



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I- CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FÁRMACIA

DENISE NASCIMENTO PEREIRA

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
DERIVADOS FENILACRILATOS SUBSTITUÍDOS.**

CAMPINA GRANDE-PB

2016

DENISE NASCIMENTO PEREIRA

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
DERIVADOS FENILACRILATOS SUBSTITUÍDOS.**

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

Coorientador: Profa. Ms. Zilka Nanes Lima

CAMPINA GRANDE-PB

2016

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

P436a Pereira, Denise Nascimento.

Avaliação preliminar da atividade antibacteriana de derivados fenilacrilatos substituídos [manuscrito] / Denise Nascimento Pereira. - 2016.

59 p. : il. color.

Digitado.

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

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

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

1. Resistência antimicrobiana. 2. Atividade antibacteriana. 3. Fenilacrilatos. 4. Bactérias patogênicas. I. Título.

21. ed. CDD 615.1

DENISE NASCIMENTO PEREIRA

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
DERIVADOS FENILACRILATOS SUBSTITUÍDOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para a obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

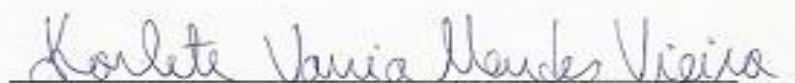
Área de concentração: Síntese e avaliação antibacteriana.

Aprovada em: 07/10/2016.

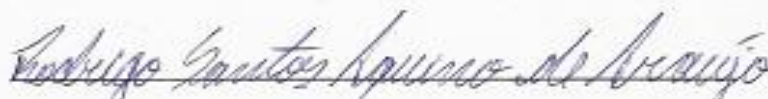
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dra. Karlete Vânia Mendes Vieira
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



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

Dedico este trabalho a minha mãe Josilene que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida, que sempre sem medir esforços dedica-se a realizar meus sonhos, e mostrar-me as experiências de vida e caráter.

Dedico não somente este trabalho, mas todos os meus sonhos e conquistas.

Obrigada, Mãe!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guiar, proteger e alertar, proporcionando a conquista de mais um objetivo.

A minha mãe, por ser minha companheira de todas as horas, minha fortaleza e a pessoa a quem sempre cultivou todos os valores que me transformaram na pessoa que sou hoje.

Ao meu pai, Heronides, "*In Memoriam*", meu primeiro admirador e incentivador. A quem sempre lembrarei e sentirei saudades.

A minha família, que sempre torceram e apoiaram todos os meus planos e sonhos. Especialmente as minhas irmãs Daiana e Debora, que estiveram disponíveis sempre que precisei.

Aos meus sobrinhos, aos quais tenho um carinho e amor sem limites, que me proporcionaram momentos de alegria em meio ao cansaço diário.

Ao professor Dr. Ricardo Olímpio de Moura, pela oportunidade de poder fazer parte da sua linha de pesquisa, por me orientar nesse projeto, mesmo diante de toda a correria diária.

A professora Msc. Zilka Nanes Lima, que me acolheu, com todo carinho e atenção em seu grupo de pesquisa, ensinando-me a beleza do que é ser um pesquisador.

À banca examinadora por terem aceitado prontamente o convite para fazerem parte importante neste trabalho. Muito obrigada.

Aos meus colegas de laboratório, pela convivência diária e pelos bons momentos de descontração.

A Iara Maria pelas longas conversas pelos cantos da UEPB, pelos momentos que estive disponível para escutar as minhas histórias e meus desabafos.

Ao meu Clã (Ana Claudia, Anderson Fellyp, Cinthian, Maria Angélica, Wanessa e Willian) que desde o primeiro ano de faculdade se mostraram presentes. Pelos bons e mais divertidos momentos compartilhados. Vocês fizeram essa caminhada mais leve e prazerosa.

A Angélica Faustino e Rodrigo Demétrio, por serem amigos desde sempre, sempre lembrarei de vocês como os melhores amigos e seres que se pode conhecer e conviver. Por vocês sinto uma imensa gratidão e carinho. Eternas saudades.

Agradeço a todos que me ajudaram a concluir esta importante etapa da minha vida.

“ O futuro do homem não está nas estrelas, mas sim na sua vontade. ”

William Shakespeare

RESUMO

As infecções causadas por bactérias são umas das grandes preocupações dos profissionais de saúde, sendo frequentemente encontradas em unidades que atendem pacientes mais suscetíveis à infecção, como a pediatria, Unidades de Terapia Intensiva (UTI), unidades oncológicas e unidades de transplantes. O tratamento antibioticoterápico errôneo é um fator de contribuição de infecções que mais se discute na atualidade, pois é responsável pelo desenvolvimento de resistência bacteriana. A resistência aos antibióticos se desenvolve como uma consequência natural da habilidade da população bacteriana de se adaptar. Esse trabalho teve como objetivo a síntese, caracterização e avaliação preliminar da atividade antibacteriana dos derivados fenilacrilatos. Foram sintetizados dez derivados fenilacrilatos, por meio de reação de condensação do tipo Knoevenagel entre diferentes aldeídos aromáticos substituídos e o 2-cianoacetato de etila. Para a avaliação preliminar da atividade antibacteriana dos derivados foram feitos os testes de microdiluição em caldo para identificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada um dos derivados. Apenas o etil 2-ciano-3-(4-clorofenil) acrilato (AL-02) foi elucidado pela técnica de RMN ^1H e RMN ^{13}C , onde foi observado um pico em 8,41 ppm, correspondente ao grupo CH vinílico caracterizado na condensação. Nenhum dos compostos testados apresentou atividade significativa para a cepa de *Escherichia coli* ATCC, sendo ela caracterizada como uma cepa Gram negativa. Já para a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC, caracterizada como Gram positiva, os derivados etil 2-ciano-3-(4-clorofenil) acrilato (AL-02) e o etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato (AL-09) apresentaram CIM de 256 µg/ml e 16 µg/ml, respectivamente. Para a cepa de *S. aureus* resistente à meticilina, o AL-09 manteve sua atividade inibitória, embora em maior concentração, apresentando uma CIM de 128 µg/ml. Para os demais compostos da série a CIM se manteve igual a 512 µg/ml, com exceção ao composto AL-12 que apresentou uma CIM maior que 1024 µg/ml. Esses resultados validam o planejamento de novos candidatos a protótipos de fármacos antibacterianos.

PALAVRAS-CHAVES: Resistência antimicrobiana; Fenilacrilatos; Avaliação antibacteriana; Microdiluição, Protótipos.

ABSTRACT

Infections caused by bacteria is a larger preoccupation of health professionals, and they are often found in units that serve patients more susceptible to infection, such as pediatrics, intensive care units (ICUs), cancer units and transplant units. The wrong antibiotics therapy is a contribution to infections factor that is discussed present, it is responsible for the development of bacterial resistance. Antibiotic resistance develops as a natural consequence of the ability of the bacterial population to adapt. This study has as objective to the synthesis, characterization and preliminary evaluation of the antibacterial activity of phenyl acrylates derivatives. Ten phenyl acrylates derivatives were synthesized through the Knoevenagel type condensation reaction between the aromatic aldehydes and 2-substituted ethyl cyanoacetate. For preliminary evaluation of the antibacterial activity of the derivatives, were made broth microdilution tests to identify the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of each of the derivatives. Only the Ethyl 2-cyano-3- (4-chlorophenyl) acrylate (AL-02) was elucidated by NMR ^1H and ^{13}C technique, where a peak was observed at 8.41 ppm, corresponding to the vinyl group -CH characterized in condensation. None of the compounds tested showed significant activity to *Escherichia coli* ATCC strain, it is characterized as a Gram negative strain. For *Staphylococcus aureus* ATCC strain characterized as Gram positive, derivatives ethyl 2-cyano-3- (4-chlorophenyl) acrylate (AL-02) and ethyl 2-cyano-3- (2,6-dichlorophenyl) acrylate (AL-09) showed a MIC of 256 $\mu\text{g/ml}$ and 16 $\mu\text{g/ml}$, respectively. For the strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, AL-09 maintained its inhibitory activity, although at higher concentrations, presenting a MIC 128 $\mu\text{g/ml}$. For the other compounds in the series the MIC remained equal to 512 mg / ml, except for the AL-12 compound that showed the MIC was of 1024 $\mu\text{g/ml}$. These results validate the design of new candidates for antibacterial drugs prototypes.

KEYWORDS: antimicrobial resistance; Phenyl acrylates; antibacterial evaluation; Microdilution, Prototypes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da meticilina.....	21
Figura 2. Desenvolvimento de novos antibacterianos.....	23
Figura 3. Mecanismo de ação dos antimicrobianos.....	24
Figura 4. Permeação da parede celular Gram negativo e Gram positivo por β -lactâmicos.....	25
Figura 5. Esqueleto geral dos bioisómeros inibidores de β -lactamase.....	28
Figura 6: Esqueleto funcional dos ésteres.....	29
Figura 7. Fluxograma para determinação da CIM pelo método de microdiluição.....	36
Figura 8. Reação de oxirredução da resazurina.....	37
Figura 9. Esqueleto molecular geral dos derivados fenilacrilatos.....	38
Figura 10. Compostos fenilacrilatos substituídos.....	44
Figura 11. Estrutura dos isômeros AL-09 e AL-10.....	45
Figura 12. Estruturas dos derivados acrilatos ionizáveis.....	46

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reação de esterificação de Fischer.....	30
Esquema 2: Reação de condensação de 2-cianoacetato de etila com diferentes aldeídos.....	32
Esquema 3: Mecanismo de reação.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura molecular dos compostos fenilacrilatos e suas respectivas nomenclaturas.....	38
Tabela 2. Características físico-químicas dos derivados fenilacrilatos.....	40
Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima de derivados de fenilacrilatos frente à cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 e <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	43
Tabela 4. Atividade da CIM frente à cepa de <i>S. aureus</i> MRSA.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC american Type Culture Collection

BHI Brain Heart Infusion

CCD Cromatografia em Camada Delgada

CIM Concentração Inibitória Mínima

CLSI Clinical and Laboratorial standards Institute

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido Desoxirribonucleico

EtOH Etanol

FDA Food and Drug Administration

Log P Coeficiente de Partição

MRSA *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina

NAG N-acetilglicosamina

NAM Ácido N-acetilmurânico

NCCLS (National–Committee for Clinical Laboratory Standards

OMS Organização Mundial de saúde

RAM Resistência Antimicrobiana

RMN Ressonância Magnética Nuclear

UFC Unidades Formadoras de Colônias

VISA Resistência Intermediária à Vancomicina

VRSA Resistência total à Vancomicina

WHO World Health Organization

δ ppm Deslocamento Químico em Partes por Milhão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1. Bactérias Patogênicas	17
3.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	18
3.1.2. <i>Escherichia coli</i>	19
3.2. Resistência Bacteriana	20
3.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA)	21
3.3. Tratamentos das infecções bacterianas	22
3.4. Necessidade de novos agentes antibacterianos	25
3.5. Desenvolvimento de Fármacos	26
3.6. Ésteres	29
3.6.1. <i>Derivados ésteres de fenilacrilatos</i>	30
4. METODOLOGIA	32
4.1. Síntese dos compostos	32
4.1.1. <i>Procedimento Geral para obtenção dos derivados fenilacrilatos</i>	32
4.1.2. <i>Elucidação Estrutural</i>	33
4.1.3. <i>Avaliação da atividade antibacteriana dos derivados fenilacrilatos</i> ...	33
4.1.4. <i>Padronização da suspensão bacteriana</i>	34
4.1.5. <i>Preparo das soluções a serem testadas</i>	35
4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	35

4.2.1. Realização dos testes.....	35
4.2.2. Leitura dos ensaios com revelador	37
5. RESULTADOS E DISCURSÃO.....	38
5.1. Síntese e caracterização.....	38
5.1.1. Possível Mecanismo da Reação.....	40
5.1.2. Elucidação estrutural.....	42
5.2. Avaliação antibacteriana.....	43
6. CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO.....	57

1. INTRODUÇÃO

No decorrer das últimas décadas, o desenvolvimento de fármacos eficientes no combate a infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas. Por outro lado, a disseminação do uso de antibióticos lamentavelmente fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, com o consequente aparecimento de resistência (RANG, RITTER & DALE, 2001; VARALDO, 2002).

A resistência não é um fenômeno novo. No início foi reconhecida como uma curiosidade científica, mas logo se tornou uma ameaça à eficácia do tratamento. O desenvolvimento de novas famílias de antimicrobianos nas décadas de 50 e 60 e as modificações dessas moléculas nas décadas de 60 e 80 induziu uma falsa impressão de que seria possível estar diante dos agentes patogênicos. Entretanto, a geração de novos antibióticos está diminuindo e são poucos os incentivos para produção de novos medicamentos que permitam combater o problema da farmacorresistência, conforme descrito pela OMS (OMS, 2001).

