, characterize and verify the existence of bactericidal activity of two derivatives of maleimides, 4-vinyl-phenyl-maleimide and Cl-phenylmaleimide. For this, the structures of the two compounds were characterized by High Resolution Mass Spectrometry (HRMS), Infrared (IR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) 1H. Both compounds showed a double bond in the maleimide ring, essential for the inhibition of enzymes present in bacteria. The disk diffusion test to determine the bactericidal activity of the compounds, was carried out against the microorganisms: S. Aureus (Staphylococcus Aureus) -Gram positive, Monocytosis Lister - Gram positive, Escherichia Coli Enteropathogenic (EPEC) - Gram negative and Pseudomones Aureginosas - Gram negative. Compounds derived from maleimide obtain greater biological activity in Gram positive microorganisms, as evidenced by the inhibition halo in the diffusion test. The compounds proved to be active in the face of the disk diffusion test, indicating new permeability, selectivity and mechanistic studies, as well as possible applications of them as bactericidal agents.

Keywords- Synthesis of maleimides, N-substituted maleimides, Bactericides, Bacteria, Biological activity, chemical compounds.

#### I. INTRODUCTION

It is known that the spread of antibiotic-resistant bacteria poses a considerable threat to humanity, as the main consequence of high morbidity and mortality. Currently, studies are focused on bacterial and fungal enzymes in charge of catalyzing the main biochemical reactions in microbial cells. Compounds with biological activity capable of deactivating these enzymes and inhibiting the metabolic pathways of these bacteria and fungi with high selectivity in the human body are promising antimicrobial agentes [1, 2, 31.

Maleimide derivatives have in their structure the group -CO-N (R) -CO- with R being a hydrogen, alkyl or aryl group. The double bond present in the maleimide ring is prone to be attacked by nucleophilic species such as the

thiol group present in the amino acid structure cysteine, thus, the enzymatic activity of the cysteine protease is altered and its growth is inhibited [4,5,6].

The maleimide group binds efficiently and specifically with biomolecules that contain the terminal thiol group and form a stable and irreversible covalent bond as shown in Fig.1 [7].



Fig. 1 Reaction between maleimide and the thiol group of biomolecules

Maleimides achieved relevant biological activities, including antimicrobial activities [8] and enzyme inhibition [9]. The antimicrobial mechanism was studied and found that maleimides could preferentially interact with the hydrophobic domains of the target enzymes, resulting in the inactivation of sulfhydryl groups essential for their catalytic activities [9]. The activities were greatly affected by the structure of the C = C double bond present in the maleimide ring [10].

There is a variation in the capacity of the biological activity of each maleimide depending on the group bound to nitrogen. In the case of the compounds proposed in this study, the presence of chlorine can potentiate the attack of the thiol group, as well as the presence of the vinyl group, in addition to the attack already described on the pair in the maleimide ring [11].

In this work, the synthesis of N-substituted maleimides was carried out, being them 4-vinyl-phenyl-maleimide (M1) and 4-Cl-phenyl-maleimide (M2). The structures of the synthesized compounds were characterized by means of Nuclear Magnetic Resonance (NMR), High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) and Infrared (IR) analysis. The analysis of the bactericidal activity of the compounds was performed using the disk diffusion test.

#### II. MATERIALS AND METHODS

For the synthesis of compounds M1 and M2, the anilines 4-vinylaniline, 4-chloroaniline and maleic anhydride were dissolved separately in ethyl ether, and after filtration they composed a single solution (50 mL), which was subjected to stirring for 15 minutes at room temperature. The precipitate was filtered and taken to the oven. After drying, the precipitate was heated in an oil bath at 72°C for 4 hours. After this period, the reaction medium was poured into a beaker with ammonia and ice solution. After neutralization (pH ~ 7), dichloromethane was added and partitioned. The organic phase was eliminated in a rotary evaporator and the solid residues were purified by column chromatography using silica gel as a support and 50:2 dichloromethane methanol as the mobile phase.

#### III. RESULTS AND DISCUSSION

The structures of the two synthesized maleimides are shown in Table 1

Table 1 Structure of N-substituted maleimide



#### A. Characterization - Mland M2

The compound M1 was characterized by a HRMS of 222.0527 g / mol. The theoretical mass was determined at 222.0531 g / mol, a difference of 0.00018%, a percentage lower than the 0.04% tolerance. The Fig. 2 (A) of IR, showed the results for M1: 3069.94 cm-1 (CH<sub>2</sub> = C), 2353.28 cm-1 (C-N), 1703.25 cm-1 (C = O), 1606.27 cm-1 (ArC) and 1405.39 cm -1 (C-N).

The compound M2 showed by a HRMS of 208.0154 g / mol. The theoretical mass was determined at 208.0159 g / mol, a difference of 0.00024%, a percentage lower than the tolerance of 0.04%. The Fig. 2 (B) of IR showed the results for M2: 2517.46 (C-N), 1712.8 cm-1 (C=O), 1596.62 cm-1 (ArC), 1309.79 cm-1 and 708.77 cm-1 (C-Cl).



