



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS V – MINISTRO ALCIDES CARNEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS SOCIAIS E APLICADAS  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ISLEY DE OLIVEIRA DINIZ**

**SÍNTESE, DOCKING E AVALIAÇÃO DE POTENCIAL ANTI *Staphylococcus aureus*  
DE NOVOS CANDIDATOS A ANTIBIÓTICOS POTENCIAIS INIBIDORES DA  
DIIDROFOLATO REDUTASE**

**JOÃO PESSOA – PB  
2014**

**ISLEY DE OLIVEIRA DINIZ**

**SÍNTESE, DOCKING E AVALIAÇÃO DE POTENCIAL ANTI *Staphylococcus aureus*  
DE NOVOS CANDIDATOS A ANTIBIÓTICOS POTENCIAIS INIBIDORES DA  
DIIDROFOLATO REDUTASE**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior

JOÃO PESSOA – PB  
2014

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.

D585s Diniz, Isley De Oliveira

Síntese, docking e avaliação de potencial anti *Staphylococcus aureus* de novos candidatos a antibióticos inibidores da diidrofolato redutase [manuscrito] : / Isley de Oliveira Diniz. - 2014.

55 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2014.

"Orientação: Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior, Departamento de Ciências Biológicas".

1. Hibridização molecular. 2. Sulfonamidas. 3. 2-amino-tiofeno. I. Título.

21. ed. CDD 570.6

Isley de Oliveira Diniz

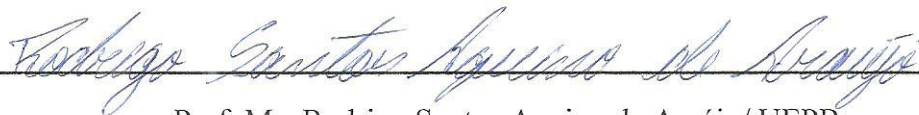
**SÍNTESE, DOCKING E AVALIAÇÃO DE POTENCIAL ANTI *Staphylococcus aureus* DE NOVOS CANDIDATOS A ANTIBIÓTICOS POTENCIAIS INIBIDORES DA DIIDROFOLATO REDUTASE**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

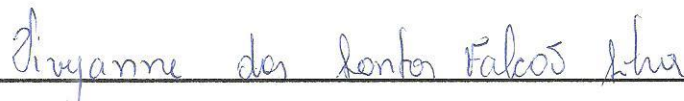
Aprovada Em 21/07/2014



Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior/ UEPB



Prof. Ms. Rodrigo Santos Aquino de Araújo/ UEPB



Profª Drª Vivyanne dos Santos Falcão Silva/ FCM

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos Meus pais, Ilza e Paulo, meu irmão Artur, e meu noivo Andrey por todos os momentos de paciência e amor. A meu orientador e todos os colegas de laboratório aos quais recorri nos momentos de dúvida, sem vocês a idealização desse trabalho seria impossível.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a todos os professores do curso que contribuíram para minha formação, a todos os colegas de curso, turma 2010.1, em especial a **Annyelle, Matheus, Rafaela, Adriene e Júlia**, somente na presença de vocês foi possível aturar o último período de curso.

Á toda família do **LSVM**, os que já se formaram e os que ainda irão, agradeço especialmente aos professores **Ricardo e Francisco** que foram meus principais pilares dentro do laboratório, aos técnicos, a **Jaismary** que foi uma grande colega de síntese e a todos que trabalham e estagiam no melhor laboratório de toda UEPB.

Um enorme agradecimento a minha família, meus verdadeiros amores, meu irmão **Artur**, minha mãe **Ilza** e meu pai **Paulo** por todos os momentos que acreditaram em mim, e me deram força e palavras de carinho e momentos de descontração nas horas mais difíceis.

Agradeço especialmente ao meu noivo **Andrey**, que me acompanha desde o início da graduação me dando forças para continuar, me fazendo sempre uma pessoa melhor, me estimulando sempre a estudar mais, e dizendo “seja a melhor no que faz”, e acima de tudo me amando do jeito que eu sou.

“A ciência às vezes é um processo lento. Dificilmente acontecem momentos de iluminação genial. É necessário precisão, tenacidade e dedicação.” Arno Penzias, 1978.

## RESUMO

O uso indiscriminado de antibióticos, associado ao desenvolvimento natural dos mecanismos de resistência de micro-organismos tem diminuído a eficiência terapêutica de alguns antibióticos. Apesar da existência de um grande arsenal terapêutico e várias gerações de antibióticos disponíveis, há uma necessidade contínua para a descoberta de novas entidades químicas com propriedades antibióticas, uma vez que o desenvolvimento de mecanismos de resistência por micro-organismos e o aparecimento de estirpes multi-resistentes emergem rapidamente, enquanto a introdução de novos agentes antimicrobianos é relativamente lenta. As sulfonamidas são agentes antibacterianos de largo espectro, análogos estruturais do ácido *p*-aminobenzóico, com atividade contra bactérias gram positivas e negativas. Derivados de tiofeno são também compostos importantes para o desenvolvimento de agentes antifúngicos e antibacterianos. Com base no princípio de hibridização molecular, neste trabalho, sintetizamos novas moléculas híbridas, que contém estes dois suportes, a fim de potencializar suas atividades. O processo de síntese se iniciou com obtenção de derivados do 2-amino-tiofeno, através da reação de Gewald, seguido pela condensação com cloreto de 4-acetilamino-benzenossulfonil em piridina, utilizando-se a irradiação em ultra-som. Após a purificação, os compostos foram caracterizados e suas estruturas comprovadas por RMN<sup>1</sup>H. Sete novos compostos foram sintetizados com sucesso, com rendimentos entre 40 e 99%, e as suas características físico-químicas determinadas. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e suas atividades como modificadores da atividade antibiótica (inibidores da bomba de efluxo), em linhagens de *Staphylococcus aureus* que superexpressam os genes NorA, MrsA e TetK. Três derivados atuaram como modificadores da atividade antibiótica, provavelmente por inibição de bomba de efluxo, em especial na linhagem SA-1199B (que superexpressa o gene *norA*). As sulfonamidas não têm ação inibitória de bombas de efluxo, e os resultados mostram que a porção tiofênica é a responsável por tal atividade, sugerindo que os novos compostos hibridizados, quando *in vivo* poderão agir por dois mecanismos de ação distintos, potencializando suas ações. Os resultados de docking mostram também a grande interação entre a enzima diidropteroato sintetase e as moléculas sintetizadas de forma mais eficaz que drogas já encontradas comercialmente. Os resultados indicam que os novos derivados híbridos são possíveis candidatos a protótipos de antibióticos, com grande potencial de agir por um mecanismo de ação sinérgico.

**Palavras-chave:** hibridização molecular; sulfonamidas; 2-amino-tiofeno; antibióticos; *Staphylococcus aureus*; inibidores de bomba de efluxo.



## ABSTRACT

The indiscriminate use of antibiotics associated to natural development of mechanisms of resistance of micro-organisms has decreased the therapeutic use of some antibiotics. Despite the large therapeutic arsenal available generations of antibiotics, there is a continuing need for the discovery of new chemical entities with antibiotic properties, since the development of resistance mechanisms by microorganisms strains and the appearance of multi-resistant emerge rapidly, while the introduction of new antimicrobial agents is relatively slow. The sulfonamides are broad spectrum antibacterial agents, structural analogues of p-aminobenzoic acid, with activity against gram positive and gram negative bacteria. Thiophene derivatives are also important for the development of antifungal and antibacterial compounds. Based on the principle of molecular hybridization, in this work, we synthesized new hybrid molecules containing these two scaffolds in order to enhance their activities. The synthesis process is started by obtaining derivatives gave 2-amino-thiophene by reaction of Gewald, followed by condensation with 4-acetylamino-benzenesulfonyl chloride in pyridine, using ultrasonic irradiation. After purification, the products were characterized and their structures evidenced by  $^1\text{H}$  NMR. Seven new compounds were synthesized successfully with yields between 40 and 99%, and its specific physicochemical characteristics. We determined the minimum inhibitory concentrations (MIC) and its activities as modifiers of antibiotic activity (efflux pump inhibitors), in strains of *Staphylococcus aureus* overexpressing the NorA, MrsA and TetK genes. S1, S2 and S4 worked compounds as modifiers of antibiotic activity, presumably by inhibiting the efflux pump, in particular strain SA-1199B (which overexpresses the gene Nora). The sulfonamides have no inhibitory action of efflux pumps, and the results show that the thiophene portion is responsible for the activity, suggesting that the new hybridized compounds, when in vivo may act by two distinct mechanisms of action, potentiating their actions. The results also show the docking interaction between the synthetase enzyme and synthesized molecules its effective more than drugs have found that commercially. The results indicate that the new hybrid derivatives are potential candidates for prototypes of antibiotics, with great potential to act by a mechanism of dual action.

**Keywords:** molecular hybridization; sulfonamides; 2-amino-thiophene; antibiotics; *Staphylococcus aureus*; efflux pump inhibitors.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	13
2. Referencial teórico .....	15
2.1 Histórico .....	15
2.2 Mecanismo de Ação das sulfonamidas .....	16
2.3 Síntese de Sulfonamidas .....	18
2.4 Relação entre estrutura e atividade (SAR) .....	19
2.5 O núcleo tiofênico e a importância de seus derivados .....	20
2.6 Síntese de 2-amino tiofenos .....	22
2.7 Planejamento Racional e Hibridização Molecular .....	22
2.8 Docking .....	23
2.9 A problemática da infecção bacteriana .....	24
2.9.1 Resistência Bacteriana .....	25
3. Objetivos .....	27
3.1 Objetivos Específicos .....	27
4. Metodologia .....	28
4.1 Parte Química .....	28
4.1.1 Rota Sintética .....	28
4.1.2 Procedimento Reacional padrão .....	29
4.1.3 Caracterização físico-química dos compostos .....	30
4.2 Parte Biológica .....	30
4.2.1 Linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
4.2.2. Antibióticos .....	30
4.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos novos compostos e antibióticos padrão .....	31
4.2.3.1. Determinação da CIM .....	31
4.2.4. Determinação da CIM da Norfloxacin, Tetraciclina e Eritromicina na Ausência e na Presença dos compostos – Avaliação da Atividade Moduladora .....	31
4.2.4.1 Avaliação da atividade moduladora .....	31
4.3 Docking .....	31
5. Resultados e Discussão .....	33
5.1 Parte Química .....	33
5.2 Parte Biológica .....	38
5.3 Estudos de Docking .....	42
6. Conclusões .....	45
Referências .....	46
ANEXO 01 - RMN <sup>1</sup> H DO COMPOSTO SULFA 01 .....	51
ANEXO 02 - RMN <sup>1</sup> H DO COMPOSTO SULFA 02 .....	52
ANEXO 03 - RMN <sup>1</sup> H DO COMPOSTO SULFA 03 .....	53
ANEXO 04 - RMN <sup>1</sup> H DO COMPOSTO SULFA 04 .....	54
ANEXO 05 - RMN <sup>1</sup> H DO COMPOSTO SULFA 08 .....	55

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> – Mecanismo de ação das sulfonamidas .....	17
<b>Esquema 2</b> – Exemplo de síntese de Gewald para a obtenção de 2-amino tiofenos substituídos .....	22
<b>Esquema 3</b> – Síntese de aminotiofenos através da reação de Gewald .....	28
<b>Esquema 4</b> – Esquema Geral de condensação.....	29
<b>Esquema 5</b> - Mecanismo de reação da síntese de 2-aminotiofenos através de Gewald. ....	33