O desenvolvimento da resistência é, de fato, algo muito preocupante uma vez que existem cepas resistentes a quase todos os agentes conhecidos atualmente e, neste sentido, há uma forte necessidade de se produzir novas substâncias que não só tenham bom espectro de atividade, mas que possuam novos mecanismos de ação (NISHAMINY, 2006).

Na busca de novos antimicrobianos que sejam eficazes no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, leva-se em consideração a descoberta de novos alvos e a potencialização da atividade de compostos com atividade antimicrobiana conhecida (FERNANDES et al., 1999). Dos fármacos introduzidos na terapêutica, apesar de não utilizar a bases moleculares das doenças como suporte para o planejamento de novos fármacos, entre uma das profícuas técnicas está a modificação molecular. Além disso, vale ressaltar que este tipo de metodologia se mostra claramente mais vantajosa tanto em termos de investimentos como em relação ao tempo de execução, já que a descoberta de um fármaco completamente novo chega a

custar, em média, cerca de quinhentos milhões de dólares e pode levar até quinze anos de estudos desde a sua concepção até o início dos testes clínicos (BARREIRO &FRAGA, 2008; WERMUTH, 2008; HANSCH, LEO, 1995; REZENDE et al., 2002; MASUNARI, REZENDE, TAVARES, 2004).

O combate à resistência bacteriana deve ser abordado sob vários aspectos. Desde o entendimento dos processos relacionados à ação dos antibióticos, até a síntese e avaliação farmacológica de novos agentes antimicrobianos mais potentes e sua posterior aplicação terapêutica, que deve ser de forma racional. Além disso, se faz necessário à adequação de normas para controle de infecções hospitalares, destacando que estes diferentes níveis de ações devem ser contínuos e interligados (SILVEIRA et al., 2006)

Sendo assim, diante do aumento dos casos de resistência bacteriana temos um aumento da necessidade de desenvolvimento de novos fármacos e novas classes de antibióticos, tanto para infecções adquiridas em hospitais quanto na comunidade. A partir disso, este trabalho visou a síntese e avaliação antibacteriana de uma série de derivados fenilacrilatos. Os quais foram submetidos a avaliação antibacteriana por testes em microdiluição em caldo Mueller Hinton através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada molécula sobre as estirpes em análise.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Sintetizar derivados fenilacrilados, através de reação de condensação e realizar avaliação preliminar da atividade antibacteriana desses compostos, pela técnica de microdiluição em caldo, frente a estirpes pré-selecionadas.

2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar derivados de fenilacrilatos;
- Caracterizar físico-quimicamente os compostos;
- Avaliar de forma preliminar a atividade antimicrobiana *in vitro* das moléculas sintéticas em seu estado puro frente às cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina;
- Identificar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de cada molécula testada.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Bactérias Patogênicas.

De acordo com a OMS, em 2007 aproximadamente 1,4 milhões de pessoas sofreram com infecção hospitalar, o que torna a utilização de antibióticos crucial para o tratamento destas (FADLI et al, 2012).

Dentre os microrganismos que provocam as infecções oportunistas estão às bactérias e os fungos, sendo que a maior preocupação da OMS em relação a estas infecções é o fato de que são provocadas por cepas resistentes. Estas são mais virulentas e não se enquadram no espectro de medicamentos atuais. De acordo com essa organização estas infecções causam 25% de mortes em todo o mundo e 45% nos países menos desenvolvidos (WANNMACHER, 2004).

As bactérias são organismos unicelulares. Como possuem núcleo envolto por uma membrana, as células são descritas como procarióticas. As três formas básicas de bactérias são os bacilos, os cocos e os espirilos. Dividem-se por fissão binária e muitas delas possuem flagelos. As bactérias podem utilizar uma grande variedade de substâncias químicas para a sua nutrição (TORTORA et al., 2010).

A parede celular circunda a membrana plasmática e protege a célula das alterações na pressão de água. Consiste de peptídeoglicano, um polímero composto de NAG e NAM e cadeias curtas de aminoácidos. A penicilina interfere com a síntese de peptídeoglicano. Divide-se em parede celular Gram positivas, que é composta por muitas camadas de peptídeoglicanos e também contêm ácidos teicoicos e lipoteicoicos, e Gram negativas, que possuem uma membrana externa de lipoproteína lipopolissacarídeo-fosfolípídeo, circundando uma fina camada de peptídeoglicano. A membrana externa protege a célula da fagocitose e da penicilina, lisozima e de outras substâncias químicas. O componente lipopolissacarídico da membrana externa consiste de açúcares (polissacarídeos O) que atuam como antígenos e de lipídeo A, que é uma endotoxina (TORTORA et al., 2010).

As infecções por microrganismos Gram negativos são menos frequentes, mas apresentam maior mortalidade quando comparadas aos Gram positivos. Dentre estes as espécies mais relevantes destacam-se: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Alguns fungos em especial os leveduriformes também podem estar associados a esse processo (OPLUSTIL et al., 2010).

3.1.1 *Staphylococcus aureus*.

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos Gram positivos, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto, pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção como: espinhas, furúnculos e celulites, até infecções graves tais como, uma pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras (SANTOS et al., 2007).

A característica isolada mais importante para classificar o gênero *Staphylococcus* é determinada pela prova da coagulase (KONEMAN et al., 2001), que avalia a capacidade de produção da enzima. Bactérias que produzem a coagulase são capazes de promover uma reação de coagulação, aglutinando o plasma humano ou de coelho. *S. aureus* são coagulase positivos (DEVRIESE et al., 2005).

S. aureus possui vários fatores de virulência que podem contribuir para sua capacidade de produzir doença. Entretanto, essas propriedades e genotipicidade não são constantes em todas as cepas de *S. aureus*. Os principais fatores de virulência são cápsula, peptidoglicano, ácidos teicoicos, proteína A, adesinas, hemolisinas, enzimas, toxinas extracelulares e leucocidinas (KONEMAN et al., 2001).

A distribuição de *S. aureus* é muito ampla, visto que essa bactéria é significativamente capaz de resistir à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira. Esse microrganismo pode ser encontrado no ambiente de circulação do ser humano, sendo o próprio homem seu principal reservatório, além de estar presente em

diversas partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele. Desses sítios anatômicos, as narinas possuem o maior índice de colonização, cuja prevalência é de cerca de 40% na população adulta, podendo ser ainda maior dentro de hospitais (BANNERMAN, 2003; CARVALHO et al, 2005; CAVALCANTI et al, 2005).

3.1.2 *Escherichia coli*.

Escherichia coli é um bastonete Gram negativo, anaeróbio facultativo, móvel ou imóvel. É um importante comensal da microbiota intestinal dos mamíferos saudáveis, coexistindo sem causar danos ao hospedeiro (NATARO E KAPER, 1998; WU et al., 2008). Sua parede celular é composta por uma camada de lipopolissacarídeos (LPS), a qual é formada por três camadas: uma interna, hidrofóbica, composta do lipídeo A (núcleo lipopolissacarídeo), uma média composta de oligossacarídeos e uma externa composta de polissacarídeos hidrofílicos, onde se localizam os antígenos O e K (HOGAN & SMITH, 2003). Baseada nas diferenças antigênicas das estruturas do antígeno-O, antígeno-K (capsular) e antígeno-H (flagelar), as cepas de *E. coli* podem ser divididas em sorotipos ou sorovares O; H; K (LEHTOLAINEN et al., 2003), sendo conhecidos mais de 700 tipos antigênicos (BURVENICH et al., 2007).

No entanto, ao adquirirem e expressarem uma combinação de elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, transposons e ilhas de patogenicidade, além de bacteriófagos, torna-se um patógeno altamente adaptado, capaz de causar uma variedade de doenças, desde gastroenterites a infecções extras intestinais como as do trato urinário, septicemia e infecções do sistema nervoso central (PIZARRO-CERDÁ E COSSART, 2006; CROXEN E FINLAY, 2010).

3.2 Resistência Bacteriana.

O conhecimento do fenômeno da resistência a agentes físicos e químicos entre os microrganismos data do início da era microbiana. Com a introdução das primeiras substâncias químicas com finalidade quimioterápica específica, Ehrlich e seus colaboradores Franke e Roehl, em 1905, descobriram o fenômeno da resistência às drogas, ao observarem que em culturas de tripanossomas africanos tratados com arsênico ou com determinados corantes havia a sobrevivência de alguns exemplares da mesma população microbiana (TAVARES, 2000).

Dentre os microrganismos que sofreram grandes modificações na sensibilidade aos antimicrobianos com o correr dos anos, destacam-se o gênero de *Staphylococcus*, as enterobactérias, a *Pseudomonas aeruginosa*, o *Acinetobacter baumannii* e, mais recentemente, os hemófilos, *Gonococcus*, *Enterococcus* e *Pneumococcus* (TAVARES, 2000).

Segundo a WHO (2014) a Resistência Antimicrobiana (RAM) se desenvolve quando um microrganismo não responde mais a uma droga para o qual foi originalmente sensível. O problema é tão grave que ameaça as conquistas da medicina moderna. Infecções comuns e até então tratáveis estão levando ao óbito a era pós-antibiótica é possibilidade real para o século 21.

A resistência das bactérias aos antimicrobianos está ligada a genética, pois estes microrganismos possuem genes que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação dessas drogas. Esta resistência pode ser originada através de mutações, transferências de genes causados por determinada resistência presente no microrganismo, ou em alguns o mecanismo de resistência é natural (TAVARES, 2000).

A resistência do *S. aureus* aos antimicrobianos é denominada pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie ou eventualmente, de outras espécies e/ou por mutações em seus genes. A resistência por mutação ocorre devido a uma alteração no sitio de ação do antibiótico, enquanto a resistência por obtenção de genes de resistência frequentemente envolve inativação ou destruição dos antibióticos. A resistência à penicilina é conferida pela produção de enzimas, as β -lactamases, capazes

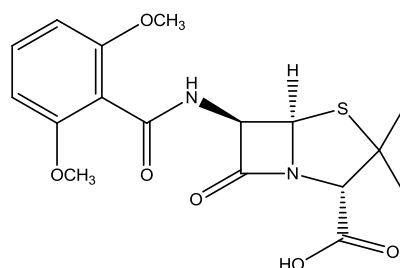
de inativar essas drogas. Já a resistência à metilina é concedida por um gene, o *mecA*, que codifica uma proteína que se liga à penicilina com baixa afinidade pelo antimicrobiano (TRABULSI, 2005).

Nesse sentido, a resistência bacteriana tornou-se questão de saúde pública, pois se constitui em ameaça crescente no tratamento de doenças infecciosas por micro-organismos multirresistentes, como *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina e bacilos Gram negativos resistentes a três ou mais famílias de antimicrobianos em ambientes hospitalares e da comunidade. As infecções causadas por microrganismos resistentes estão associadas ao tempo de permanência hospitalar, cuidados em terapia intensiva, elevados custos e prognóstico desfavorável (BUITRAGO et al, 2014).

3.2.1 *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA).

Em 1961 foi documentado o primeiro caso de *S. aureus* resistente à metilina, um β -lactâmico resistente à ação das β -lactamases e, a partir daí essa cepa se tornou um problema clínico e epidemiológico mundial (MERLINO et al, 1996).

Figura 1: Estrutura molecular da metilina.



Fonte: Arquivo pessoal.

O *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) é o microrganismo mais frequentemente isolado em infecções nosocomiais em todo o mundo com importante mortalidade e peso econômico para o sistema de

saúde. A situação tem-se agravado nos últimos anos pelo aparecimento de surtos comunitários de MRSA adquiridos em comunidade (CA-MRSA) e por estirpes com resistência intermediária (VISA) ou total à vancomicina (VRSA) (MENDES, 2010).

Estudos realizados em pacientes com infecção na corrente sanguínea mostraram que *S. aureus* foi à bactéria predominante em 118 episódios e destes, 66 eram resistentes à metilina (GUILARDE et al., 2007).

Klevens et al (2007) mostrou que as mortes por infecções por MRSA nos Estados Unidos da América (EUA) ofuscaram os de muitas outras doenças infecciosas, incluindo o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Com base nos dados de várias grandes áreas metropolitanas nos EUA, estes investigadores estimam que MRSA causou 94.000 infecções e mais de 18.000 mortes nos EUA em 2005.