The analysis by NMR Fig. 3 (A) of compound M1 showed the following results: 1H NMR (500 MHz. CDC13): δH 7.51 - 7.35 (4H, ArH), δH 6.88 (2H, CH2 ), δH 6.71 2H, CH2). The NMR for compound M2 Fig. 3 (B) following results: 1H NMR (500 MHz. CDCl3): 5H 7.43 - 7.33 (4H, ArH), 5H 6.86 (2H, CH2).



Fig. 3 NMR of compounds M1 (A) e M2 (B)

#### B. Disk diffusion test

Compounds M1 and M2 were tested in four different bacterial strains and as a control the antibiotic streptomycin. The compounds were dissolved in Dimethylsulfoxide (DMSO) concentration of 0.25 mol / L, so the DMSO was also tested to ensure its insufficient biological activity. The test was performed using the disk diffusion method. The results are shown in Table 2 [12].

Table 2 Biological activity of the compounds in relation to the four bacteria

D. d. in	Inhibition zone (mm)*			
Bacteria	м	M2	DMSO	Streptomycin
S. Aureus (Staphylococcus Aureus) - Gram positive.	15,01	16,65	4,63	13,51
Monocytosis Lister - Gram positive.	17,78	20,38	0,00	13,63
Escherichia Coli Enteropathogenic (EPEC) - Gram	9,84	11,19	0,00	16,37
Pseudomones Aureginosas - Gram negative.	10,57	12,83	0,00	15,23

The DMSO solvent obtained an inhibition zone only for the bacterium S. Aureus (Staphylococcus Aureus) - Gram Positive 4.63 mm. To ensure that DMSO had no influence on the biological activity of the compounds, a statistical test was carried out. The result of the t test returned a p < 0.05when comparing the results of the zone of inhibition of compounds M1, M2 and DMSO. Thus ensuring that there is a significant difference between the biological activity of the compounds compared to the inhibition of DMSO.

According to Table 2, the reactivity of compounds M1 and M2 was positive in relation to the four bacteria tested. The compounds M1 and M2 showed greater reactivity for the bacterium Listéria Monocytose - Gram Positiva with an inhibition zone of 17.78 mm and 20.38 mm, respectively.

The streptomycin antibiotic achieved greater biological activity than the compounds M1 and M2 only for the Enteropathogenic bacteria - Gram Negative with an inhibition zone of 16.37 and for the Aureginosas - Gram Negative bacteria with an inhibition zone of 15.23. Being an indication that the synthesized compounds have a greater biological activity for Gram Positive bacteria.

#### IV. CONCLUSION

The results of the characterization studies of compound M1 and M2 show that the structures shown in Table 1 have been successfully synthesized. The two structures presented the double bond that tends to be attacked by nucleophilic species, the thiol group, present in bacteria. The biological activities of compounds M1 and M2 were proven from the disk diffusion test, making the two compounds derived from N-substituted maleimides M1 and M2, potential bactericide candidates. However, the two compounds showed a greater zone of inhibition for Gram Positive bacteria. For further investigation, a more intensive study on Gram Positive and Gram negative bacteria should be carried out to assess the differences between the bactericidal activities of these synthesized compounds in relation to the two types of bacteria.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest

#### REFERENCES

- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi, A et al. (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the who priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. The Lancet Infectious Diseases 318–272 DOI 10.1016/s1473-3099(17)30753-3.
- Butler M, Blaskovich M, Cooper M (2016) Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. Springer Science and Business Media LLC 3-24 DOI 10.1038/ja.2016.72.
- Salewska N, Boros-Majewska J, Lcka I et al. (2012) Chemical reactivity and antimicrobial activity of n-substituted maleimides. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 117 – 124 DOI 10.17576/mjas-2016-2004-06.
- Bansode T, Shelke J, Dongre, G (2009) Synthesis and antimicrobial activity of some new n-acyl substituted phenothiazines. European Journal of Medicinal Chemistry 5094 -5098 DOI 10.1016/j.ejmech.2009.07.006.
- -3098 DOI 10.1010/j.ejmech.2009.07.006.
  5. Prado S., Cechinel-Filho V., Campos-Buzzi, F et al. (2004) Biological evaluation of some selected cyclic imides: mitochondrial effects and in vitro cytotoxicity. Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences 59(9-10): 663-672.
- Ye X, Li X, Yuan, L et al. (2007) Interaction of houttuyfonate homologues with the cell membrane of gram-positive and gramnegative bacteria. Colloids and Surfaces Physicochemical and Engineering Aspects 301(1-3): 412 – 418 DOI 10.1016/j.colsurfa.2007.01.012.
- Xu H Baidoo K, Wong K et al. (2008) A novel bifunctional maleimido chv-a" chelator for conjugation to thiol-containing biomolecules. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 2679 – 2683 DOI 10.1016/j.bmcl.2008.03.022.
- Chen X, Zhang L, Li F et al. (2015) Synthesis and antifungal evaluation of a series of maleimides. Pest Manag. Sci 433–440 DOI 10.1002/ps.3824.
   Silvia N, Maria, V (2005) In vitro antifungal properties,
- Silvia N, Maria, V (2005) In vitro antifungal properties, structure-activity relationships and studies on the mode of action of N-phenyl, N-aryl, N-phenylalkyl maleimides and related compounds. Arzneim-Forsch 123–132.