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fórmula química da Sulfanilamida e de seu pró-fármaco o Prontosil.....	16
<b>Figura 2</b> – Similaridades entre o ácido- <i>p</i> -aminobenzóico e a sulfanilamida.....	17
<b>Figura 3</b> – Exemplo de síntese de novos compostos derivados de sulfonamidas .....	18
<b>Figura 4</b> – Esquema de síntese de novo composto derivado de sulfonamida realizado neste trabalho.....	18
<b>Figura 5</b> - Derivado metoxi-chalcona sulfonamida.....	19
<b>Figura 6</b> – Relação estrutura/atividade de sulfas.....	19
<b>Figura 7</b> - Estruturas químicas de diversos análogos estruturais da Sulfanilamida. ....	20
<b>Figura 8</b> – O núcleo tiofênico.....	20
<b>Figura 9</b> – Estrutura geral dos compostos testados. ....	21
<b>Figura 10</b> – Composto sulfonamídico sintetizado por meio da hibridação molecular através da hibridação da talidomida (a) e da hidroxí-uréia (b). ....	23
<b>Figura 11</b> – Estrutura terciária da enzima Diidropteroato sintetase de <i>Staphylococcus aureus</i> . Cadeias da proteína coloridas com gradiente de cor a partir da porção N-terminal para C-terminal (fonte: PDB – Protein Data Bank).....	23
<b>Figura 12</b> – Novos compostos sintetizados .....	34
<b>Figura 13</b> – Tiofeno sulfonamida antiglaucoma. (BALDWIN, et al. 1989). ....	36
<b>Figura 14</b> – Tiofeno sulfonamida inibidora da tirosina-fosfatase de <i>M. tuberculosis</i> .....	36
<b>Figura 15</b> . Espectro RMN <sup>1</sup> H do composto <b>Sulfa 08</b> .....	38
<b>Figura 16</b> – L-dopa (pró-fármaco) e processo de latenciação em dopamina.....	40
<b>Figura 17</b> – Modelo tridimensional da estrutura terciária da enzima DHPS e interação com seu potencial inibidor. ....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Dados obtidos da Organização mundial de saúde – OMS – Genebra, Suíça. ....	25
<b>Tabela 2</b> – Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos .....	26
<b>Tabela 3</b> – Características físico-químicas e rendimentos dos compostos sintetizados .....	35
<b>Tabela 4</b> – Dados dos espectros de RMN <sup>1</sup> H 400MHz. (δ em ppm).....	37
<b>Tabela 5</b> - Concentração Inibitória Mínima dos compostos derivados do tiofeno hibridizados com sulfonamidas frente às linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	39
<b>Tabela 6</b> . Atividade Moduladora dos compostos hibridizados.....	40
<b>Tabela 7</b> – Atividade antimicrobiana das moléculas antes da hibridização. ....	41
<b>Tabela 8</b> - Atividade moduladora com norfloxacin e brometo de etídeo na linhagem sa-1199b (norA) .....	42
<b>Tabela 9</b> - Em destaque as moléculas com melhores resultados e os medicamentos já encontrados comercialmente. ....	43

## 1.Introdução

A química medicinal é a ciência que busca a descoberta, desenvolvimento e avaliação de novos compostos químicos que possam atuar como possíveis agentes biológicos. Envolve dentre outras metodologias a síntese e a elucidação do mecanismo de ação de novas drogas no organismo alvo.

A síntese química de novas substâncias é uma das alternativas mais viáveis para a descoberta de possíveis candidatos a fármacos. Segundo Menegatti (2001) os fármacos de origem sintética representam significativa parcela do mercado farmacêutico, estimado, no ano 2000, em 390 bilhões de dólares. Até 1991, dos 886 fármacos usados na terapêutica, 680 (ou 79%) eram de origem sintética. Os restantes 186 (ou 21%) correspondiam àqueles de origem natural ou semi-sintética, e que quando observamos a estrutura dos fármacos empregados na terapêutica, constata-se que 62% deles são heterociclos.

O surgimento de cepas resistentes aos antimicrobianos tem sido fator constante na diminuição do valor terapêutico dos mesmos (SILVA, 2008). Na prática médica, o termo resistente é definido como, “aquele organismo que não é inibido ou destruído por um antimicrobiano estando na presença do mesmo em concentrações terapêuticas após sua administração” (SILVA, 2008). De forma que esse fenômeno a diversos antibióticos a agentes quimioterápicos impõe limitações para o tratamento de infecções tornando imprescindível a descoberta de novos agentes antibacterianos (WESTON, 1998).

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, mais de 70% das bactérias que causam infecções hospitalares são resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento dos pacientes (OLIVEIRA & SILVA, 2008). Estudos mostram ainda que, em alguns países da Europa cerca de 45% dos pacientes apresentam algum processo infeccioso diagnosticado (MEDEIROS, 2004).

As ferramentas biotecnológicas, associadas aos métodos de química medicinal, como a síntese racional de novos fármacos, ganham papel de destaque no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica. O conhecimento das estruturas de alvos macromoleculares ou de complexos do tipo ligante-receptor permite a aplicação de estratégias de planejamento de fármacos de forma mais eficiente (GUIDO; ANDRICOPULO & OLIVA, 2010).

Dessa forma, é possível explorar o espaço químico delineando o trabalho de identificação, seleção e otimização de moléculas capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com o alvo molecular selecionado (GUIDO; ANDRICOPULO & OLIVA, 2010)

como, por exemplo, enzimas, que hoje já são os alvos mais estudados na química medicinal, por serem extremamente importantes em razão do seu papel essencial em vias bioquímicas associadas a doenças e disfunções em humanos.

Nesse contexto, vemos que a síntese de novos compostos é uma necessidade atual, sendo as ferramentas de planejamento racional e uso de técnicas computacionais instrumentos que otimizam tal processo na busca de novas drogas eficazes contra as infecções causadas pelos microorganismos. É também importante a renovação dessa classe de antimetabólico (sulfonamidas) na busca de minimizar a resistência, e otimizar o tratamento contra os mais diversos microorganismos.

## 2. Referencial teórico

### 2.1 Histórico

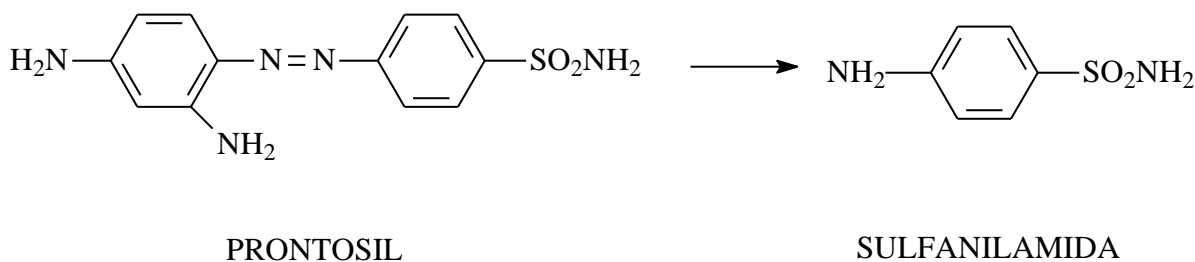
Antes de 1932 não existiam drogas efetivas para o tratamento das infecções bacterianas sistêmicas (antibióticos) e frequentemente tais infecções eram fatais (ALLINGER, 1976). Os primeiros fármacos antibacterianos seletivamente tóxicos são os da família das sulfas, que surgiram com uma tentativa de Domagk de levar adiante as ideias de Ehrlich. Paul Ehrlich ficou impressionado com o fato de que certas tintas manchavam algumas células e outras não, levando-o a idéia de seletividade, onde seria possível encontrar corantes que seriam absorvidos por determinados microorganismos, mas não por células do hospedeiro. Esta idéia foi extrapolada para a área medicinal, resultando na descoberta de um fármaco efetivo contra a sífilis.

Em 1935, o bacteriologista alemão Gehard Domagk, que estava avaliando o efeito de várias substâncias em cepas de estreptococos, tratou com sucesso a filha de uma infecção virulenta de estreptococos usando o corante azo prontossil. A investigação subsequente mostrou que esse fármaco era reduzido *in vivo* ao agente ativo *p*-aminobenzenosulfonamida (THOMAS, 2003), levando nos anos seguintes ao estudo aprofundado das substâncias derivadas do núcleo sulfonamídico.

A descoberta desse novo fármaco marcou o início da quimioterapia moderna, que durante a década seguinte levou à síntese e testes de novos agente antibacterianos desta classe. Estes foram também os primeiros estudos de estrutura atividade, demonstrando a importância da modificação molecular no desenvolvimento de fármacos. Os estudos realizados nessa época foram um dos primeiros exemplos onde um novo composto levou a outros compostos para outras doenças, levando também à descoberta de efeitos colaterais através de estudos clínicos e farmacológicos.

As sulfonamidas são agentes antimetabólicos, descoberto em 1935, quando foi observado que um corante, chamado prontossil possuía atividade antibacteriana *in vivo*. Posteriormente foi descoberto, que esse corante sofre metabolismo enzimático e o verdadeiro agente bacteriano é seu metabólito: a sulfanilamida (**Figura 1**). O corante funciona como um pró-fármaco, que através do processo de latenciação, é hidrolisado enzimaticamente e libera a sulfa ativa (CORRÊA, 2006).



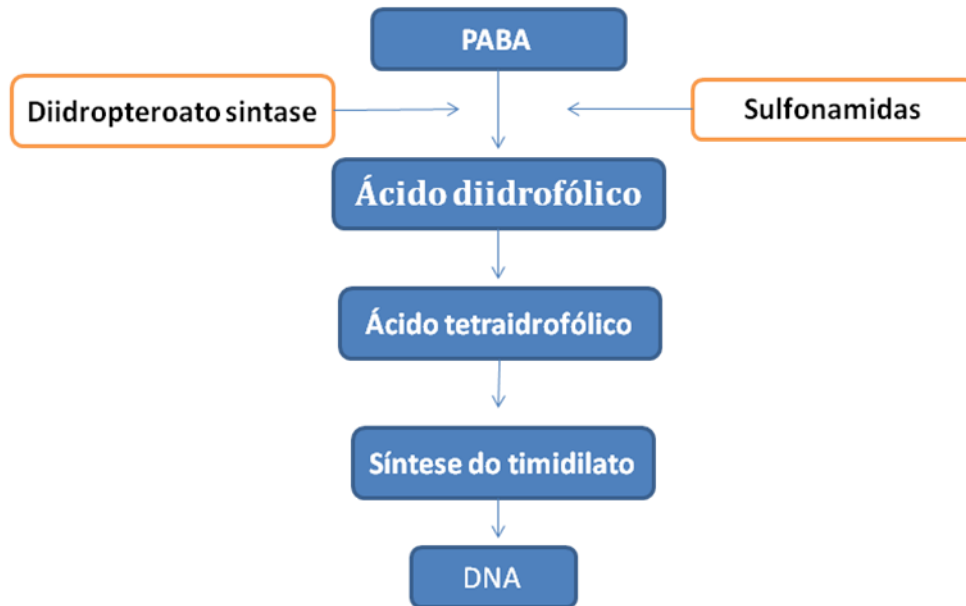


**Figura 1** – Fórmula química da Sulfanilamida e de seu pró-fármaco o Prontosil

## 2.2 Mecanismo de Ação das sulfonamidas

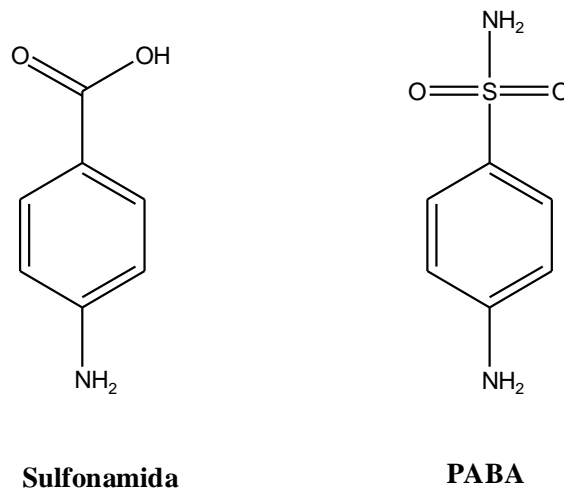
As sulfonamidas (drogas à base de sulfas), como a sulfanilamida, são antibióticos estruturalmente análogos ao ácido *p*-amino benzoico (PABA) (Figura 2.2), constituinte do tetraidrofolato (THF), essas drogas inibem competitivamente a síntese bacteriana de THF na etapa de incorporação do ácido *p*-aminobenzoico, bloqueando as reações que requerem THF (VOET, 2006). As sulfonamidas têm efeito bacteriostático e inibem o metabolismo do ácido fólico, por mecanismo competitivo. As células humanas conseguem aproveitar o folato exógeno para o metabolismo, enquanto as bactérias dependem da produção endógena, as sulfas, portanto não tem efeito no homem, porque este não sintetiza o ácido fólico no organismo, mas são fatais para muitas bactérias (ALLINGER, 1976).