3.3 Tratamentos das infecções bacterianas.

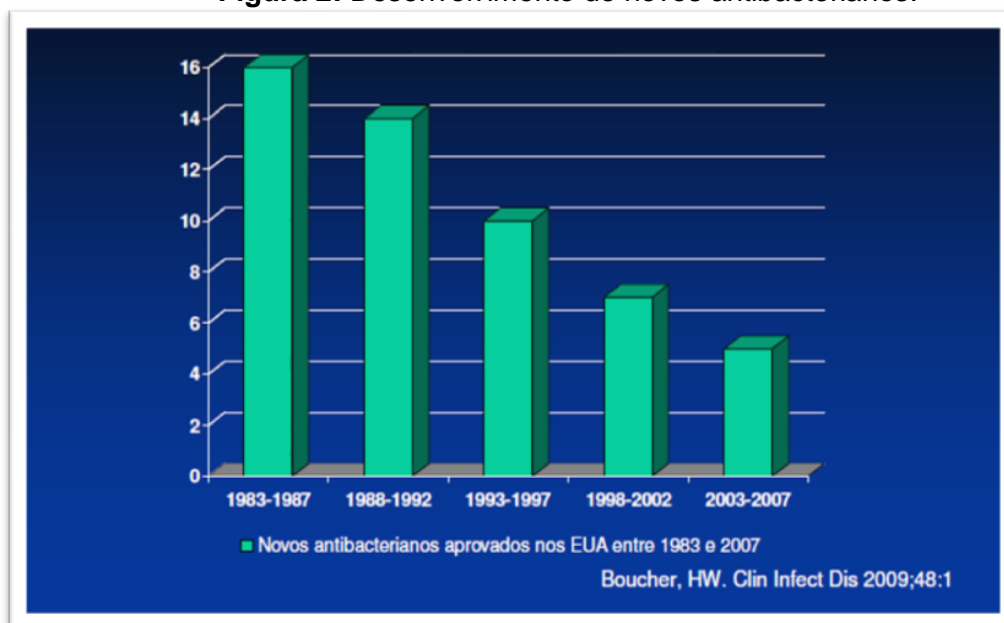
Entre os anos 1940-1960 vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias Gram positivas: β -lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclina (clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), peptídeos (vancomicina) e outros (cloranfenicol, rifamicina B, clindamicina e polimixina B). Neste período apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado: isoniazida, trimetopim e metronidazol (FERNANDES, 2006).

Segundo Fernandes (2006) entre os anos 1960-1980 foram introduzidos no mercado antibióticos semissintéticos eficazes para o tratamento de patógenos Gram positivos e Gram negativos, análogos aos antibióticos naturais já existentes. A maioria deles foi obtida a partir de protótipos naturais microbianos, como derivados β -lactâmicos (análogos de penicilina e cefalosporina, ácido clavulânico, aztreonam), análogos da tetraciclina e derivados aminoglicosídicos (gentamicina, tobramicina, amicacina).

Entre os anos 1980-2000 as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos antibióticos foram a genômica e as triagens de coleções de compostos, em vez das triagens de produtos naturais microbianos. Porém, houve uma redução dramática na identificação de novos protótipos antibióticos, ao mesmo tempo em que ocorreu um aumento na incidência de resistência bacteriana. Este período é marcado pela modificação do mercado de antibióticos pela introdução da classe das fluoroquinolonas sintéticas na metade dos anos 1980, desenvolvidas a partir do ácido nalidíxico. Alguns antibióticos baseados em protótipos naturais, como imipenem (derivado β -lactâmico) e análogos da eritromicina (derivado macrolídeo) também foram introduzidos neste período (FERNANDES, 2006).

A partir de 2000, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana. Em 2001, apenas um antibiótico de origem sintética da classe das oxazolidinonas foi introduzido no mercado farmacêutico, a linezolida (FERNANDES, 2006). Na figura 2 estão apresentados o desenvolvimento dos antibióticos.

Figura 2: Desenvolvimento de novos antibacterianos.



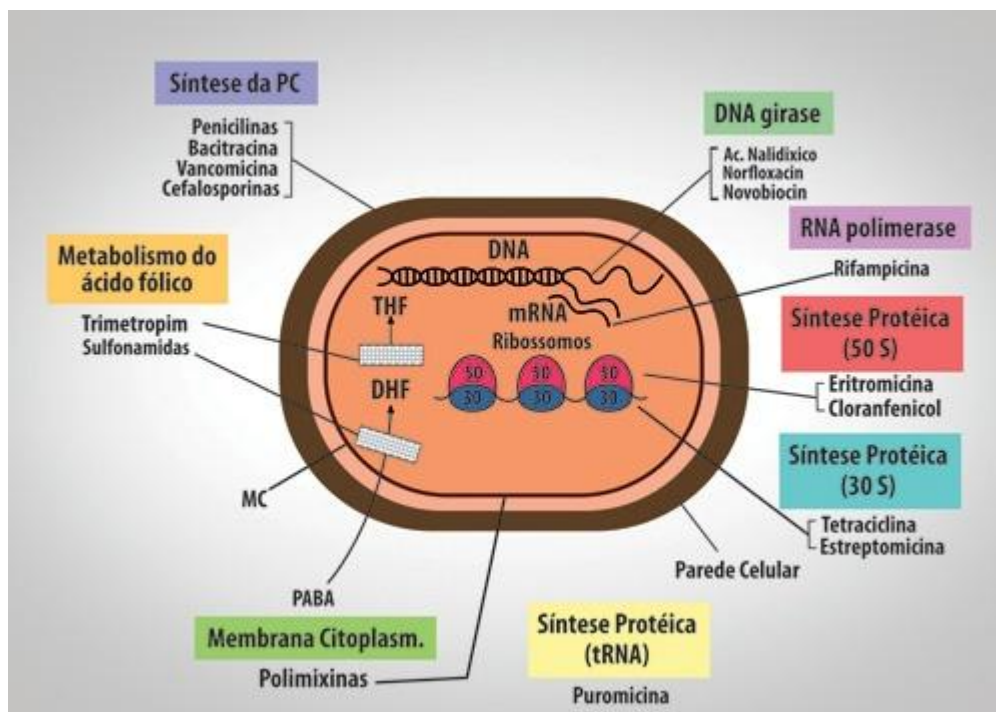
Fonte: BOUCHAR et al., 2009.

Os antimicrobianos são fármacos com a propriedade de suprimir o crescimento dos patógenos ou destruí-los e cuja utilização na prática clínica

modificou o curso natural, além de melhorar o prognóstico das doenças infecciosas. Eles podem ser utilizados de forma profilática e terapêutica, porém, seu emprego crescente e indiscriminado é o principal fator relacionado com a emergência de cepas microbianas resistentes. O uso adequado e inadequado, tanto profilático quanto empírico, doses subterapêuticas e duração prolongada, bem como a indicação para febre de origem obscura sem diagnóstico definido e infecções virais, são equívocos comuns que resultam em seleção bacteriana e aumento da resistência bacteriana (CARNEIRO et al, 2011).

A ação dos antimicrobianos é focada em cinco principais mecanismos biológicos: biossíntese da coenzima folato, biossíntese da parede celular, membrana citoplasmática, biossíntese de proteína e replicação e reparo de DNA (WALSH, 2003). Na Figura 3 estão listados os principais mecanismos de ação dos antimicrobianos.

Figura 3: Mecanismos de ação dos antimicrobianos.

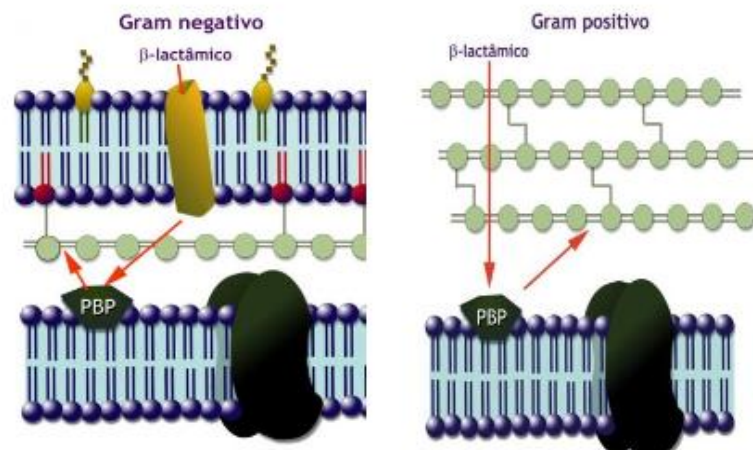


Fonte: MADIGAN et al.,2010.

A escolha do antimicrobiano deve ser baseada em características do agente etiológico e no mecanismo de ação do medicamento, uma vez que são

formulados para agir especificamente em determinado alvo e que existem diferenças estruturais e metabólicas entre os microrganismos. Um bom exemplo é a classificação dos microrganismos em Gram positivo ou Gram negativo que é baseada na estrutura de sua parede celular e que é de fundamental importância na escolha do antibacteriano, onde drogas que tenham baixa lipossolubilidade não conseguem atravessar a parede celular de microrganismos Gram negativo. Na Figura 4 pode ser vista a diferença entre a parede celular das bactérias Gram positivas e Gram negativas. Outro exemplo é o tipo de membrana externa, que pode ser compacta em alguns microrganismos e em outros não, dificultando a penetração dos antibacterianos (CHAMBERS E SANDE, 1996a; RANG et al., 1997).

Figura 4: Permeação da parede celular Gram negativo e Gram positivo por β -lactâmicos.



Fonte: SOUSA,2006.

3.4 Necessidade de novos agentes antibacterianos.

Diversas razões justificam a necessidade urgente por novos agentes antibacterianos, entre elas destacam-se: (1) as doenças infecciosas, que são a segunda maior causa de mortalidade do mundo; (2) as altas taxas de

resistência microbiana, especialmente em ambientes hospitalares; (3) o decréscimo constante observado no número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pela FDA; (4) a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes dos fármacos em uso (BOUCHER et al., 2009; IDSA, 2001).

O grande desafio destas pesquisas é que o desenvolvimento de novos fármacos no combate às infecções não segue a mesma velocidade de surgimento de resistência microbiana, pois a descoberta de um fármaco para tal finalidade pode levar cerca de uma década ou mais, enquanto que o desenvolvimento de resistência pode levar cerca de 7 a 8 anos, sendo necessário então, investimentos de pesquisa, desenvolvimento e inovação (P, D & I) nessa área (BOUCHER et al., 2009; GILBERT et al., 2010).

3.5 Desenvolvimentos de fármacos.

O contínuo desenvolvimento e o aumento de bactérias resistentes representam uma ameaça para a utilidade clínica, o que conduz a uma necessidade urgente de novos compostos. Infelizmente, embora a resistência aos antibióticos tenha aumentado, o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos tem diminuído drasticamente ao longo dos últimos 30 anos. Tais demandas levaram a OMS a reconhecer a Resistência Antimicrobiana (RAM) como uma crise de saúde pública global (BASSETTI et al 2013; CHANG et al, 2013; WHO, 2012).

A busca por substâncias com atividades antimicrobianas é uma necessidade permanente em vista do surgimento de cepas patogênicas resistentes e do aumento das doenças degenerativas. As infecções podem ser classificadas em três tipos: I - emergentes e reemergentes, que corresponde a doenças novas ou modificadas que estão aumentando ou possuem potencial para aumentar no futuro próximo. II – oportunistas, quando acometem pessoas com sistema imunológico deprimido. III - hospitalares ou nosocomiais, quando ocorre em ambiente hospitalar (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Segundo Cachiba et al. (2012), a pesquisa por novos antimicrobianos constitui uma das estratégias para evitar o insucesso nos tratamentos anti-infecciosos, causado pela emergência dos microrganismos resistentes.

O primeiro passo para o desenvolvimento de um fármaco é a identificação de um alvo terapêutico, seguido do respectivo ensaio experimental que permita identificar moléculas com possível ação no alvo escolhido. O ensaio experimental consiste na avaliação do efeito de milhares de moléculas sobre a plataforma terapêutica selecionada. Com o desenvolvimento tecnológico diversas técnicas têm sido desenvolvidas para acelerar a triagem farmacológica do desenvolvimento de fármacos. Dentre as técnicas mais recentes podemos destacar automatizada em alta escala (HTS, High-throughput screening), que propicia a avaliação biológica *in vitro* de milhares ou até mesmo milhões de compostos contra uma proteína alvo ou sistema celular definido (FERREIRA, GLAUCIUS, ANDRICOPULO, 2011; ANVISA, 2012).

Um fármaco pode ser considerado um protótipo, desta abordagem pode surgir uma cópia terapêutica (fármacos *me-too*) ou uma inovação. As cópias resultam de modificações na estrutura do fármaco visando melhorar algum parâmetro, seja potência, seletividade ou toxicidade, objetivando a mesma aplicação terapêutica do protótipo. Para que haja inovação deve-se alterar o perfil farmacodinâmico do fármaco original através de mudanças estruturais. A base desta estratégia é o fato de que os fármacos se ligam em mais de um receptor (conhecidos ou não) e a hipótese de que o universo de padrões estruturais químicos que possam ser administrados com segurança é limitado (BEER *et al.* 1972).

Uma estratégia eficaz e muito empregada nesta busca consiste na modificação molecular de agentes antimicrobianos pré-existentes. Esse processo consiste na modificação química de um composto matriz que possui estrutura química e atividades biológicas bem conhecidas, mantendo seu grupo farmacofórico, para se obter compostos análogos ou homólogos, sem que haja perda das propriedades do composto matriz (MONTANARI, 1995), ou seja, como a resistência consiste no reconhecimento da estrutura do fármaco pelos microrganismos, realizar uma substituição ou adição de algum grupamento químico em um antibiótico já existente, pode garantir que esse medicamento

não seja mais reconhecido, restaurando e potencializando seu efeito (MADINGAN et al., 2010).

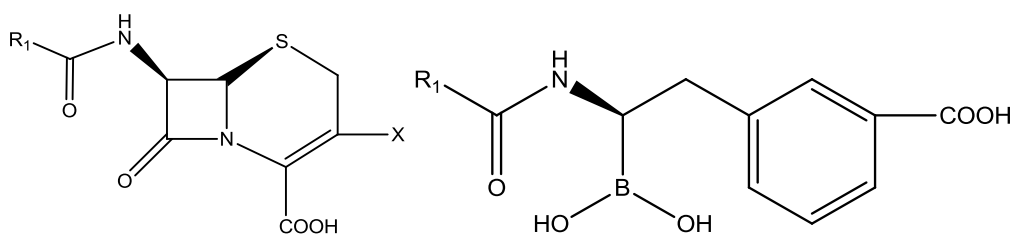
Dentre as diversas ferramentas para o planejamento, desenho e modificação molecular que a Química Medicinal dispõe para a descoberta de novos protótipos candidatos a fármacos, têm-se a hibridação molecular e o bioisosterismo (BARREIRO & FRAGA 2008).

A hibridação molecular baseia-se no reconhecimento de subunidades farmacofóricas na estrutura molecular de duas ou mais substâncias bioativas das quais, através da adequada combinação destas subunidades estruturais, constrói-se um novo arcabouço molecular híbrido. Espera-se que esta nova estrutura apresente as características farmacológicas selecionadas das substâncias originais (VIEGAS-JUNIOR et al. 2007).

O termo bioisosterismo pode ser definido como compostos ou subunidades estruturais de derivados bioativos que apresentam volumes moleculares, formas, distribuições eletrônicas ou propriedades físico-químicas semelhantes, capazes de apresentar propriedades biológicas similares, mantendo seus efeitos agonistas e seus efeitos antagônicos (CIAPETTI; GIELTHEN, 2015; BARREIRO & FRAGA, 2015).

No planejamento de novos antibacterianos inibidores de β -lactamase, o bioisosterismo tem sido recentemente utilizado no grupo farmacofórico dos β -lactâmicos. A substituição desse anel por derivados contendo ácido borônico (Figura 5) gerou compostos com reatividade similar perante a enzima alvo, sendo ainda, compostos sinteticamente mais vantajosos em comparação aos inibidores presentes atualmente na clínica (CASELI et al., 2015).

Figura 5: Esqueleto geral dos bioisósteros inibidores de β -lactamase.



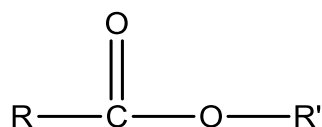
Fonte: Arquivo pessoal.

Os princípios do bioisosterismo são amplamente utilizados na estratégia de modificação molecular de compostos com atividades biológicas previamente bem estudadas, com o intuito de obter moléculas com maior potência e menos efeitos colaterais. É um processo muito utilizado na concepção de antagonistas metabólicos de emprego geral em quimioterapia. Representa, deste modo, abordagem eficaz para o planejamento de novos fármacos (LIMA, BARREIRO, 2005; CIAPETTI, GIELTHLEN, 2015; BARREIRO & FRAGA, 2015). Baseado nesses conceitos e na ideia de fragmentos privilegiados, derivados ésteres de fenilacrilatos tem sido utilizado como novos esqueletos carbônicos na busca por novas entidades químicas mais eficazes e seguras.

3.6 Ésteres.

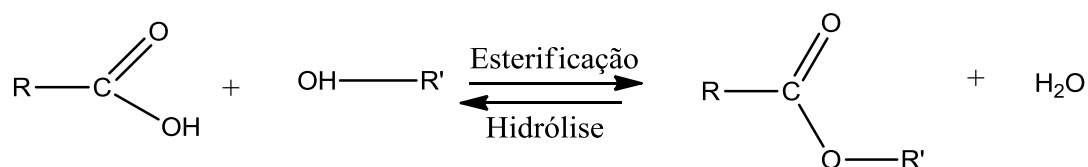
Os ésteres são uma função orgânica que possuem átomos de oxigênio entre as cadeias carbônicas (Figura 6). Porém, diferem-se dos éteres por possuírem um grupo carbonilo (CO) também entre os carbonos. Assim, a molécula estruturada por: radical – carbonilo – oxigênio – radical (COSTA et al., 2004).

Figura 6: Esqueleto funcional dos ésteres.



Fonte: Arquivo pessoal.

Os ésteres são compostos de baixa polaridade e com ponto de ebulição menor do que os ácidos carboxílicos de peso molecular semelhante. Podem ser sintetizados através de reação entre um ânion carboxilato e um haleto de alquila ou ainda pela reação de esterificação de Fischer (Esquema 1), à qual se tem dado maior ênfase devido à viabilidade de aplicação industrial para síntese de flavorizantes (COSTA et al., 2004).

Esquema 1: Reação de esterificação de Fischer.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os ésteres são derivados dos ácidos carboxílicos e podem ser preparados através da reação de álcoois com ácidos, cloretos de ácido ou anidridos na presença de catalisador. A reação de ácidos com álcoois é uma reação de equilíbrio. No sentido direto conduz à formação de ésteres e no sentido inverso leva à hidrólise dos mesmos. Para deslocar a reação no sentido da formação do éster pode utilizar-se um excesso de um dos reagentes ou remover um dos produtos à medida que a reação decorre (CAVALCANTE et al, 2015).

3.6.1. Derivados ésteres de fenilacrilatos.

Os ésteres de fenilacrilatos são derivados formados através da reação de condensação de Knoevenagel, reagindo um aldeído aromático e o 2-cianoacetato de etila, na presença de bases orgânicas como catalisadores (COPE et al., 1941). Apesar de importantes intermediários em síntese, ainda são poucos conhecidos quanto as suas propriedades biológicas.

A reação de condensação, representa uma classe de reações muito importantes na síntese de compostos intermediários. Moléculas complexas e contendo grupos funcionais específicos podem ser formadas através da condensação de duas ou mais moléculas simples. Dentro dessa classe, a condensação de Knoevenagel tem sido muito utilizada comercialmente para preparação de intermediários para a química fina e como reação modelo para caracterização da basicidade de catalisadores sólidos. Esta reação ocorre entre um composto carbonílico (aldeídos ou cetonas) e moléculas contendo grupos metilênicos ativados. Uma importante vantagem desta reação em fase

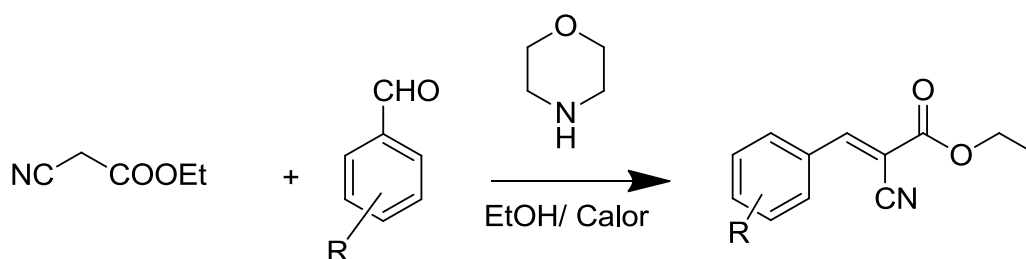
líquida é a possibilidade do uso de reagentes com caráter básico diferenciado. Convencionalmente, esta reação é catalisada por bases fracas, tal como aminas, em meio homogêneo (VELOSO et al, 2001; WEITKAMP et al, 2001).

4. METODOLOGIA

4.1 Síntese dos compostos.

A série dos 10 derivados fenilacrilatos foram sintetizadas através de uma reação de condensação do tipo Knoevenagel entre o aldeído aromático e o 2-cianoacetato de etila em equivalência molar de 1:1. Conforme ilustra o Esquema 2.

Esquema 2: Reação de condensação de 2-cianoacetato de etila com diferentes aldeídos.



- | | |
|--|--|
| 01- R= Benzaldeído (75,77%) | 10- R= 2,4-dicloro benzaldeído (71,02%) |
| 02- R= 4-Cloro benzaldeído (100%) | 12- R= 4 (1-piridinil) benzaldeído (88,66 %) |
| 03- R= 4-Flúor benzaldeído (86%) | 13- R= 4 (2-piperidil) benzaldeído (66,55%) |
| 06-R=4-Dimetilamina benzaldeído (83,54%) | 14- R= 4- Nitro benzaldeído (20,28 %) |
| 09- R= 2,6-dicloro benzaldeído (76,44 %) | 15- R= 4-Metoxi benzaldeído (71,63%) |

4.1.1 Procedimento Geral para obtenção dos derivados fenilacrilatos.

Em um balão de fundo redondo adicionou-se o aldeído aromático substituído e o 2-cianoacetato de etila em equivalentes molares, na presença da morfolina (6 gotas) como catalisador e etanol como solvente. A mistura

reacional foi mantida em agitação mecânica e aquecida a uma temperatura de 70 °C, por aproximadamente 24 h.

As reações foram acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em sistema 7:3 (*n*-hexano/acetato de etila) e 8:2 (*n*-hexano/acetato), a placa cromatográfica foi visualizada em câmara de ultravioleta, até a observação da ausência dos produtos de partida, indicando que os mesmos foram consumidos totalmente e observando a formação do produto principal. Após a finalização das reações, esperou-se o resfriamento das mesmas e em seguida filtrou e lavou com etanol puro, deixando-as secarem em temperatura ambiente até obtenção de um pó completamente seco e por fim foram pesadas em balança de precisão, calculadas o rendimento de cada uma e fez-se uma nova CCD para avaliar o grau de pureza das mesmas.

4.1.2 Elucidação Estrutural.

Devido a simplicidade da reação realizada e visando verificar a comprovação dos compostos propostos, foi realizado uma ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C do composto AL-02, utilizando um equipamento Bruker Avance spectrometer (AC-500) em DMSO deuterado. Para o ^{13}C foi realizado a técnica de DEPT-Q onde podemos diferenciar os carbonos primários e terciários (picos para cima) dos carbonos secundários e quaternários (picos para baixo) no espectro.

4.1.3 Avaliação da atividade antibacteriana dos derivados fenilacrilatos.

Os testes foram realizados empregando a técnica de microdiluição proposta pelo CLSI, segundo as normas do protocolo NCCLS-M07-A9(CLSI, 2012) para as bactérias.

Para avaliação de atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA devidamente identificada quanto ao seu perfil de resistência através de normas padronizadas pelo documento M100-S25 do CLSI, 2015. Para o controle, foram utilizadas as cepas de referência ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922.

As estirpes foram previamente reativadas em caldo BHI (HIMEDIA, Índia) e incubados em estufa bacteriológica por 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ até serem utilizados nos testes.

Para o controle positivo foi utilizado o antibiótico amicacina {6-O-(3-amino-3-desoxi- α -D-glucopiranosil)-4-O-(6-amino-6-desoxi- α -D-glucopiranosil)-N-[(2S)-4-amino-2-hidroxitbutanoil]-2-desoxi-D-estreptamina}. Este antibiótico é de amplo espectro, sendo eficaz no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram negativas e Gram positivas.

4.1.4 Padronização da suspensão bacteriana.

Após o período de incubação, foram selecionadas 4 a 5 colônias e transferidas para um tubo contendo 10 ml de solução salina estéril (0,9%), seguido de homogeneização. A turbidez dessa suspensão foi ajustada de modo a ser semelhante à escala de solução padrão de 0,5 de McFarland, correspondente a $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ml. Em seguida foi feita uma diluição 1:10 em caldo Müller Hinton para atingir a concentração de 10^4 UFC/ml.

O inóculo padrão foi ajustado em espectrofotômetro (Biospectro SP22®) em comprimento de onda de 625 nm, para que a solução atingisse uma variação de absorvância de 0,080 – 0,100 %, correspondente ao grau de turvação 0,5 da escala McFarland.