Sua atividade se dá pela inibição da enzima diidropteroatossintetase, que catalisa a reação entre o 2-amino-4-hidroxi-6-metil-7,8-diidropteridina difosfato e o ácido *p*-amino benzoico, formando diidrofolato. A sulfonamida age se ligando ao sítio ativo e reagindo com o 2-amino-4-hidroxi-6-hidroxi-6-metil-7,8-diidropteridina difosfato, formando um produto que não pode ser convertido em ácido fólico (THOMAS, 2003), portanto a reação que dispõe o átomo final do anel de purina, fornecido por meio da formilação pelo  $N^{10}$ -formil-THF, gerando 5-formaminoimidazol-4-carboxamida—ribotídeo é inibida indiretamente (VOET, 2006). Como resultado, as bactérias não conseguem produzir suficiente tetraidrofolato, que é usado como coenzima na produção das purinas necessárias para a síntese de DNA e para a reprodução celular subsequente (**Esquema 1**).



**Esquema 1** – Mecanismo de ação das sulfonamidas

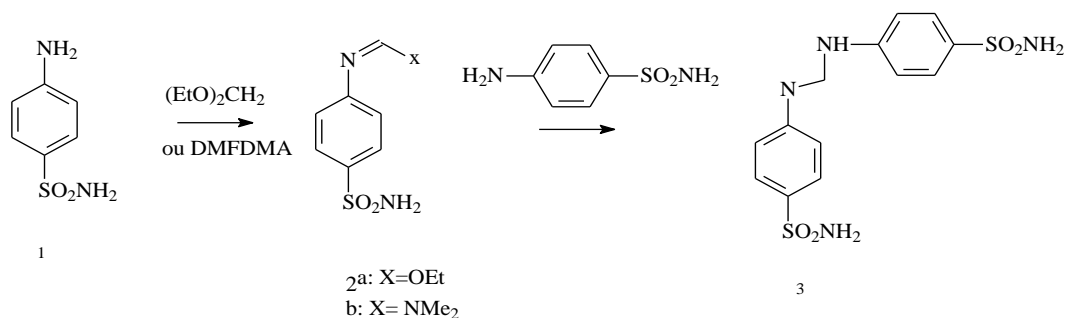
Das similaridades entre o PABA e as sulfas estão as distâncias entre a amina e o grupamento ácido (que são análogas), a amina primária aromática, anel benzeno *p*-dibusstítuío, similaridade em seu pKa e forma espacial oblonga (em formato oval) (BARRIENTOS, 2009) (**Figura 2**).



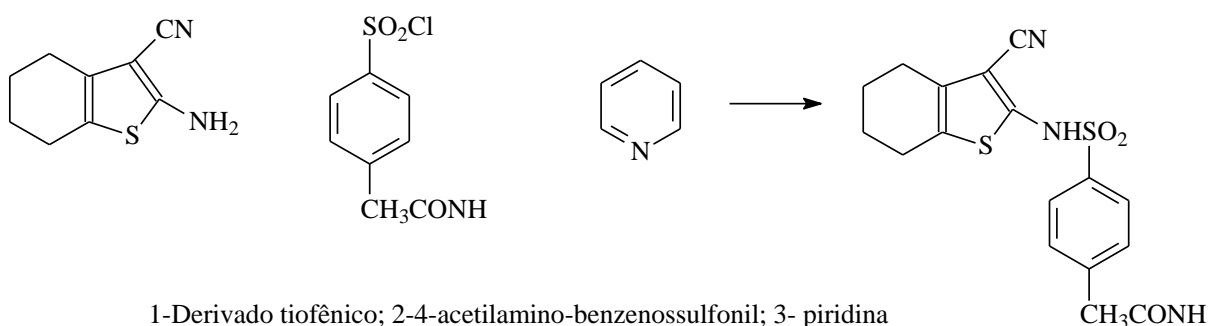
**Figura 2** – Similaridades entre o ácido-*p*-aminobenzóico e a sulfanilamida

### 2.3 Síntese de Sulfonamidas

As sulfonamidas podem ser sintetizadas a partir de cloretos de sulfonila, estes cloretos possuem hidrogênios alfa que reagem com base, dando intermediários muito reativos chamados sulfenos. A reatividade dos sulfenos é semelhante a dos cetenos. Na presença de compostos do tipo álcool ou amina ocorre a adição, dando sulfonados, sulfonamidas etc. (ALLINGER, 1976). Podemos ver abaixo alguns exemplos de síntese de sulfonamidas sintetizadas por Alsughayer et al. (2010) (**Figura 3**) e (**Figura 4**) exemplar sulfonamídico tiofeno realizado neste trabalho.

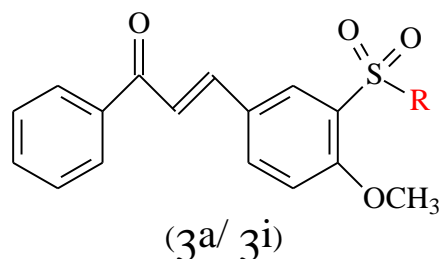


**Figura 3** – Exemplo de síntese de novos compostos derivados de sulfonamidas.



**Figura 4** – Esquema de síntese de novo composto derivado de sulfonamida.

O trabalho de Magalhães (2009) demonstrou que uma nova série de derivados de sulfas (metoxi-chacona sulfonamidas) foram sintetizadas utilizando-se da hibridação molecular que incorpora ao anel da B – chalcona os grupos 4-metoxi e 3-sulfonamida com êxito (**figura 5**), e ainda mais, demonstrando que estudos de avaliação do perfil inibitório as moléculas com maior atividade contra *Leishmania brasiliensis*, mostrando-se inclusive superior a fármacos já encontrados comercialmente como a Pentamidina e Glucantime.

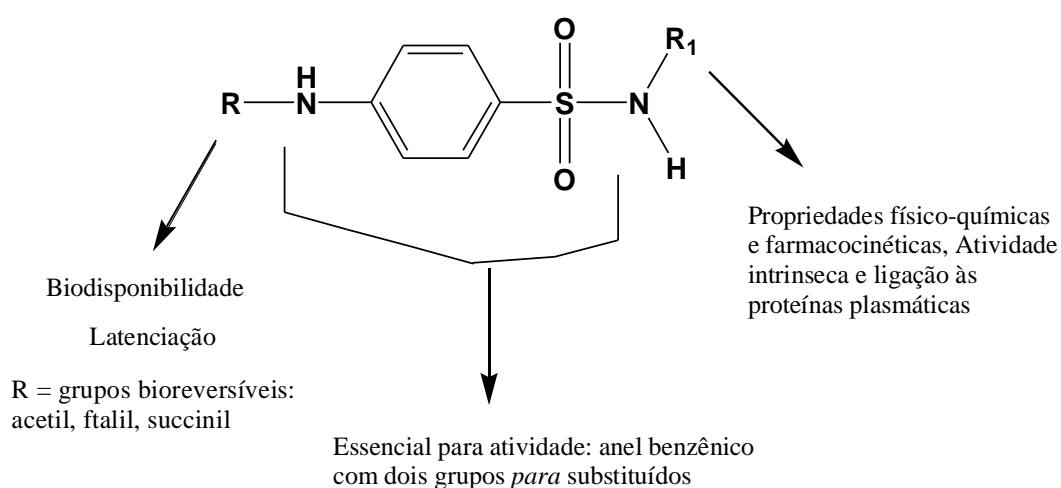


R: N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; N(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; Pirrolidina; Morfolina; Anilina; 4-cloro.anilina; 3,4 dicloro. anilina; 4-metoxi .anilina; Benzilamina

**Figura 5** - Derivado metoxi-chalcona sulfonamida.

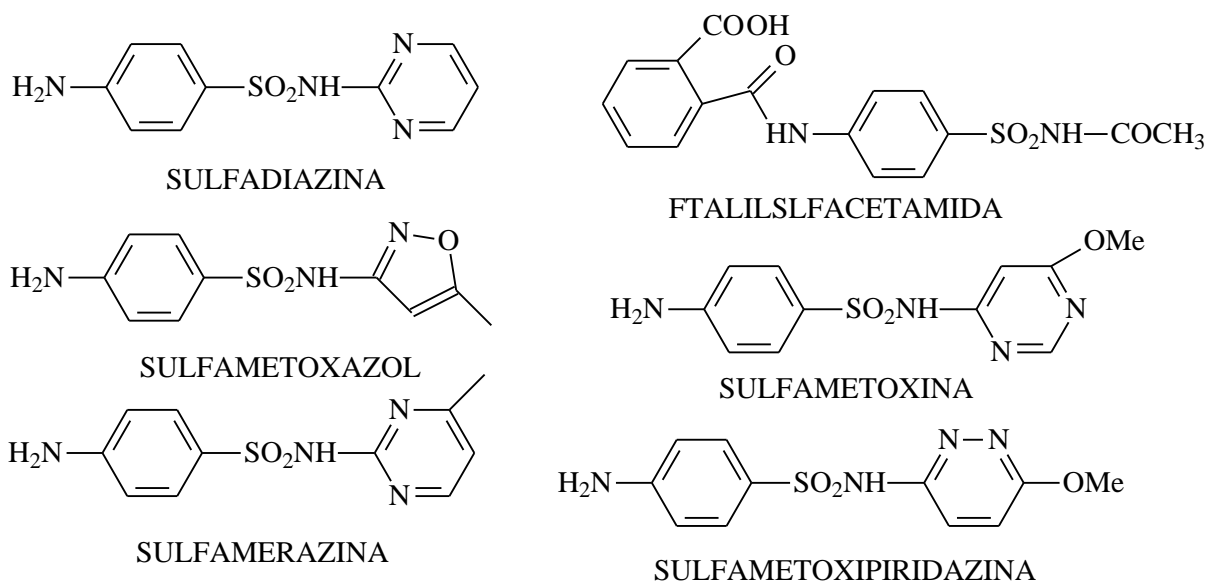
## 2.4 Relação entre estrutura e atividade (SAR)

Segundo Barrientos (2009) a síntese de uma gama enorme de derivados sulfonamídicos levou a várias conclusões sobre a atividade das sulfonamidas: de que o grupamento *p*-amino é essencial para a atividade e não pode ser substituído, tendo como única exceção quando o grupamento substituinte for uma amida, as amidas em si são inativas, mas *in vivo* podem ser metabolizadas e regenerar o composto ativo, e portando podem ser usadas como pró-fármacos; O anel aromático e o grupo funcional sulfonamidas também são fundamentais; O anel aromático pode somente ser *p*-substituído; O nitrogênio da sulfonamida deve ser sempre secundário (**Figura 6**).



**Figura 6** – Relação estrutura/atividade de sulfas

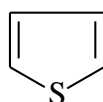
E graças aos extensivos estudos feito na química das sulfas, outros compostos de interesse terapêutico foram encontrados, como por exemplo a tolbutamida, um agente antidiabético e a hidroclorotiazida, um agente anti-hipertensivo (ALLINGER, 1976). Outros exemplos de sulfas já encontradas comercialmente são: sulfatiazol, sulfadiazina, sulfapiridina, sulfamerazina, sulfametoxazol, todas utilizadas contra infecções sistemicas causadas por microorganismos (**Figura 7**).



**Figura 7** - Estruturas químicas de diversos análogos estruturais da Sulfanilamida.

## 2.5 O núcleo tiofênico e a importância de seus derivados

O tiofeno consiste em um anel heterocíclico aromático pentagonal, onde um carbono metilênico é substituído por um átomo de enxofre (**Figura 8**) (ZHONGHAI, 2005), seus derivados são conseqüentemente fragmentos estruturais importantes em muitos compostos farmacêuticos e químicos e como resultado, eles são incorporados em novas entidades químicas por químicos medicinais. (MEOTTI et al., 2003).



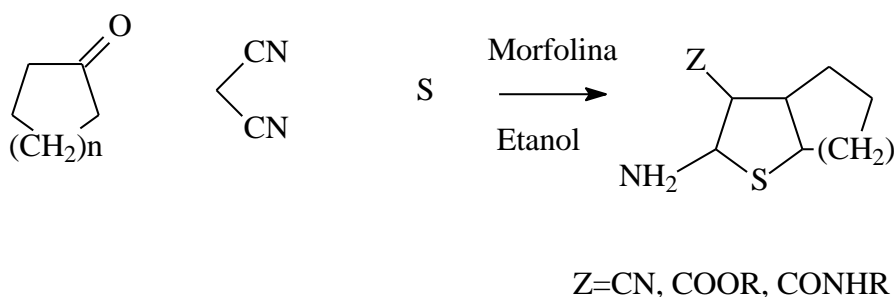
**Figura 8** – O núcleo tiofênico

Compostos derivados do anel tiofênico frequentemente apresentam atividade biológica antimicrobiana, possuindo um amplo espectro de atividades biológicas conhecidas, dentre elas a antifúngica, anti-protozoário, anti-helmíntica, anestésica (SIQUEIRA et al., 2010). Vários



## 2.6 Síntese de 2-amino tiofenos

A classe dos 2-amino-tiofenos caracterizam-se como precursores de produtos farmacêuticos e na concepção de medicamentos. Várias são as possibilidades de obtenção do 2-amino-tiofeno. Uma das rotas sintéticas utilizadas na obtenção dos derivados tiofênicos é a já descrita e tradicional reação de Gewald (1961) (**Esquema 2**). A reação de Gewald combina uma cetona ou aldeído, uma nitrila ativada, e enxofre na presença de uma base amina adequada a fim de obter tiofenos tri e tetra substituídos (CASTANEDO, 2001).



**Esquema 2** – Exemplo de síntese de Gewald para a obtenção de 2-amino tiofenos substituídos

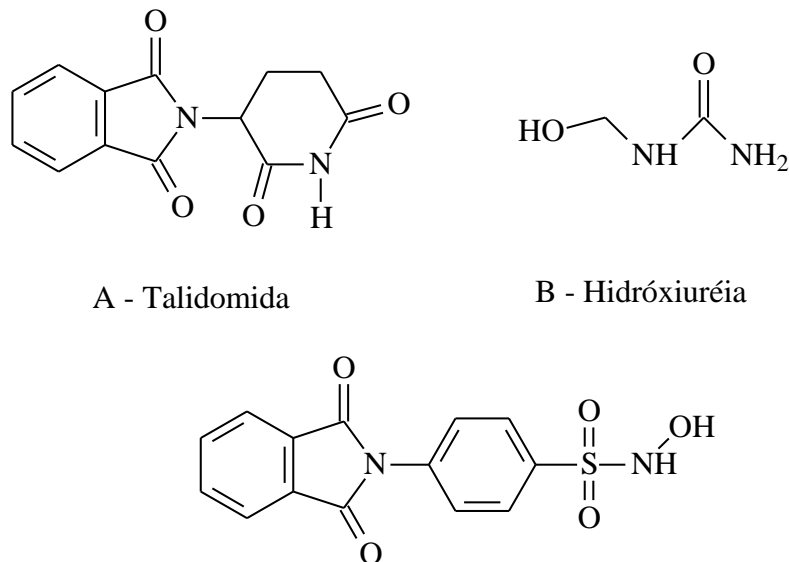
## 2.7 Planejamento Racional e Hibridização Molecular

Pode-se constatar que as descobertas de fármacos ocorreram, em determinados momentos como fruto do acaso ou baseadas no uso de determinados produtos naturais, em geral de origem vegetal, e foram através do tempo, sendo gradualmente substituídas por estratégias racionais (BARREIRO, 2005). Atualmente a química medicinal, através do planejamento racional de fármacos permite o direcionamento da síntese de novas moléculas bioativas para o tratamento de doenças e/ou disfunções metabólicas com maior rapidez e eficiência.

Montanari & Bolzani (2001) ressaltam a importância do planejamento molecular para que sejam realizadas de forma racional as modificações moleculares na estrutura de um protótipo. Tais modificações são minuciosas e de grande importância para aumentar a probabilidade de a molécula apresentar atividade biológica.

Uma ferramenta importante para a construção de um novo fármaco é a técnica de Hibridação Molecular (HM). Tal ferramenta é uma estratégia de planejamento racional de novos ligantes ou composto-protótipo, baseada no reconhecimento das subunidades farmacofóricas na estrutura química de dois ou mais compostos bioativos conhecidos, e que

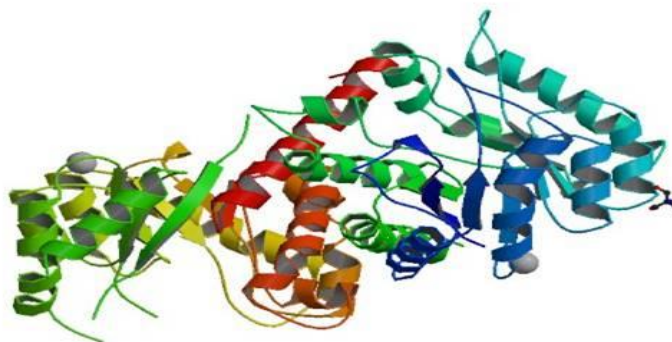
através de uma fusão dessas subunidades leva a uma nova entidade química híbrida (**Figura 10**), com uma nova arquitetura molecular que mantém as características das moléculas originais (VIEGAS, 2007 *apud* BARBOSA, 2010).



**Figura 10** – Composto sulfonamídico sintetizado por meio de hibridação molecular através da união entre talidomida (a) e da hidróxi-uréia (b)

## 2.8 Docking

A modelagem molecular consiste numa visualização gráfica computacional e da representação da geometria de uma molécula. O estudo de docking nesse contexto é uma ferramenta de modelagem molecular e corresponde um estudo de encaixe destes compostos no sítio receptor para verificar quais interações ocorrem entre o composto e o receptor e quais grupos constituintes da molécula participam desta interação (WALTER, 2004) (**Figura 11**).



**Figura 11** – Estrutura terciária da enzima Dihidropteroato sintetase de *Staphylococcus aureus*. Cadeias da proteína coloridas com gradiente de cor a partir da porção N-terminal para C-terminal (fonte: PDB – Protein Data Bank).



O estudo de docking portanto é uma ferramenta técnica que tem como objetivo prever a estrutura do complexo intermolecular entre duas ou mais moléculas. Na prática, essa técnica foi desenvolvida com o intuito de encontrar a melhor orientação e conformação de um ligante no sítio receptor, sendo sua avaliação feita através da medição da energia de interação do complexo ligante-proteína e pela energia intramolecular do ligante (ARAÚJO, 2010).

O entendimento detalhado das interações entre receptores biológicos e seus ligantes é essencial para a interpretação de inúmeros fenômenos bioquímicos (WALTER, 2004) dentre estes podemos citar uma maior interação entre molécula e alvo biológico, fazendo deste estudo uma importante ferramenta para a descoberta de novos fármacos.

Os estudos começam com uma base de dados de compostos, bem como a estrutura de um receptor de interesse, e a pergunta: Dos compostos na base de dados, qual é mais provável que realmente se ligue ao receptor? (SHOICHET, 2002). Os métodos de docking envolvem uma função de pontuação de energia contendo termos que descrevem as interações estéricas, eletrostáticas, de ligações de hidrogênio e hidrofóbicas, que classificam os melhores modos de ligação (orientação e conformação) do ligante no sítio receptor (ARAÚJO, 2010).

Um dos sucessos recentes mais significativos no desenho computacional de novos fármacos é o desenvolvimento do *saquinavir*, um inibidor de protease utilizado para retardar o crescimento do vírus da imunodeficiência de humanos (HIV) em indivíduos infectados. O *saquinavir* foi desenhado em computador de forma a ligar-se ao sítio ativo da protease do HIV, com base no conhecimento da estrutura tridimensional do complexo protease-substrato (MADIGAN, 2010).

## 2.9 A problemática da infecção bacteriana

Uma infecção é causada pela presença e multiplicação de microorganismos no organismo humano, desencadeando uma resposta imunológica que pode condicionar o aparecimento de sintomas. As infecções bacterianas causam alto nível de morbidade em pacientes que já se encontram com outras doenças, isso ocorre por que estes pacientes se encontram com as defesas naturais debilitadas.

Na escala mundial as doenças infecciosas são um sério problema de saúde pública, sendo responsáveis aproximadamente por 30% dos 56 milhões de óbitos anuais (MADIGAN *et al.*, 2010). Dentre as 20 principais causas de mortes decorrentes de infecção, as bactérias respondem por 45% do total (OMS, 2002) (**Tabela 1**)

O controle eficiente das doenças infecciosas ainda consiste em um desafio mundial que requer soluções científicas, médicas, econômicas, sociológicas, políticas e educacionais (MADIGAN *et al.*, 2010).

**Tabela 1** – Dados obtidos da Organização mundial de saúde – OMS – Genebra, Suíça.

<b>Mortes mundiais causadas por doenças infecciosas em 2002</b>	
Doenças diarréicas	1.798.000
Tuberculose	1.566.000
Coqueluche	294.000
Meningite bacteriana	173.000
Sífilis	153.000
Infecções por clamídias	16.000
Infecções respiratórias agudas (bactérias, vírus e fungos)	3.963.000
Tétano	214.000

### **2.9.1 Resistência Bacteriana**

A resistência aos fármacos antimicrobianos é um dos principais problemas em relação a muitos microorganismos patogênicos, especialmente em ambientes hospitalares. A resistência consiste na capacidade adquirida por um organismo de resistir aos efeitos de um agente quimioterápico ao qual ele é normalmente suscetível, sendo a capacidade de adquirir resistência inerente a de todos os microorganismos (MADIGAN, 2010).