4.1.5 Preparo das soluções a serem testadas.

Para a solução dos compostos da série AL pesou-se 5,12 mg do pó sintético da molécula do derivado fenilacrilato e solubilizou em 2 ml de DMSO 99,9% (Dimetilsulfóxido). As moléculas dos derivados, por não serem muito lipofílicas, conseguem solubilizarem completamente em DMSO, que é um solvente polar. A partir desta solução inicial se prepararam outras duas soluções a fim de diminuir a concentração do DMSO, pois o mesmo é altamente tóxico para os microrganismos em concentração 99,9%. No final, obtivemos uma solução a 1024 µg/ml que foi utilizada para se fazer os testes nos microrganismos em análise.

Para a preparação da solução da amicacina seguiu-se metodologia já padronizada sendo preparada solução em água destilada estéril, seguida de diluições subseqüentes feitas em caldo Müeller Hinton estéril. As diluições envolveram concentrações crescentes e dobradas das drogas, que variaram de 0,015625 a 512 µg do antibiótico por ml do meio de cultivo.

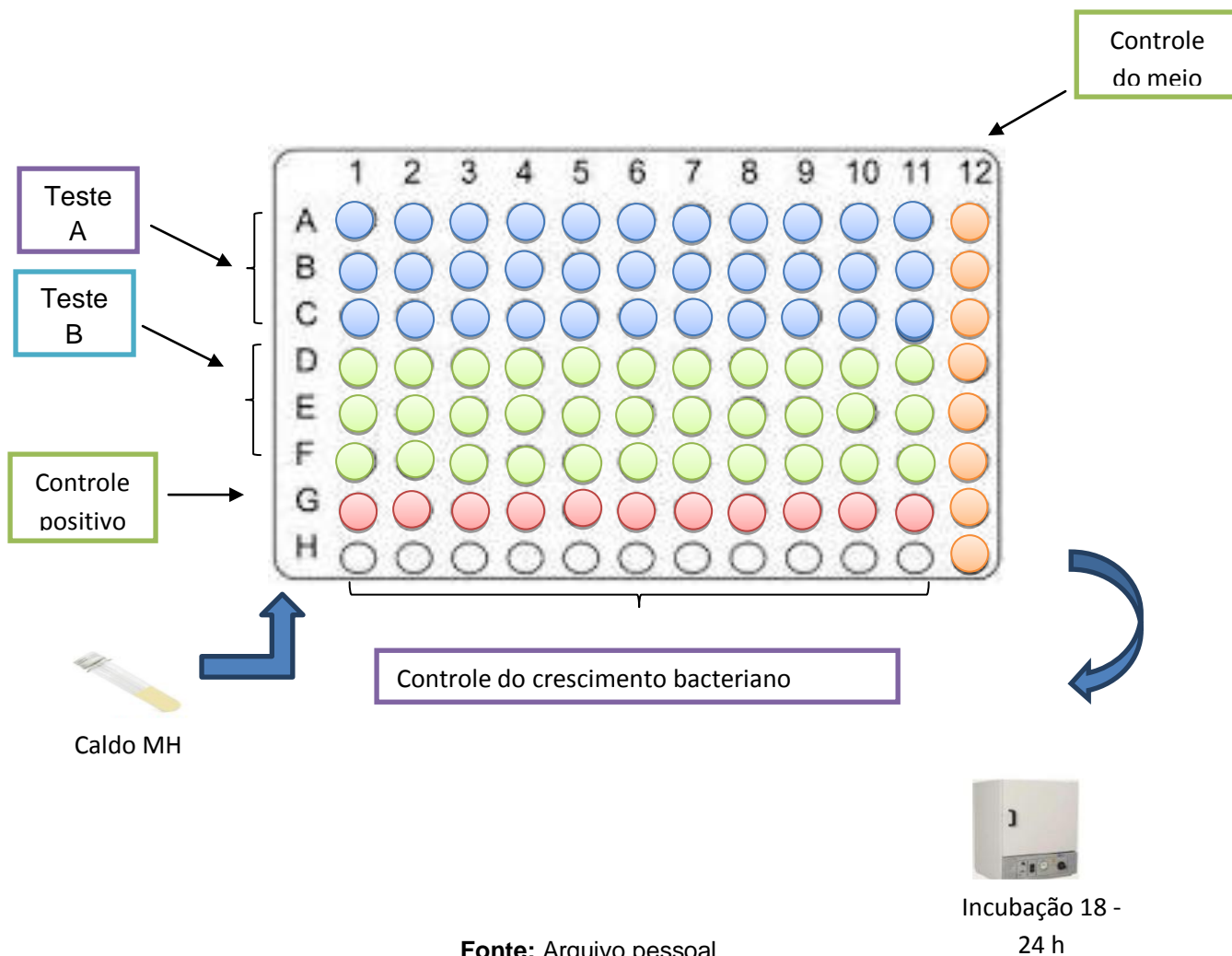
4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

4.2.1 Realização dos testes.

As amostras foram distribuídas em microplaca de 96 orifícios e cada diluição feita em triplicata. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos derivados fenilacrilatos foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo Müeller Hinton (CMH) (BBL DIFCO). Uma técnica sensível, de alto rendimento, na qual possibilita a análise de pequenas amostras. Para tanto, foram adicionados em cada poço da microplaca, 100 µL do CMH. Cada poço então recebeu 10 µL do inóculo bacteriano e 100 µL da solução dos compostos sintetizados, com concentrações variando de 1024 a 1 µg/ml. Considerando assim a Concentração Inibitória Mínima, a menor concentração da droga que inibiu completamente o crescimento bacteriano (CLSI, 2003).

As placas devidamente inoculadas com o microrganismo foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 18-24 h no teste antibacteriano. Em cada microplaca foram testados dois derivados fenilacrilatos. A Figura 7 mostra esquematicamente o teste nas microplacas. Todos os testes foram feitos em triplicatas a fim de se ter uma maior segurança dos resultados obtidos.

Figura 7: Fluxograma para determinação da CIM pelo método de microdiluição.



Fonte: Arquivo pessoal

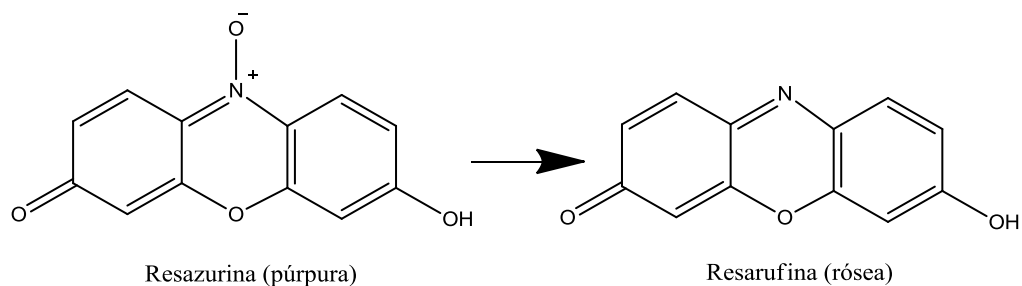
Incubação 18 -
24 h

4.2.2. Leitura dos ensaios com revelador.

Para evidenciar a CIM das soluções frente às linhagens bacterianas, foi preparada uma solução reveladora de resazurina em água destilada estéril na concentração de 0,025% (p/v). Após a incubação, 20 μ L da solução reveladora foram adicionados em cada cavidade e as placas passaram por um período de incubação de 3 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Após esta incubação, a presença de coloração vermelha nos orifícios era interpretada como prova negativa do efeito inibitório da droga sintética, enquanto a presença da coloração azul era considerada prova positiva da ação inibitória da droga, representando a ausência do crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002). A CIM foi definida como a menor concentração da droga sintética em $\mu\text{g/ml}$ capaz de impedir o crescimento microbiano.

A resazurina (7-hidroxi-3 H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea), mostrado na Figura 8. A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000).

Figura 8: Reação de oxirredução da resazurina.



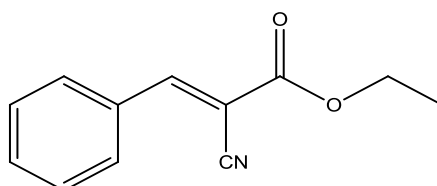
Fonte: Arquivo pessoal.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese e caracterização dos derivados fenilacrilatos.

Foram sintetizados dez derivados de fenilacrilato, cuja a estrutura básica está mostrada na Figura 9, a nomenclatura e as características físico-químicas estão descritas nas tabelas 1 e 2.

Figura 9: Esqueleto molecular geral dos derivados fenilacrilatos.



Etil 2-ciano 3-fenilacrilato

Tabela 1: Estrutura molecular dos compostos fenilacrilatos e suas respectivas nomenclaturas.

Compostos	Aldeídos Aromáticos	Nomenclatura
AL-01 	Benzaldeído	Etil 2-ciano-3-fenil acrilato
AL-02 	4-cloro benzaldeído	Etil 2-ciano-3- (4-clorofenil) acrilato
AL-03 	4-flúor benzaldeído	Etil 2-ciano-3- (4-fluorofenil) acrilato

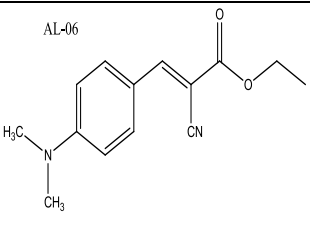
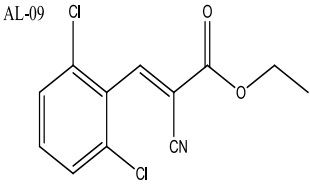
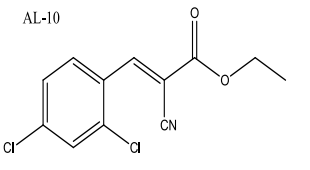
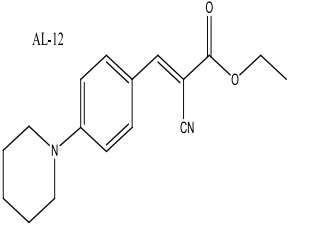
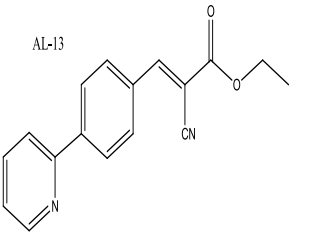
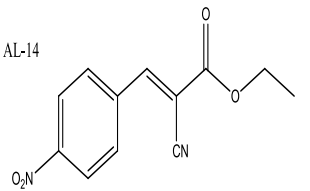
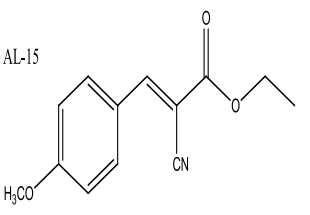
AL-06 	4-dimetilamina benzaldeído	Etil 2-ciano-3- (4- (dimetilamino) fenil) acrilato
AL-09 	2,6-dicloro benzaldeído	Etil 2-ciano-3- (2,6-diclorofenil) acrilato
AL-10 	2,4-dicloro benzaldeído	Etil 2-ciano-3- (2,4-diclorofenil) acrilato
AL-12 	4(1-piridinil) benzaldeído	Etil 2-ciano-3- [4-(1-piperidinil) fenil] acrilato
AL-13 	4(2-piridinil) benzaldeído	Etil 2-ciano-3- [4-(2-piridinil) fenil] acrilato
AL-14 	4-Nitro benzaldeído	Etil 2-ciano-3-(4-nitrofenil) acrilato
AL-15 	4-metoxi benzaldeído	Etil 2-ciano-3-(4-metoxifenil) acrilato

Tabela 2: Características físico-químicas dos derivados fenilacrilatos.

Compostos	Cor	Rend (%)	PF°C	RF	FM	PM (g/mol)	Log P
AL-01	Marrom	75,77	57-58	0,80 (H:A/7:3)	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	201,22	2,43
AL-02	Amarelo	100	84-89	0,83 (H:A/ 7:3)	C ₁₂ H ₁₀ ClNO ₂	235,67	2,99
AL-03	Amarelo	86	85-89	0,77 (H:A/ 7:3)	C ₁₂ H ₁₀ FNO ₂	219,21	2,92
AL-06	Laranja	83,54	120-125	0,63 (H:A/ 8:2)	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	244,29	2,71
AL-09	Marrom	76,44	40-42	0,73 (H:A/ 8:2)	C ₁₂ H ₉ Cl ₂ NO ₂	270,11	3,55
AL-10	Amarelo	71,02	68-70	0,50 (Hexano)	C ₁₂ H ₉ Cl ₂ NO ₂	270,11	3,55
AL-12	Laranja	88,66	78-80	0,83 (H:A/ 8:2)	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₂	284,35	3,45
AL-13	Verde claro	66,55	188-190	0,40 (H:A/ 7:3)	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂	278,11	3,19
AL-14	Amarelo	20,28	190-192	0,50 (H:A/ 7:3)	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₄	246,06	2,02
AL-15	Amarelo	71,63	84-86	0,40 (H:A/ 7:3)	C ₁₃ H ₁₃ NO ₃	231,09	2,3

Fonte: Arquivo pessoal.