Segundo Madigan (2010) existem seis tipos de mecanismos de resistência, são eles: 1) O organismo pode ser desprovido da estrutura inibida por um antibiótico; 2) O organismo pode ser impermeável ao antibiótico; 3) O organismo pode ser capaz de modificar o antibiótico para uma forma inativa; 4) O organismo pode modificar o alvo do antibiótico; 5) Pode ocorrer o desenvolvimento de uma via bioquímica resistente; 6) O organismo pode ser

capaz de bombear para fora um antibiótico que está entrando na célula, um processo chamado *efluxo* (Tabela 2).

**Tabela 2** – Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos

<b>Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos</b>		
<b>Mecanismo de resistência</b>	<b>Exemplo de Antibiótico</b>	<b>Mecanismo presente em:</b>
Redução da permeabilidade	<b>Penicilinas</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bactérias entéricas</i>
Inativação do antibiótico (ex.:enzimas modificadoras)	<b>Penicilinas</b> <b>Clorafenicol</b> <b>Aminoglicosídeos</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacteria entericas</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Alteração do alvo	<b>Eritromicina</b> <b>Rifamicina</b> <b>Estreptomicina</b> <b>Norfloxacina</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacteria entérica</i>
Desenvolvimento de uma via bioquímica resistente	<b>Sulfonamidas</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacteria entéricas</i>
Efluxo	<b>Tetraciclina</b> <b>Clorafenicol</b> <b>Eritromicina</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacteria entéricas</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus spp.</i>

Com vista aos dados acima apresentados, o presente trabalho foi realizado com a preocupação de potencializar as atividades das moléculas citadas (tiofeno e sulfonamida), unindo-as em uma só, e a partir daí realizar testes biológicos e computacionais, visando a descoberta de um novo fármaco que auxilie na luta contra as infecções que atualmente atinge a sociedade.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar novos derivados sintéticos contendo uma porção 2-aminotiofênica associada a uma porção sulfonamida potenciais inibidores da diidrofolato redutase como também determinar sua atividade antibacteriana *in vitro*, frente a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* também como promover estudos de docking molecular.

#### 3.2 Objetivos específicos

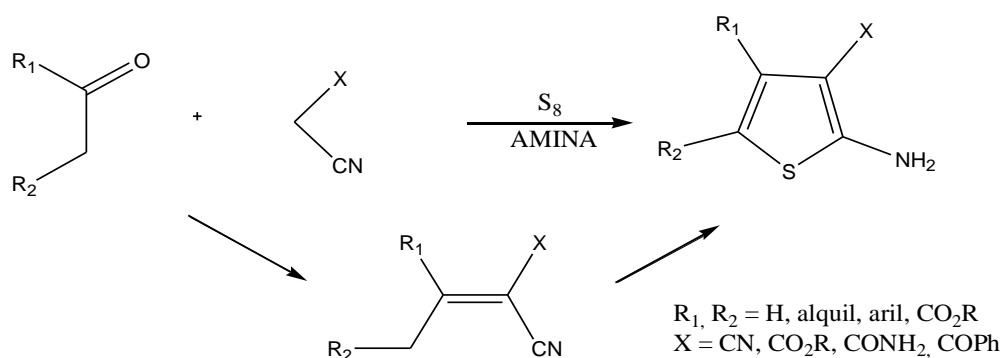
- Desenvolver uma rota sintética de obtenção dos novos derivados contendo ambas porções (sulfonamida e tiofeno) através do uso de irradiação de ultrassom;
- Purificar e determinar suas características físico-químicas (aparência, fator de retenção, ponto de fusão) e rendimentos;
- Comprovar estruturalmente as novas estruturas através de RMN<sup>H</sup>.
- Avaliar o perfil de atividade antibacterina dos derivados híbridos frente a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, tal como atividade moduladora e espectro de ação;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos mais ativos;
- Determinar a atividade moduladora de ambas as porções separadamente, sulfonamida e 2-aminotiofenos;
- Promover estudos de Docking molecular a fim de desvendar as moléculas com melhor interação com a enzima diidrofolato redutase.

## 4. Metodologia

### 4.1 Parte Química

#### 4.1.1 Rota Sintética

A síntese foi composta por duas reações amplamente descritas na literatura. Primeiro, a clássica reação de Gewald (GEWALD *et al.*, 1996 ), visando a obtenção dos compostos de partida 2-amino-tiofenos, se trata de uma rota convergente, que utiliza condições brandas e reagentes de baixo custo resultando nos compostos desejados e bons rendimentos (CHAKRABARTI, *et al.*, 1993; CALLIGARO *et al.*, 2010) (**Esquema 3**).



**Esquema 3** – Síntese de aminotiofenos através da reação de Gewald

Após sintetizados os adutos de Gewald, estes foram condensados ao cloreto de 4-acetamidobenzeno-sulfonila, através de uma reação de *N*-sulfonilação em meio básico, sob irradiação em banho de ultrassom 40kHz, fornecendo os compostos finais (**Esquema 4**).



### 4.1.3 Caracterização físico-química dos compostos

O fator de retenção ( $R_f$ ) foi obtido a partir de cromatografia em camada delgada pela fórmula  $R_f = d_c/d_s$ , onde  $d_c$  é a distância percorrida pelo composto e  $d_s$  é a distância percorrida pelo sistema de eluição hex/AcOEt (3:7).

A aparência dos compostos (cor) foi avaliada visualmente através da observação do produto sobre fundo claro e escuro. O rendimento foi calculado pesando-se a massa do produto obtido em gramas e em seguida calculado o número de mols referente à massa através da fórmula:  $n^\circ$  de mols do produto  $\times$  100 /  $n^\circ$  de mols do produto de partida.

Na espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H) foram realizados primeiramente testes de solubilidade das substâncias (metanol, clorofórmio e dimetilsulfóxido) a fim de definir qual o melhor meio para a realização do teste. Em seguida, foram separadas amostras de 10mg de cada produto e acondicionados em tubos de RMN para a determinação dos compostos.

Para a determinação do ponto de fusão, uma pequena amostra do produto já purificado foi colocado em capilar e colocado em fusiômetro a fim de determinar tal característica.

## 4.2 Parte Biológica

### 4.2.1 Linhagens de *Staphylococcus aureus*

Foram utilizadas linhagens de *Staphylococcus aureus* fornecidas pelo Dr. Simon Gibbons (*University of London*), linhagem SA-1199B, que superexpressa o gene norA que codifica a proteína de efluxo NorA, responsável pelo efluxo de fluorquinolonas e outras substâncias (KAATZ *et al.*, 1993; KAATZ; SEO, 1995); RN-4220 que possui o plasmídeo pUL5054, o qual, carrega o gene que codifica a proteína para efluxo de macrolídeos (MrsA) (ROSS *et al.*, 1989) e IS-58, que possui o gene que codifica a proteína TetK para efluxo de tetraciclina (GIBBONS; UDO, 2000).

Estas linhagens são mantidas em meio de ágar sólido (*Brain Heart Infusion- BHI*, Difco). Antes de serem utilizadas, as células crescem em caldo nutritivo de infusão (*Brain heart infusion- BHI*, Difco) por 18-24hs a 37°C.

### 4.2.2. Antibióticos

Foram utilizados três antibióticos, norfloxacin (NOR), da classe das fluorquinolonas, tetraciclina (TET) e eritromicina (ERI). Todos esses foram obtidos do fabricante SIGMA.

### **4.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos novos compostos e antibióticos padrão**

#### **4.2.3.1. Determinação da CIM**

Os valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos novos compostos e dos antibióticos, foram determinadas em caldo nutritivo (BHI) através da técnica de microdiluição, usando uma suspensão de c.a.  $10^5$  ufc/mL e com concentrações variando de 256 µg/mL a 4µg/mL (diluições seriadas  $\frac{1}{2}$ ). A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano. Para a melhor visualização do crescimento bacteriano após 24hs, foi feito uso da solução (0,01%) do corante resazurina (Sigma-Aldrich).

### **4.2.4. Determinação da CIM da Norfloxacin, Tetraciclina e Eritromicina na Ausência e na Presença dos compostos – Avaliação da Atividade Moduladora**

#### **4.2.4.1 Avaliação da atividade moduladora**

Para avaliação das Sulfas **01, 02, 03, 04, 06, 08 e 09** como modificadores da atividade antibiótica (inibidores da bomba de efluxo), a metodologia básica consistiu na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de antibióticos, na presença e ausência do produto sintético (STAVRI *et al.* 2007). A concentração do produto foi àquela correspondente a  $\frac{1}{4}$  ou  $\frac{1}{8}$  da sua CIM (concentração subinibitória) (STAVRI *et al.*, 2007). Da mesma forma, para uma melhor visualização do crescimento bacteriano após 24hs, foi feito uso da solução (0,01%) do indicador resazurina (Sigma-Aldrich).

Foram calculadas também utilizando-se a mesma metodologia as concentrações inibitórias mínimas e avaliação da atividade moduladora para ambas porções (sulfa e 2-aminotiofeno) separadamente das moléculas sintetizadas.

### **4.3 Docking**

A macromolécula (DHPS) foi analisada no programa Molegro Molecular Viewer 2.5 (MOLEGRO, 2013). Foram retirados os cofatores, a cadeia B da proteína e os ligantes, e a cadeia A da proteína foi salva. O receptor e as sulfas ligantes foram preparados no programa VEJA em sua forma desacetilada (PEDRETTI, 2004), e utilizando-se o AutodockWizard (WOLF, 2009) no programa PyRx-Virtual Screening Tool foi realizada a análise do docking.

O Autodock Wizard por sua vez é um programa que combina uma rápida avaliação de energia através de redes pré calculadas de potenciais de afinidade com uma variedade de algoritmos de pesquisa para encontrar conformações e orientações adequadas para um ligante

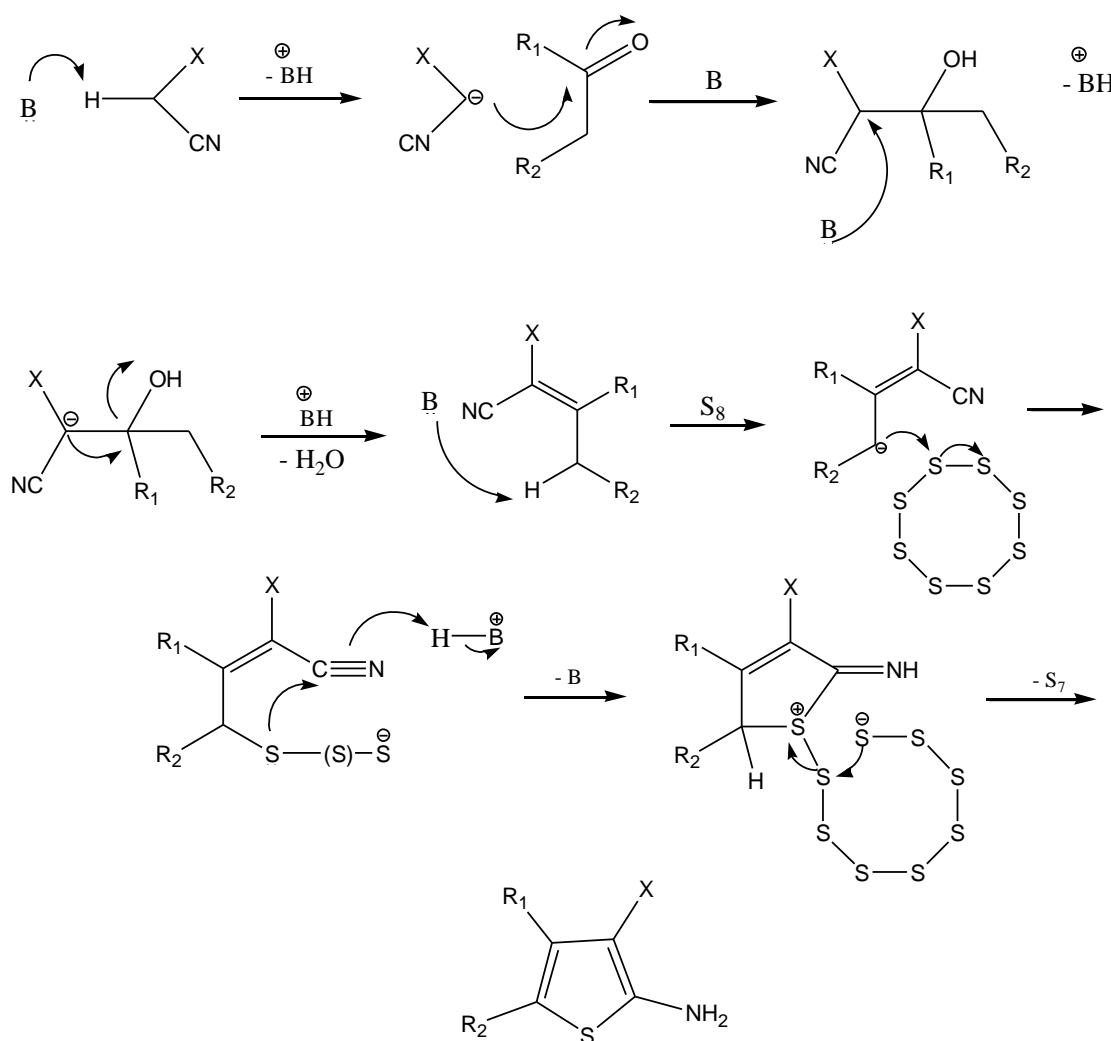


numa certa molécula (TEIXEIRA, 2008). Este programa é um conjunto de ferramentas que permitem predição entre ligante-macromolécula, este possui três opções de algoritmos: SA (Simulated Annealing), (GA - Generic Algorithm) e LGA (Lamarckian Genetic Algorithm), neste trabalho, foi utilizado o algoritmo Lamarckiano, e 10 confômeros de menor energia para cada ligante, com a interpretação sendo realizada no programa Molegro.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Parte Química

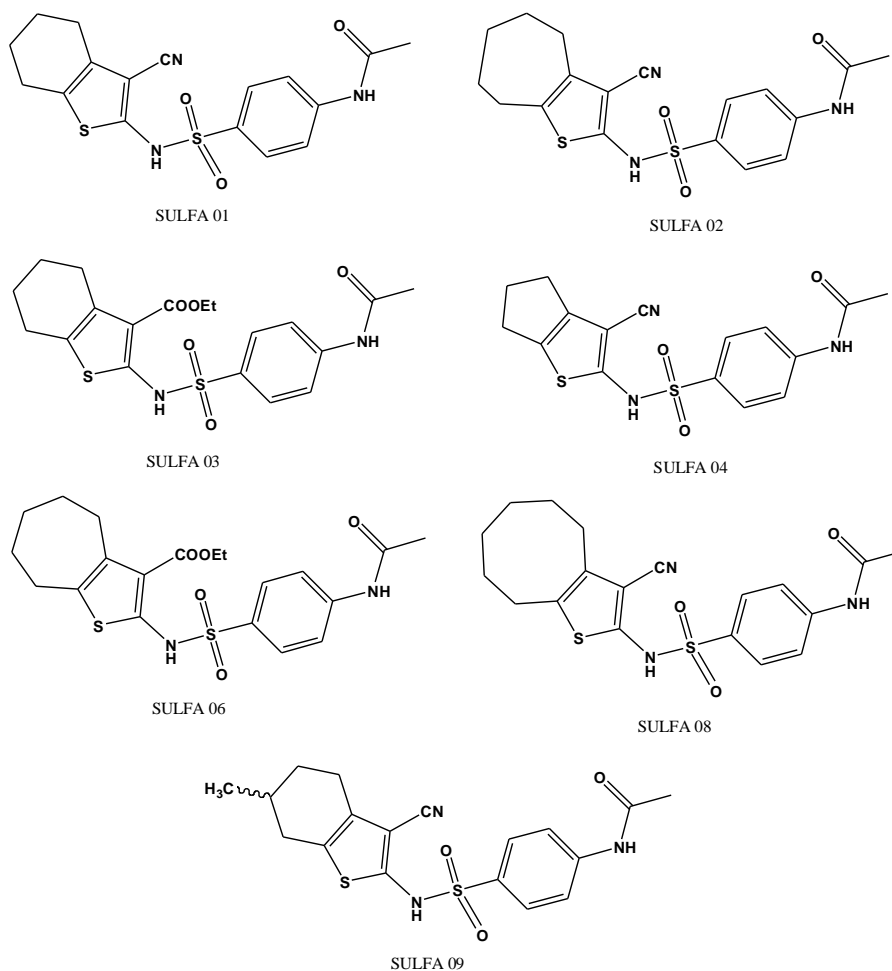
Os compostos utilizados como precursores já se encontram descritos amplamente na literatura, com sua síntese realizada como já descrito na metodologia, através dos procedimentos padrões utilizando meio etanólico e morfolina como base (GEWALD, 1965), o mecanismo reacional acontece conforme o **esquema 5**.



**Esquema 5** - Mecanismo de reação da síntese de 2-aminotiofenos através de Gewald.

A partir da reação de condensação dos adutos de Gewald com cloreto de 4-acetamidobenzeno-sufonila foram obtidos 7 novos derivados híbridos contendo uma porção tiofênica e uma porção sulfonamida, denominados: **Sulfa 01** - *N*-[4-(3-Ciano-

4,5,6,7-tetraidro-benzo[*b*]tiofen-2-ilsulfamoil)-fenil]-acetamida; **Sulfa 02** - *N*-[4-(3-Ciano-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofen-2-ilsulfamoil)-fenil]-acetamida; **Sulfa 03** – 2-(4-Acetilamino-benzenesulfonilamino)-4,5,6,7-tetraidro-benzo[*b*]tiofeno-3-etil éster; **Sulfa 04** - *N*-[4-(3-Ciano-5,6-diidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofen-2-ilsulfamoil)-fenil]-acetamida; **Sulfa 06** - 2-(4-Acetilamino-benzenesulfonilamino)-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-etil éster; **Sulfa 08** - *N*-[4-(3-Ciano-4,5,6,7,8,9-hexaidro-cicloocta[*b*]tiofen-2-ilsulfamoil)-fenil]-acetamida; e **Sulfa 09** - *N*-[4-(3-Ciano-6-metil-4,5,6,7-tetraidro-benzo[*b*]tiofen-2-ilsulfamoil)-fenil]-acetamida (**Figura 12**)



**Figura 12** – Novos compostos sintetizados

Os resultados obtidos com as etapas sintéticas foram satisfatórios, uma vez que os compostos foram obtidos com rendimento de 40 a 99%.As reações tiveram duração mínima de trinta minutos (reações S1, S2, S3, S4, S6 e S9) até 80 minutos (S7).

Após sintetizados e purificados por coluna cromatográfica, as estruturas químicas foram comprovadas através de espectros de RMN<sup>1</sup>H. Foram também determinados suas características físico-químicas dos compostos, presente na **Tabela 3**.

**Tabela 3** – Características físico-químicas e rendimentos dos compostos sintetizados

/	Rend.	Rf	P.F (°C)	M.M	F.M	Aparência
<b>S1</b>	99%	0,52	200-203	375	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	Amarelo claro
<b>S2</b>	72%	0,62	227-231	389	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	Amarelo Escuro
<b>S3</b>	40.5%	0,57	233-236	422	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	Marrom
<b>S4</b>	56%	0,67	235-239	361	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	Cinza
<b>S6</b>	61%	0,56	230-232	436	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	Laranja Claro
<b>S8</b>	40%	0,53	238-240	403	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	Marrom
<b>S9</b>	85%	0,68	237-242	388	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	Laranja Escuro

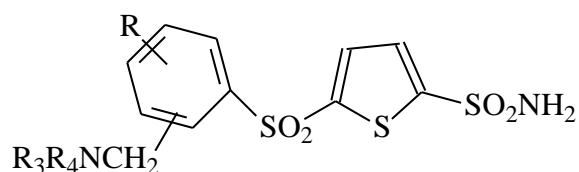
P.F – Ponto de fusão, Rf – Fator de retenção, FM – Fórmula molecular, M.M Massa molecular

Atualmente o banho de ultrassom é amplamente utilizado como uma técnica que apresenta muitas vantagens em reações químicas, incluindo maior rendimento, menor tempo de reação e condições de reação mais suaves quando comparado com métodos convencionais. Principalmente na química verde, é utilizado com objetivo de tornar os processos sintéticos mais sustentáveis (SADJADI *et al.*, 2010; CINTAS *et al.*, 2011)

A irradiação de ultrassom é muito conhecida por acelerar reações químicas (KOUFAKI; FOTOPOULOU; HEREPOULOUS, 2013). A origem dessa energia encontra-se no fenômeno de cavitação que envolve a formação seqüencial, crescimento e colapso de milhões de bolhas de vapor microscópicas no líquido. Estas rápidas implosões geram pressões extremamente altas, cerca de 1,000 atm e temperaturas de 5000°C no interior da cavidade (LI, *et al.*, 2013). Em escala de tempo de nanossegundos. Além de que a energia sonora é transformada em forma útil de energia química

(SINGHA *et al.*, 2013). Estes efeitos podem ser usados para acelerar as reações químicas, reduzir o tempo de reação e aumentar a seletividade e a otimização da relação custo-benefício (RAJUA, *et al.*, 2013)

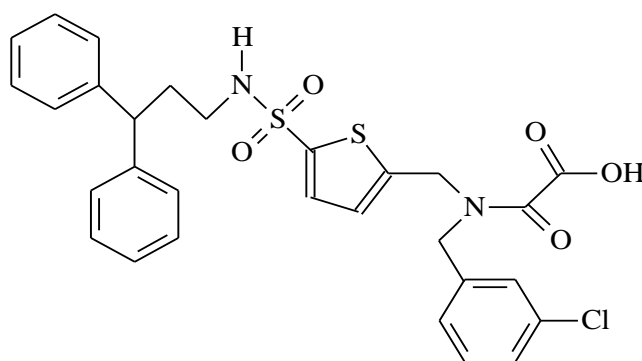
A obtenção de derivados híbridos envolvendo uma porção tiofeno e uma porção sulfonamida, já foi explorada por outros autores. Como Baldwin *et al.* (1989) que desenvolveu novos compostos contendo ambas porções com atividade antiglaucoma (**Figura 13**).



R: H, OH, C 1-3 alquil, ou halogênio. R3: H; C 1-5 alquil. R4 : H, C 1-5 alquil

**Figura 13** – Tiofeno sulfonamida antiglaucoma.

Foi sintetizada também por Grundner (2007) Uma nova molécula (**Figura 14**) tiofeno-sulfonamida inibidora das enzimas tirosina-fosfatases do *Mycobacterium tuberculosis*, apresentando alta especificidade e seletividade para esta proteína.