Rend. (%): Rendimento em porcentagem; RF: Fator de retenção; H:A: Hexano:Acetato; FM: Formula Molecular; PM: Peso Molecular.

Como apresentado na tabela 2 quase todas as moléculas apresentaram rendimentos acima de 50%, com exceção do AL-14 que teve um rendimento de 20,28%. Os rendimentos acima de 50% demonstram a boa viabilidade da rota sintética adotada. Com relação ao AL-14, dois fatores podem ter influenciado no rendimento, um deles pode ter sido o processo de recristalização em EtOH feito para esse composto. Nesse processo deve-se levar em consideração, entretanto, o fato de que cristalização direta de um produto de reação bruta nem sempre é aconselhável, já que certas impurezas podem retardar a velocidade de recristalização e, em alguns casos, pode ocorrer perda considerável de material (MANO & SEABRA 2002). O outro pode estar relacionado a reatividade do aldeído com o grupamento NO₂ em posição *para* que pode reduzir a reatividade a carbonila. Quanto ao ponto de fusão os valores foram de 40 °C (AL-09) a 190 °C (AL-14).

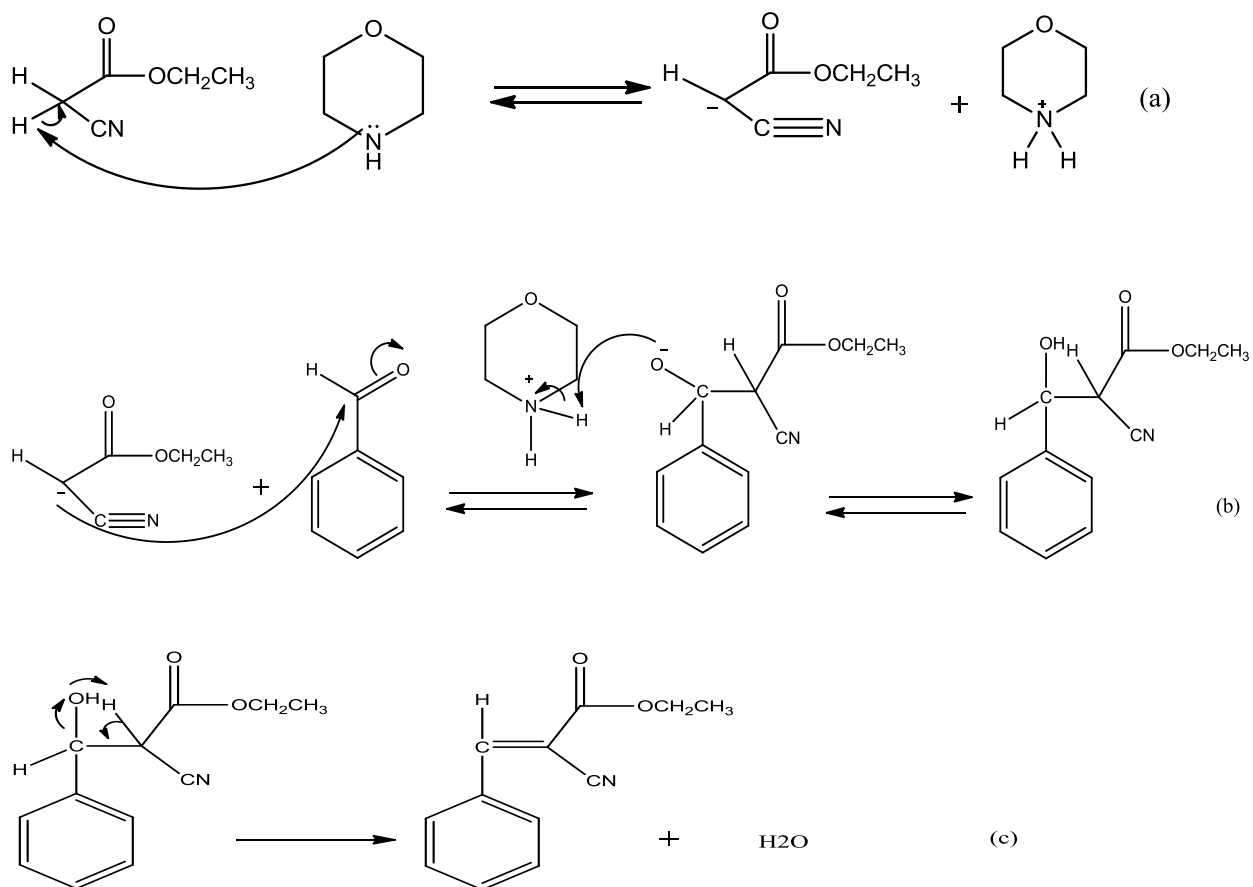
Referente aos pesos moleculares da série, os valores variaram de 201,22 g/mol (AL-01) a 284,35 g/mol (AL-12). Para o fator de retenção (R_f) obteve-se os intervalos entre 0,40 a 0,83 no sistema 7:3 hexano/acetato, de 0,63, 0,73 e 0,83 para o AL-06, AL-09 e AL-12 respectivamente, no sistema 8:2 hexano/acetato e o $R_f = 0,50$ em hexano puro para o AL-10.

Em relação ao coeficiente de partição (Log P), todas as moléculas apresentaram Log P <5, tendo o composto AL-14 (2,02) o menor Log P e os compostos AL-09 e AL-10 apresentando o Log P de 3,55, respectivamente. Os resultados para peso molecular e Log P apresentam-se de modo satisfatórios e de acordo com a regra de Lipinsk, uma vez que esses valores podem indicar um bom perfil de biodisponibilidade (BARREIRO & FRAGA, 2015), resultando em um aumento da sua ação farmacológica.

5.1.1 Possível Mecanismo da Reação.

A reação de Knoevenagel pertence à classe geral das condensações do tipo aldólicas, catalisadas por bases. A condensação de Knoevenagel é uma importante reação aplicada em síntese orgânica, para o aumento (TIETZE, 1991) e funcionalização da cadeia carbônica, pois pode introduzir, por exemplo, uma unidade dicarbonílica, que é relevante na síntese de alguns produtos orgânicos (NOKAMI et al., 2001).

A reação ocorre em três etapas conforme ilustrado no esquema 3: (a) desprotonação do composto com metileno ativo; (b) adição do carbânion ao composto carbonílico; (c) eliminação de água, a partir do intermediário aldólico.

Esquema 3: Mecanismo de reação de Knoevenagel.

5.1.2 Elucidação Estrutural.

Para a elucidação estrutural foi feita a espectrometria de RMN do composto AL-02. O RMN de ^1H 500Mz (DMSO- d_6) δ em ppm: 8,41 (s, ^1H , C=CH); 8,07 (d, 2H, C-H aromático, $J=10$ Hz); 7,68 (d, 2H, C-H aromático, $J=10$ Hz); 4,32 (q, 2H, O- CH_2 , $J=10$ Hz e $j=5$ Hz); 1,31 (t, 3H, CH_3 ester, $J=10$ Hz e $j=5$ Hz). RMN de ^{13}C 100Mz: 13,97 (primário); 62,46 (secundário); 103,23 (quaternário); 115,42 (quaternário); 129,49 (2C, terciário); 130,24 (quaternário); 132,45 (2C, terciário); 138,02 (quaternário); 153,69 (terciário); 161,62 (quaternário).

Com a elucidação do espectro do composto AL-02 podemos observar que a síntese foi promissora e caracteriza a estrutura da molécula. Isso pode ser observado pelo sinal com deslocamento químico (δ) em 8,41 que

representa o C-H vinílico, comprovando que a reação de condensação acontece, seguido dos sinais em 4,32 e 1,31, contendo 2 e 3 hidrogênios respectivamente, correspondente a função Ester, além dos sinais do aromático sinalizando substituição em *para* no anel. No espectro de ^{13}C foram visualizados todos os sinais de carbono correspondentes a molécula proposta, evidenciando os carbonos primários (CH_3) e secundários (O-CH_2) ambos da função Ester (anexo A, B e C).

5.2 Avaliação antibacteriana.

Após a síntese e as avaliações estruturais, 7 dos 10 compostos da série foram submetidos à avaliação biológica frente cepas de *S. aureus* ATCC 25923, de *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* MRSA, a fim de identificar as concentrações inibitórias mínimas de cada composto. Os valores estão expostos nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima de derivados de fenilacrilatos frente à cepa de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922.

Compostos Testados	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 CIM ($\mu\text{g/ml}$)	<i>E. coli</i> ATCC25922 CIM ($\mu\text{g/ml}$)
AL-01	512	> 1024
AL-02	256	> 1024
AL-03	512	> 1024
AL-06	512	> 1024
AL-09	16	>1024
AL-10	512	> 1024
AL-12	>1024	> 1024

Fonte: Arquivo pessoal.

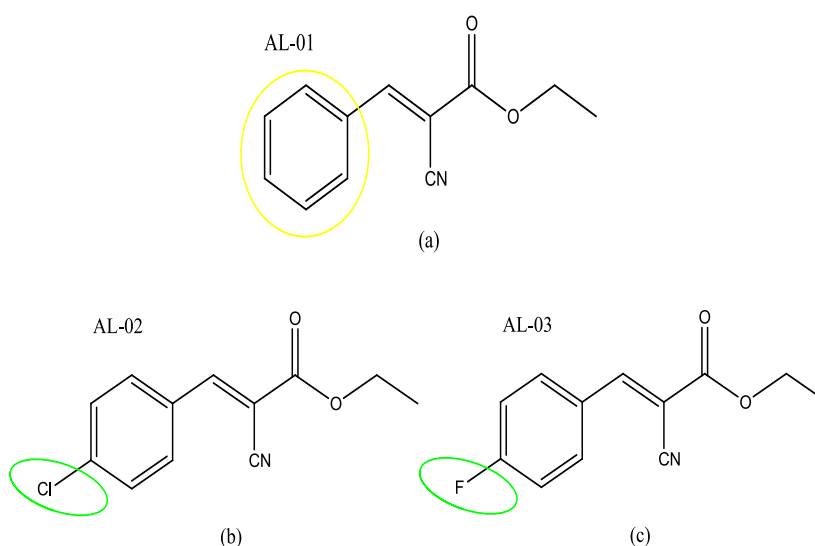
Dentre a série de compostos testados para as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922, as CIMs apresentada para a cepa de *E. coli*

foram acima de 1024 µg/ml, diferentemente dos valores apresentados para *S. aureus* que foram abaixo de 1024 µg/ml, isso pode ser explicado por se tratar de uma bactéria Gram negativa e outra Gram positiva, mostrando que as diferenças na parede celular de cada uma podem influenciar de forma significativa na atividade dos compostos.

Segundo Guimarães et al. (2010) devido à natureza mais complexa da parede celular, as bactérias Gram negativas são mais resistentes à ação de antibióticos, que não são capazes de cruzar efetivamente esta barreira lipídica. Para ter acesso à célula bacteriana, os antibióticos devem cruzar a parede celular através de canais proteicos de porina, embebidos na estrutura lipídica, que apresentam o interior com características hidrofílicas. Assim, antibióticos com maior atividade frente as bactérias Gram negativas são aquelas que apresentam grupos ionizáveis em suas estruturas químicas.

Para a cepa *S. aureus* ATCC 25923 correlacionando o composto Etil 2-ciano-3-diclorofenil acrilato (AL-01) sem substituinte no anel aromático, com uma CIM de 512 µg/ml, com os compostos monosubstituídos, observamos que o composto Etil 2-ciano-3-(4-clorofenil) acrilato (AL-02), apresentou um valor da CIM reduzido pela metade (256 µg/ml), Já o composto Etil 2-ciano-3-(4-flúorfenil) acrilato (AL-03) apresentou a mesma atividade do AL-01, assim observamos a positiva contribuição do átomo de cloro no anel aromático para a atividade biológica (Figura 10).

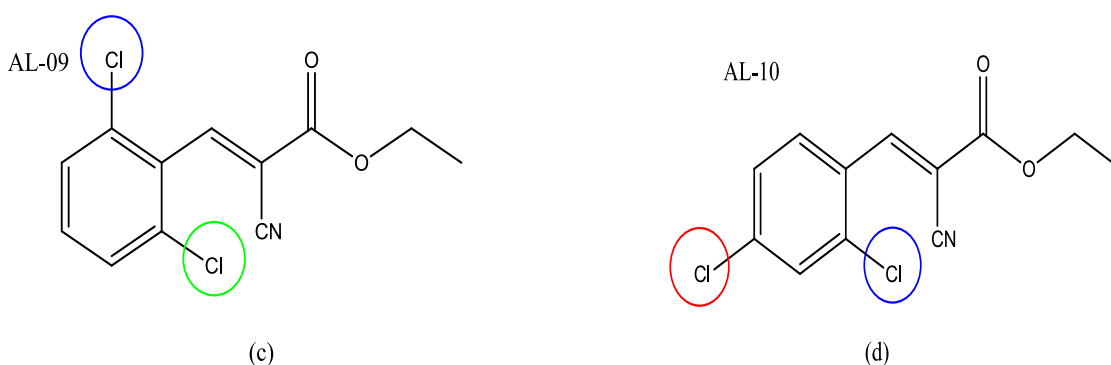
Figura 10: Compostos fenilacrilatos substituídos.