**Figura 14** – Tiofeno sulfonamida inibidora da tirosina-fosfatase de *M. tuberculosis*.

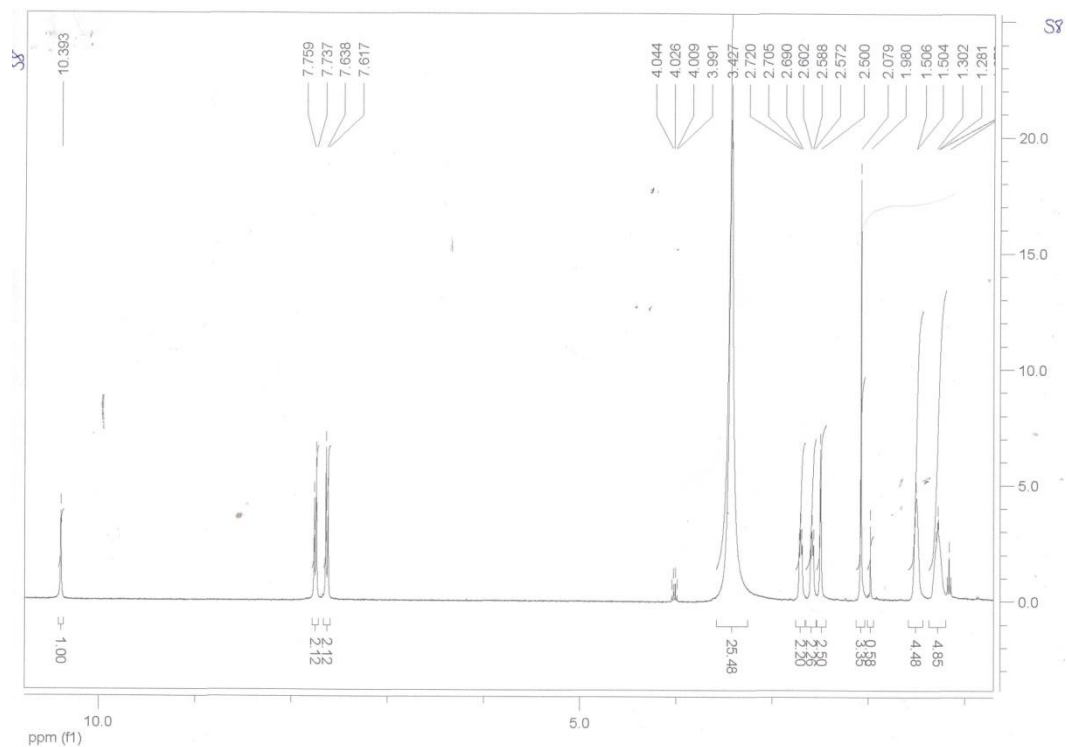
Após a síntese e purificação através de coluna cromatográfica, as estruturas químicas foram comprovadas através dos espectros de RMN<sup>1</sup>H. Os dados referentes à caracterização dos compostos sintetizados encontram-se descritos na **Tabela 4**.

**Tabela 4** – Dados dos espectros de RMN <sup>1</sup>H 400MHz. (δ em ppm)

	H-Aromáticos	COCH <sub>3</sub>	NH	Ciclo-tiofenos	COOEt
<b>SULFA 01<sup>b</sup></b>	7,16 (d, 2H, J=9,2) 7,40 (d, 2H, J=8,8Hz)	2,12 (s, 3H)	3,58 (s, 1H) 10,68 (s, 1H)	1,76 (s, 4H) 2,55 (s, 2H) 2,73 (s, 2H)	-
<b>SULFA 02<sup>a</sup></b>	7,69 (d, 2H, J=8,8Hz) 7,64 (t, 2H, J=8,8Hz)	2,16 (s, 3H)	7,68 (s, 2H)	2,64 (m, 4H) 2,88 (m, 2H) 2,69 (t, 2H, J=5,2Hz) 2,79 (dt, 2H, J=2,8Hz, J=2,4Hz)	-
<b>SULFA 03<sup>a</sup></b>	7,64 (d, 2H, J=8,4Hz) 7,83 (d, 2H, J=8,0Hz)	2,20 (s, 3H)	10,51 (s, 2H)	1,74 (m, 4H) 2,80 (m, 2H) 2,64 (m, 2H)	1,32 (t, 3H, J=7,2) 4,25 (q, 2H, J=7,2Hz)
<b>SULFA 04<sup>b</sup></b>	7,67 (d, 2H, J=8,8Hz) 7,77 (d, 2H, J=8,8Hz)	2,08 (s, 3H)	3,45 (s, 1H) 10,43 (s, 1H)	2,26 (m, 2H) 2,69 (t, 2H, J=6,8Hz) 2,78 (t, 2H, J=6,8Hz)	-
<b>SULFA 08<sup>b</sup></b>	7,62 (d, 2H, J=8,4Hz) 7,74 (d, 2H, J=8,8Hz)	2,07 (s, 3H)	3,42 (s, 1H) 10,39 (s, 1H)	1,27 (m, 4H) 1,50 (s, 4H) 2,58 (t, 2H, J=5,0Hz) 2,70 (t, 2H, J=6,0Hz)	-

<sup>a</sup> - CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup> - DMSO

Na **Figura 15**, representada a cópia do espectro de RMN<sup>1</sup>H do composto **Sulfa 08**, onde podem ser evidenciados com clareza e de maneira inequívoca a estrutura do composto planejado. Os espectros de RMN <sup>1</sup>H referentes aos demais compostos de RMN <sup>1</sup>H encontram-se em anexo.



**Figura 15.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  do composto **Sulfa 08**

## 5.2 Parte Biológica

Foram realizados primeiramente as definições de concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos novos compostos sintetizados através da hibridização do núcleo tiofênico com a sulfonamida, frente à linhagens de *Staphylococcus aureus*.

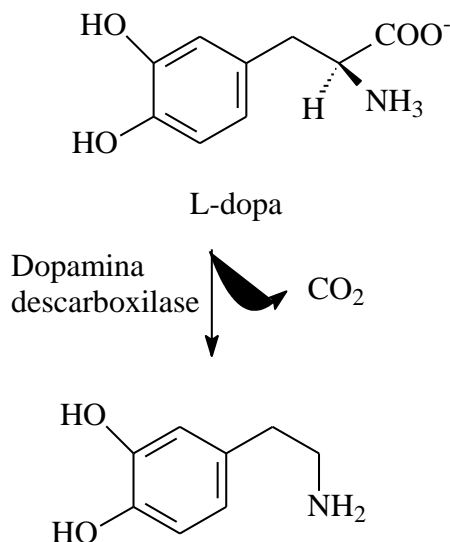
Para as três linhagens de *Staphylococcus aureus* utilizadas (MrsA, TetK e NorA), os valores das CIM para os compostos hibridizados não foram significativos, sendo maior que 256  $\mu\text{g/mL}$ , ou seja, *in vitro* os compostos não foram capazes de promover a inibição do crescimento das cepas analisadas (**Tabela 5**).

**Tabela 5** - Concentração Inibitória Mínima dos compostos derivados do tiofeno hibridizados com sulfonamidas frente às linhagens de *Staphylococcus aureus*.

CIM ( $\mu\text{g/ mL}$ ) /Linhagens Bacterianas				
Compostos Hibridizados		RN-4220 (MrsA)	IS-58 (TerK)	SA-1199B (NorA)
Sulfas	<b>01</b>	>256	>256	>256
	<b>02</b>	>256	>256	>256
	<b>03</b>	256	256	256
	<b>04</b>	>256	>256	>256
	<b>06</b>	>256	>256	>256
	<b>08</b>	>256	>256	>256
	<b>09</b>	>256	>256	>256

Esse resultado já era em parte esperado, visto que os compostos avaliados encontram-se acetilados em sua porção amina terminal, sendo assim, sulfonamidas sob a forma de pró-drogas. Portanto, para que sejam ativas precisam sofrer uma etapa preliminar de desproteção que apenas acontece *in vivo*. Este processo conhecido como latenciação é de grande importância para várias drogas, pois aumentam a seletividade do fármaco pelo seu sítio de ação, diminuindo a toxicidade (CHIN & FERREIRA, 1999). Um exemplo dessa importância é o levodopa, pró-fármaco da dopamina, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, e no cérebro, ser enzimaticamente convertido em dopamina, que atua na doença de Parkinson e outras afins (**Figura 16**) (CHIN & FERREIRA, 1999). Portanto, para que apresente atividade as sulfas precisam sofrer uma etapa preliminar que acontece apenas *in vivo*.





**Figura 16** – L-dopa (pró-fármaco) e processo de latenciação em dopamina.

Em seguida, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas dos antibióticos (eritromicina, tetraciclina e norfloxacina) usando-se concentrações crescentes e dobradas ( $4\mu\text{g/mL}$  até  $256\mu\text{g/mL}$ ) na ausência, bem como, na presença dos compostos heterocíclicos ( $\leq \frac{1}{4}$  da CIM) (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Atividade Moduladora dos compostos hibridizados  
CIM ( $\mu\text{g/ mL}$ ) /Linhagens Bacterianas

Compostos		RN-4220 (MrsA)	IS-58 (TerK)	SA-1199B (NorA)
Antibióticos*		>256	64	128
Sulfas	<b>01</b>	>256	64	8(16x)
	<b>02</b>	>256	64	32(4x)
	<b>03</b>	256	64	64(2x)
	<b>04</b>	>256	64	32(4x)
	<b>06</b>	>256	64	64(2x)
	<b>08</b>	>256	64	128
	<b>09</b>	>256	64	64(2x)

É importante mencionar que o uso de uma concentração tão baixa quanto  $\frac{1}{4}$  da CIM é recomendado para evitar possíveis resultados falso-positivos (STAVRI *et al.*, 2007).

Como podem ser observados na **Tabela 6**, os resultados mais satisfatórios foram encontrados com os compostos que possuem o radical 3-nitrila (Sulfas **01,02** e **04**) onde foram observadas uma modulação com redução da CIM da norfloxacin até o máximo de 16x, indicando uma possível inibição da bomba de efluxo.

O composto com anel ciclohexano tornou a cepa SA-1199B (NorA) mais sensível (16x) à Sulfa **01**, enquanto que outros compostos, ciclohexano e cicloheptano, como Sulfa **04**(4x) e Sulfa **02**(4x), respectivamente apresentam menor atividade moduladora. Já o composto com anel ciclooctano, Sulfa **08**, não apresentou nenhuma atividade.

As sulfas **03** e **06** (compostos ciclohexano e cicloheptano com grupo éster na posição 3), apresentaram igual atividade moduladora de 2x. Pôde-se observar também que a Sulfa **09** mesmo apresentando o anel de seis membros, a presença do radical metil na posição C-6 não contribui positivamente para a atividade modulatória, reduzindo a atividade de 16x para o derivado ciclohexila não substituído (sulfa **01**) para 2x quanto a Sulfa **09**.

Em relação às linhagens que codificam as proteínas de efluxo específicas, RN-4220 (MsrA) e IS-58 (TetK), os compostos não modularam atividade para eritromicina nem para tetraciclina.

De forma a se obter informações mais detalhadas e tentar justificar que de fato a porção tiofênica apresenta ação moduladora da atividade antibacteriana foram realizados ensaios de atividade antimicrobiana para as porções separadas dos compostos, sendo estes o 5CN, 6CN e 7CN e o cloreto de 4- acetamidobenzeno-sulfonila, observamos que o MIC dos compostos de partida (derivados tiofênicos 5CN, 6CN e 7CN) foram de 128  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto o resultado da sulfonamida foi maior que 256  $\mu\text{g/mL}$ , não apresentando atividade inibitória (**Tabela 7**).

**Tabela 7** – Atividade antimicrobiana das moléculas antes da hibridização.

COMPOSTOS	MIC $\mu\text{g/mL}$
5CN	128 $\mu\text{g/mL}$
6CN	128 $\mu\text{g/mL}$
7CN	128 $\mu\text{g/mL}$
SULFA	>256 $\mu\text{g/mL}$

Com a linhagem AS-1199B foi realizado o teste de atividade moduladora com norfloxacinina e brometo de etídeo, onde foi verificado que o 5CN modulou em 2x para norfloxacinina, e o 7CN modulou em 2x para norfloxacinina e 2x para o brometo de etídeo (**Tabela 8**).