Fonte: Arquivo pessoal.

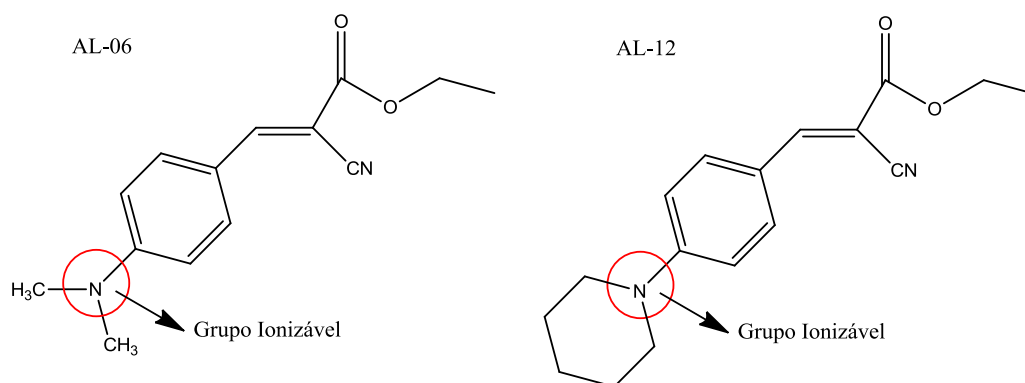
Pensando nisso, foram testados os compostos diclorados. Dentre os resultados testados para o *S. aureus* ATCC, o composto Etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato (AL-09), foi o que apresentou uma CIM de 16 $\mu\text{g/ml}$, levando em consideração o seu isômero, o composto Etil 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato (AL-10), cuja única diferença é a posição dos halogênios, apresentou uma redução da atividade biológica *in vitro* (512 $\mu\text{g/ml}$) para a mesma cepa testada (Figura 11), enfatizando também a importância da posição dos grupos substituintes para atividade proposta.

Figura 11: Estrutura dos Isômeros AL-09 e AL-10.



Fonte: Arquivo pessoal.

Também com o intuito de avaliar a importância de grupos ionizáveis na estrutura dos candidatos a fármacos, foram sintetizados e testados os compostos Etil 2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil) acrilato (AL-06) e Etil 2-ciano-3-(4-(piperidin-1-il) fenil) acrilato (AL-12), ambas com nitrogênios terciários passivos a ionização (Figura 12).

Figura 12 Estruturas dos derivados acrilatos ionizáveis.

Apesar da expectativa dos compostos ionizáveis apresentarem boa atividade para as bactérias Gram negativa, os resultados não foram promissores, como também não apresentaram resultados melhores que o composto AL-01. Uma possível justificativa para o resultado pode ser o pH do meio, uma vez que normalmente tecidos inflamados ou infectados por bactérias apresentam um pH relativamente mais ácido e como os testes foram realizados *in vitro*, não poderia proporcionar um ambiente favorável a ionização das moléculas. Entretanto, para a cepa Gram positiva o composto AL-12 não apresentou CIM menor que 1024 µg/ml, uma vez que o AL-06, que também apresenta o nitrogênio terciário, teve uma CIM igual ao composto AL-01, sendo uma possível justificativa desse resultado para o AL-12 o tamanho da molécula que possivelmente não se encaixa com o alvo terapêutico.

Devido a boa atividade apresentada pelo composto AL-09, e com o intuito de validar sua potencialidade, foram selecionadas as três moléculas que apresentaram menores valores para concentração inibitória, testados na cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, para realizar os testes na cepa de *S. aureus* multirresistente conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Atividade da CIM frente à cepa de *S. aureus* MRSA.

Compostos Testados	CIM (µg/ml)
AL-01	> 1024
AL-02	> 1024
AL-09	128

Fonte: Arquivo pessoal.

Apesar da diminuição da atividade frente a cepa resistente, o composto AL-09 apresentou significativa atividade, sendo ainda considerado um *Hit* promissor.

Segundo Gaweska et al (2004) os ensaios celulares caracterizam-se pela detecção dos efeitos que um composto apresenta frente ao crescimento celular. Esta triagem baseada na análise do fenótipo pode ser informativa acerca de interações entre os compostos e o sistema celular submetido no ensaio, porém não é possível obter nenhuma informação acerca do mecanismo de ação pelo qual as substâncias atuam, já que a resposta fenotípica observada pode estar relacionada a uma grande variedade de alvos responsáveis pelos efeitos biológicos.

6. CONCLUSÃO

Os resultados preliminares obtidos neste trabalho permitem concluir que a síntese de novos candidatos a protótipos de fármacos antibacterianos, foi obtida de forma satisfatória, sendo comprovada pelo rendimento acima de 50%, com exceção do composto AL-14 com rendimento de 20,28%, podendo ser justificado pela sua reatividade e pela perda no processo de recristalização do mesmo. A elucidação estrutural também comprovou que os compostos são de fatos os propostos na pesquisa, principalmente pela presença do CH vinílico.

Quanto aos ensaios microbiológicos, o derivado Etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato (AL-09) apresentou a melhor atividade inibitória mínima com 16 µg/ml frente a estirpe de *S. aureus* ATCC 25923 e de 128 µg/ml para a cepa de *S. aureus* resistente à meticilina. Com isso, podemos observar a importância do átomo de cloro para a atividade biológica, bem como a posição desses átomos no anel aromático, que também pode influenciar na atividade. Com relação a cepa Gram negativa, observamos que mesmo os compostos ionizáveis, não apresentaram atividade significativa e que isso pode ser justificado pelo tipo de ensaio utilizado nesse estudo, não descartando a potencialidade dos mesmos.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA,2012). **Serviços da saúde**. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere_rm/index.htm. Acesso em 28 de março de 2016.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that aerobically. In: MURRAY, P. R. et al. (eds.). **Man Clin Microbiol**. 8. ed. Washington, DC: ASM Press, 2003. vol. 1, p. 384-404.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: **ArtMed**, 3 ed., 2015. p. 171-223, 347-401,407-442,231-252.

BARREIRO, E. J., e FRAGA, C. A. M. (2008). In Química Medicinal: as bases moleculares de ação dos fármacos.2ed. **ArtMed**, Porto Alegre, p.19-70.

BARREIRO, E. J., e FRAGA, C. A. M. Química Medicinal as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: **Artmed** Editora, 2008. p. 271-341.

BASSETTI M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Ann Clin Microbiol Antimicrob** 2013; 12 (22): 1-15.

BEER, B., CHASIN, M., CLODY, D. E., e VOGEL, J. R. (1972) Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase in brain: effect on anxiety. **Science (New York, N. Y.)** 176: 428-430.

BOUCHER, H. W. et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE An Update from the infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**. V. 48, p. 1-12, 2009.

BUITRAGO, EM, HERNÁNDEZ C, PALLARES C, PACHECO R, HURTADO K, Recalde M. Frequency and antibiotics resistance profiles of microbiological isolates at 13 clinics and referral hospitals in Santiago de Cali - Colombia. **Infect** 2014; 18(1): 3-11.

BURVENICH, C. et al. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.E39-E54, 2007.

CACHIBA, T. H.; CARVALHO, B. D.; CARVALHO, D. T. *et al.* Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados N-acilidrazônicos. **Química Nova**, v.35, n.8, p.; 1566-1569, 2012.

CARNEIRO M, FERRAZ T, BUENO M, KOCH BE, FORESTI C, LENA VF, et al. Antibiotic prescription in a teaching hospital: a brief assessment. **Revista da Associação Médica Brasileira** 2011; 57 (4): 421-4.

CARVALHO, C. et al. Monitoramento microbiológico sequencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **J Pediatr**, v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.

CASELI, E; ROMAGNOLI, C; VAHABI, R; TARACILA, M. A; BONOMO, R. A; PRATI, F. Click chemistry in lead optimization of boronic acids as β -lactamase inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 58, p. 5445-5458, 2015.

CAVACANTE, P. M. M.; SILVA, R. L.; FREITAS, J. J. R.; FREITAS, J. C. R.; FILHO, J. R. F. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química** 26, 319--329. 2015.

CAVALCANTI, S. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital. **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 56-63, 2005.

CHAMBERS, H.F.; SANDE, M.A. Fármacos antimicrobianos: considerações gerais. In: Goodman, L.S.; Gilman, A.G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: **McGrawHill**. 1996a, p. 757-776.

CHANG RL, Cho IH, Jeong BC, Lee SH. Strategies to minimize antibiotic resistance. *Int. J. Environ. Res Public Health* 2013; 10 (9): 4274-305.

CIAPETTI, P; GIELTHEN, B. Molecular variations based on isosteric replacements. In: WERMUTH, C. G. The practice of medicinal chemistry, London: **Academic Press**, ed. 4, 2015. P. 290-342.

CLSI^B - Clinical and Laboratorial Standards Institute. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – **Nona Edição M07-A9**, vol 32, n 2, 2012.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, **Wayne, PA**; 2015 (CLSI publication M100-S25).

COPE, AC. Hofmann CM, Wyckoff C, Hardenbergh E. Condensation reactions. II. Alkylidene cyanoacetic and malonic esters. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 63, p. 3452-3456, 1941.

COSTA, T. S., Ornelas, D. L., Guimarães, P. I. C., & Merçon, F. Confirmando a Esterificação de Fischer por Meios de Aromas. **Química Nova na Escola**, 19(1), 36---38. 2004.

CROXEN, M. A., FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.** p.26-38, 2010.

DEVRIESE, L. A., VANCANNEYT, M., BAELE, M., DE GRAEF, E., SNAUWAERT, C., CLEENWERCK, I., DAWYNDT, P., SWINGS, J., DECOSTE, A., HAESBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. Nov., a coagulase-positive species from animals. **Int. J. Systemol. Microbiol.** 2005; 55:1569-73.

FADLI, M.; SAAD, A.; SAYADI, S. et al. Antibacterial activity of Thymus maroccanus and Thymus broussonetii essential oils against nosocomial infection – **bacteria and their synergistic potential with antibiotics.** **Phytomedicine** 19, 464– 471; 2012.

FERNANDES, P. B.; MENZEL, R.; HARDY, D. J.; TSEDINH, Y.; WARREN, A.; ELSEMORE, D. A. Microbial resistance: novel screens for a contemporary problem. **Med. Res. Rev.**, New York, v. 19, n. 6, p. 559-568, 1999.

FERNANDES, P.; Antibacterial discovery and development--the failure of success? **Nat. Biotechnol.** 2006, 24, 1497.

FERREIRA, R.S; GLAUCIUS, O; ANDRICOPULO, A.D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: Oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, V.34, p.1770-1778, 2011.

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

GAWESKA, H.; KIELEC, J.; McCAFFERTY, D.; **Chem. Biol.** 2004, 11, 1330.

GILBERT, D. N. et al. Infectious Diseases Society of America: The 10 x 20 Initiative Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020. **Clinical Infectious Diseases**. V. 50, p. 1081-1083, 2010.

GUILARDE A.O, TURCHI MD, MARTELLI CMT, PRIMO MGB, BATISTA LJ de A. Bacteremias em pacientes internados em hospital universitário. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 2007; 53 (1): 34-38.

GUIMARÃES, D. O., MOMESSO, L. S., PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 3, 667-679, 2010.

HANSCH, C.; LEO, A. Exploring QSAR: fundamentals and applications in chemistry and biology. Washington: **American Chemical Society**, 1995. 557 p.

HOGAN, J.; SMITH, K.L. Coliform mastitis. **Veterinary Research**, v.34, n.5, p.507-519, 2003.

IDSA Infectious Diseases Society of America. Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives. IDSA PUBLIC POLICY. **Clinical Infectious Diseases**. V.52, p. 397-428-2011.

KLEVENS RM, MORRISON MA, NADLE J, PETIT S, GERSHMAN K, et al. (2007) Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **JAMA** 298: 1763–1771.

KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM, SCHRECKENBERGER PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: **Medsa**; 2001.

LEHTOLAINEN, T. et al. Effect of intramammary *Escherichia coli* Endotoxin in early- vs. late-lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.7, p.2327-2333, 2003.

LIMA, L. M; BARREIRO, E. J. Biososterism a useful strategy for molecular modification and drug design. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, p. 23-49, 2005.

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock. 12 ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2010, 1160 p.

MAHBOUBI, M.; BIDGOLI, F.G. Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. **Phytomedicine** 17, 548–550, 2010.

MANO, E.B. SEABRA, A.P.; **Práticas de Química Orgânica**. 3ª Ed. Edgard Blücher; 2002. 248 p.

MASUNARI, A.; REZENDE, P.; TAVARES, L. C. QSAR studies of nifuroxazide analogs with antimicrobial activity against multidrug-resistant *S. aureus* In: The 15th European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships & Molecular Modeling, 2004. Istanbul. Resumos de Trabalhos. Istanbul: **Prous Science**, 2004. p. 123.

MENDES, J. J. Resistência Antibiótica no *Staphylococcus aureus*; da Investigação Básica à Prática Clínica. **Rev. Port. Med. Int.** 2010; 17(1).

MERLINO J, Gill R, Robertson GJ. Application of lipovitellinsalt-manitol agar for screening, isolation, and presuntive identification of *Staphylococcus aureus* in teaching hospital. **J Clin Microbiol.** 1996; 34:3012-15.

MONTANARI, C. A. Química Medicinal: Contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química Nova**, v. 18, n.1, p.5664, 1995.

NATARO, J. P., KAPER, J. B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clin. Microbiol. Rev.** P.142-201, 1998.

NISHAMINY, K.; Am. J. Health-Syst. **Pharm.** 2006, 63, 1235.

NOKAMI, J.; KATAOKA, K.; SHIRAISHI, K.; OSAFUNE, M. O.J. **Org. Chem.**, 2001, 66, 1228.

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

OMS, Organización Mundial de la Salud. Estrategia Mundial OMS de contención de la resistencia a los antimicrobianos (**Resumen**).2001.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3. ed. São Paulo: **Sarvier**, 2010. 530 p.

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

PIZARRO-CERDÁ, J.; COSSART, P.; Bacterial adhesion and entry into host cells; **Leading edge review**; Cell; 2006.

RANG, H.P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. Agentes antimicrobianos. In: Farmacologia. 3. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 1997. p. 572-592.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; Farmacologia, 4a ed., **Guanabara Koogan S.A.**: Rio de Janeiro, 2001.

REZENDE, P.; MASUNARI, A.; SANTOS, M. G. B.; MAMIZUKA, E. M.; VESSONI-PENNA, T. C.; TAVARES, L. C. Hansch Analysis of nifuroxazide analogues with antimicrobial activity against MRSA **Barcelona, Drugs Fut.**, v. 27, p. 192-192. (Symposium on Medicinal Chemistry, 17. 2002).

SANTOS et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 6, p. 413-423, dezembro 2007.

SILVEIRA GP, NOME F, GESSER JC, SÁ MM. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Quim. Nova.** 2006; 29(4): 844-855.

SOUSA, J. C. (2006). Manual de Antibiótico Antibacterianos. Porto, **Fundação Fernando Pessoa**.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 33, n. 3, jun. 2000.

TIETZE, L. F.; BEIFUSS, U, in Comprehensive Organic Synthesis (Ed.: B. M. Trost), Pergamon Press: **Oxford**, 1991, vol.2, pp. 341-392.

TORTORA GI, FUNKE BR, CASE AL. Princípio de doença e epidemiologia. In: Microbiologia. 8^o ed. Porto Alegre; **Editora Artmed**; 2005; 408-433.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

TRABULSI, Luiz Rachid et al. Microbiologia. 4^a Ed. São Paulo: **Atheneu**, 2005.

VARALDO, P. E.; J. **Antimicrob. Chemother.** 2002, 50, 1.

VELOSO, C. O.; PINTO, A. C.; SANTOS, E. N.; MONTEIRO, J. L. F.; **Stud. Surf. Sci. Catal.** 2001, 135, 146.

VIEGAS-JUNIOR, C., DANUELLO, A., BOLZANI, V. S., BARREIRO, E. J., e FRAGA, C. A. M. (2007) Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry** 14: 1829-1852.

WALSH, C. Antibiotics: action, origins, resistance. Washington, DC: **ASM PRESS**, 2003. 335p.

WANNMACHER L, Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? **Uso Racional de Medicamentos**. 2004; 1(4) s/p.

WEITKAMP, J.; HUNGER, M.; RYMSA, U.; **Microporous Mesoporous Mater.** 2001, 48, 255.

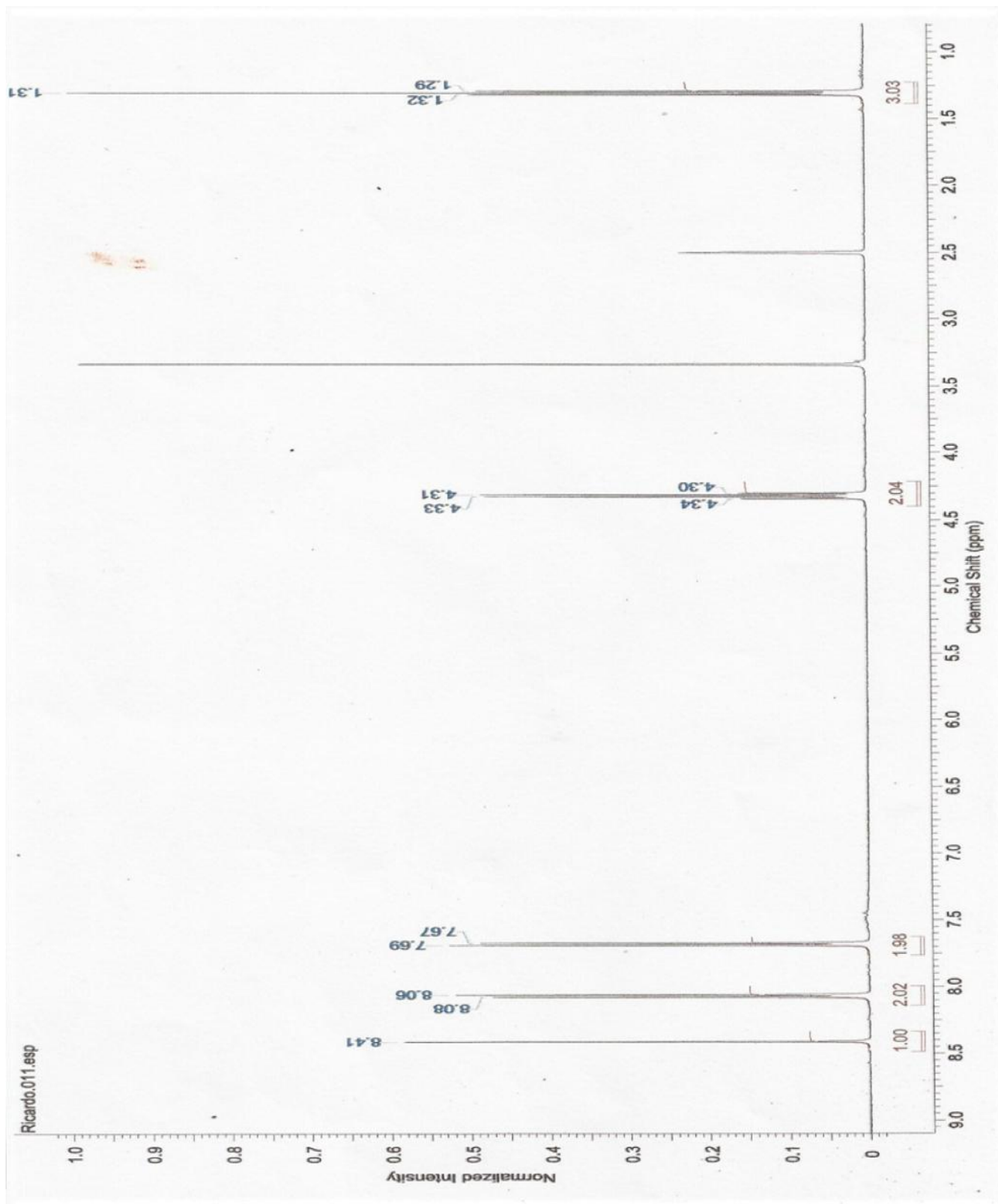
WERMUTH, C. G. Strategies in the search for new lead compounds or original working hypothesis. C. 6, 125-143p. In: WERMUTH, C. G., Ed The practice of medicinal chemistry (2008), 2 ed. London: **Academic Press**. P. 67-91.

WHO - World Health Organization. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana. Opções de ação**. 2012. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf Acesso em: 28 março. 2016.

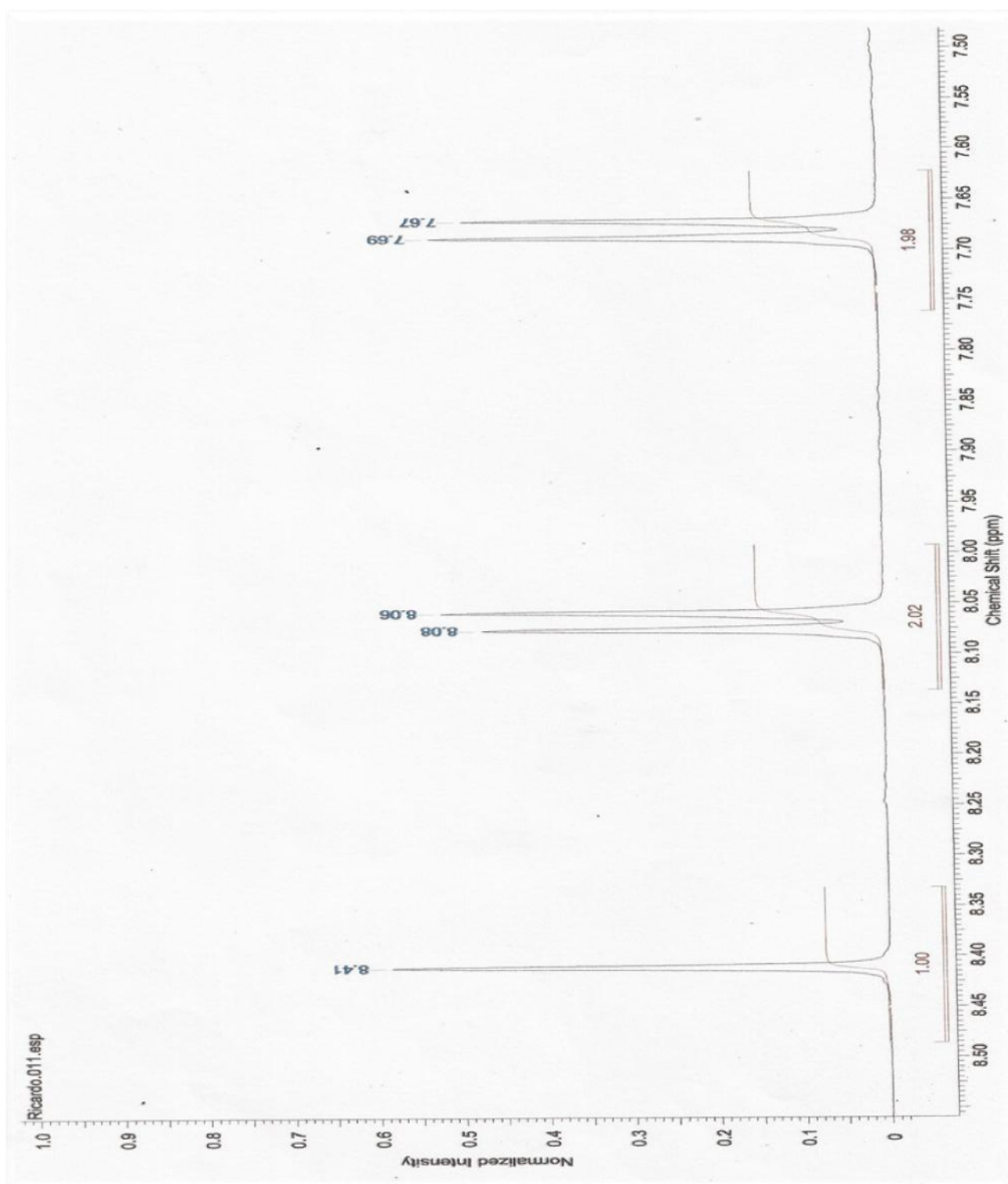
WHO - World Health Organization. Antimicrobial resistance: **global report on surveillance**. 2014. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112647/1/WHO_HSE_PED_AIP_2014.2_eng.pdf Acesso em: 28 março. 2016.

ANEXOS

ANEXO A - Espectro de RMN ^1H do Etil 2-ciano-3-(4-clorofenil) acrilato (AL-02).



ANEXO B - Expansão do Espectro de RMN ^1H do Etil 2-ciano-3-(4-clorofenil) acrilato (AL-02).



ANEXO C - Espectro de RMN ^{13}C do Etil 2-ciano-3-(4-clorofenil) acrilato (AL-02).