**Tabela 8** - Atividade moduladora com norfloxacinina e brometo de etídeo na linhagem SA-1199B (NorA)

<b>COMPOSTOS</b>	<b>MIC (<math>\mu\text{g/mL}</math> e mM) NORFLOXACINA</b>	<b>MIC (<math>\mu\text{g/mL}</math> e mM) BROMETO DE ETÍDEO</b>
Norfloxacinina	128 $\mu\text{g/mL}$ e mM	*
Brometo de etídeo	*	32 $\mu\text{g/mL}$
5CN	<b>64 <math>\mu\text{g/mL}</math> (2x)</b>	32 $\mu\text{g/mL}$
6CN	128 $\mu\text{g/mL}$	32 $\mu\text{g/mL}$
7CN	<b>64 <math>\mu\text{g/mL}</math>(2x)</b>	<b>16<math>\mu\text{g/mL}</math>(2x)</b>
SULFA	128 $\mu\text{g/mL}$	32 $\mu\text{g/mL}$

Esses resultados demonstram que de fato a porção tiofênica apresenta atividade moduladora da ação antibiótica, porém de baixa intensidade. As moléculas híbridas com atividade mais pronunciada, demonstram que as duas porções quando unidas de fato apresentam ação sinérgica.

### 5.3 Estudos de Docking

O desenvolvimento na utilização de utilizando programas de modelagem molecular e suas aplicações na pesquisa constituem campo de estudo denominado planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD – Computer Aided Drug Design ), que tem como

expectativa a descoberta de moléculas promissoras, mais potentes e seletivas, considerando propriedades tridimensionais específicas (SILVA, 2012).

O CADD pode ser aplicado a qualquer molécula ativa cuja interação com um alvo específico seja postulado (receptor, enzima, proteínas), como é o caso das sulfonamidas, que inibem a proteína diidropteroato-sintase. Sabe-se que no processo de discriminação das moléculas de um fármaco no organismo, a biomacromolécula alvo reconhece a micromolécula por meio de suas propriedades físico-químicas (eletrônica, estereoquímica, e lipofílica) que influenciam na interação com a molécula (SILVA, 2012).

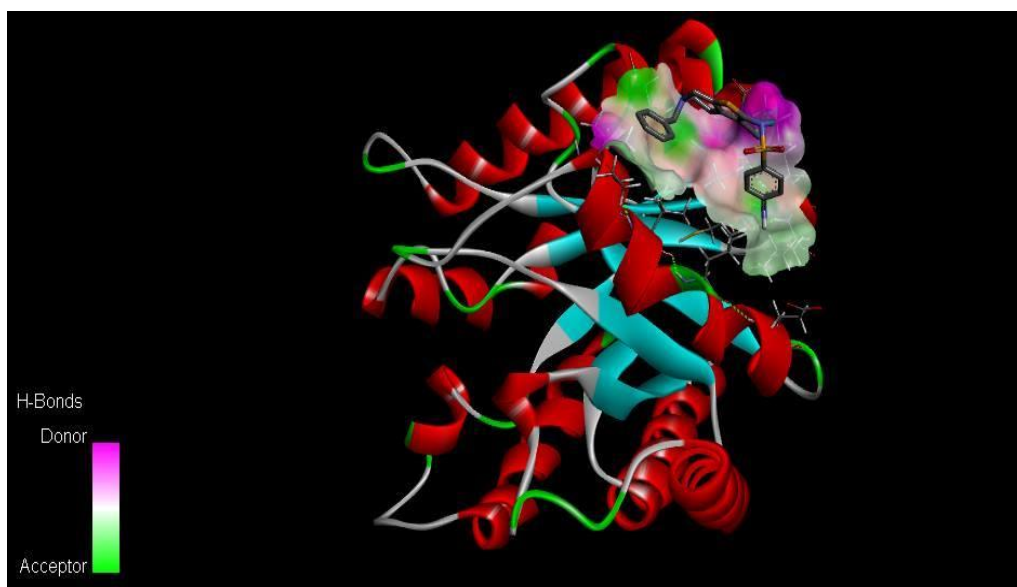
Essa interação é medida através da Energia de Interação, onde quanto mais baixa, maior a probabilidade e com mais força as moléculas irão se ligar, ou seja, maior a probabilidade da molécula apresentar ação farmacológica.

As sulfas sintetizadas, desenhadas sob a forma desacetilada apresentaram energia de interação menor do que muitas drogas que já são encontradas comercialmente, em especial a Sulfa 2 (S2) com energia de ligação com  $-3,66$  e a Sulfa 7 com  $-3,74$  kcal/mol (**Tabela 9**). Sant'Anna (2009) destaca que o estabelecimento de interações intermoleculares é fundamental para que a molécula bioativa tenha seu efeito biológico ou farmacológico. Estas interações podem ser o principal determinante da ação da molécula bioativa.

**Tabela 9** - Em destaque as moléculas com melhores resultados e os medicamentos já encontrados comercialmente.

Ligante	Energia na interação com o alvo diidropteroato sintase (kcal/mol)
S1	-3,11
<b>S2</b>	<b>-3,66</b>
S3	-3,60
S4	-3,24
S6	-3,43
<b>S7</b>	<b>-3,74</b>
S8	-3,43
S9	1,53
S10	-1,02
PABA	-3,05
<b>Sulfadiazina</b>	<b>-3,22</b>
<b>Sulfametoxina</b>	<b>-3,44</b>
<b>Sulfamerazina</b>	<b>-3,22</b>
<b>Sulfametoxazol</b>	<b>-3,62</b>
<b>Sulfametoxipiridazina</b>	<b>-3,45</b>

Na figura (**Figura 17**) Abaixo podemos observar o desenho em 3D do encaixe do composto sintetizado (S2) com a enzima Dihidropteroato sintase com suas interações de hidrogênio, em rosa os grupamentos doadores, e em verde os grupos receptores.



**Figura 17** – Modelo tridimensional da estrutura terciária da enzima DHPS e interação com seu potencial inibidor.

## 6. Conclusões

O emprego do ultrassom na etapa de síntese foi de grande valor, pois se mostrou um método rápido e eficiente, tendo as reações duração máxima de 80 minutos, mostrando também sua eficácia com os rendimentos, que alcançaram o máximo de 99% (S1).

Os compostos foram obtidos sob forma de cristais em elevado grau de pureza, comprovado pelas estreitas faixas de fusão (3°C a 5°C) e pela clareza dos espectros de RMN <sup>1</sup>H, que foram aptos a confirmar as estruturas inicialmente propostas.

Os compostos sintetizados não apresentaram atividade antibacteriana relevante *in vitro*, porém são possuidores de relevante atividade moduladora agindo como potenciais inibidores do sistema de efluxo em *S. aureus*, em especial a Sulfa **01** que reduziu em 16 vezes a quantidade necessária do antibiótico para inibir o crescimento bacteriano (linhagem SA-1199B (NorA), indicando que nossos produtos podem aumentar a atividade antibacteriana ou mesmo reverter à resistência bacteriana, agindo como modificador da atividade antibiótica em linhagens de *Staphylococcus aureus* portadoras de bombas de efluxo.

Foi comprovado durante os testes que as sulfonamidas não possuem atividade inibidora de bomba de efluxo, sendo a porção tiofênica responsável por tal ação. Esse resultado sugere que os novos compostos quando utilizados *in vivo* poderão agir por dois mecanismos de ação distintos de forma sinérgica, caracterizando o sucesso da hibridização.

Estudos de docking feitos na enzima dihidropteroato sintase utilizando os derivados híbridos sob sua forma desacetilada (amina livre) demonstram boa ligação dos ligantes com o receptor (baixos valores de Energia), demonstrando grande potencial de ligação com o alvo desejado.

Devido aos emergentes problemas relacionados à resistência bacteriana e a constante busca por novos antimicrobianos, nossos resultados obtidos demonstram que derivados híbridos como as Sulfas **01**, **02** e **04** são possíveis candidatos a protótipos de antibióticos, com grande potencial de agir por um mecanismo de ação sinérgico.

Testes complementares de atividade *in vivo*, assim como novos ensaios *in vitro*, utilizando os compostos na forma desprotegida (amina desacetilada) devem ser conduzidos para comprovação dessas hipóteses e avaliação mais aprofundada do potencial antimicrobiano desses derivados híbridos.

## Referências

- ALLINGER, NORMAN I. *et al.* **Química Orgânica**. 2º ed. New York, Worth Publishes, inc. 1976.
- ALOMAR, KUSAÏ *et al.* Synthesis, crystal structure, characterisation, and antifungal activity of 3-thiophene aldehyde semicarbazone (3STCH), 2,3-thiophene dicarboxaldehyde bis(semicarbazone) (2,3BSTCH<sub>2</sub>) and their nickel (II) complexes. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, França, ., n. 115, p.36-43, 2012.
- AL-SAIDA, MANSOUR S. *et al.* Anti-breast cancer activity of some novel 1,2-dihydropyridine, thiophene and thiazole derivatives. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, Arábia Saudita, 2011, n. 46, p.137-141
- ALSUGHAYER, A. ABDEL-ZAHER A. ELASSAR, S. M. , FAKHREIA Al S. F. A. Synthesis, Structure Analysis and Antibacterial Activity of New Potent Sulfonamide Derivatives. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**. 2010. 2, 144-149.
- AMR, ABD EL-GALIL E. *et al.* **Antiarrhythmic, serotonin antagonist and antianxiety activities of novel substituted thiophene derivatives synthesized from 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro- N-phenylbenzo[b]thiophene-3-carboxamide**. European Journal Of Medicinal Chemistry, Egito, 2010. n. 45, p.5935-5942
- ARAÚJO, JOCLEY QUEIROZ. **Estudos de Docking e QSAR-3D dependente do receptor de inibidores da Acetilcolinesterase / Tese: Doutorado em Ciências (Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, 2010.**
- BARBOSA, TICIANO PEREIRA. **Síntese de novos adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman: hibridação molecular como ferramenta para obtenção de drogas leishmanicidas / Ticiano Pereira Barbosa.-Tese doutorado- João Pessoa, 2010.**
- BARREIRO, ELIEZER J. & FRAGA, CARLOS ALBERTO MANSOUR. **A Questão da inovação em fármacos no Brasil: Proposta de criação do programa nacional de fármacos (PRONFAR)**. Quim. Nova, Vol. 28, Suplemento, S56-S63, 2005
- BARRIENTOS, FERRUFINO F.; BARRIENTOS R.; PUJADO L. **Farmacocímica, laQuímica Medicinal**. Faculdade de Ciências Químicas e Farmaceuticas, Universidade do Chile, Santhiago, Chile, 2009.
- CALLIGARO, D.O.; FAIRHURST, J.; HOTTEN, T.M.; MOORE, N.A.; TUPPER, D.E. **The synthesis and biological activity os some known and putative metabolites of the atypical antipsychotic agent olanzapine (ly170053)** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, USA, n.20, p3863-3867, 2010.
- CARIDHA, DIANA *et al.* Activity of substituted thiophene sulfonamides against malarial and mammalian cyclin dependent protein kinases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, USA, n. 20, p.3863-3867, 2010.
- CASTANEDO, GEORGETTE, M; SUTHERLIN, DANIEL, P. Synthesis of tetrasubstituted thiophenes on solid-support using the Gewald reaction. **Tetrahedron Letters**, 42, 7181–7184, 2001.

CHAKRABARTI, J.K.; HOTTEN, T.M; TUPPER, D.E. **2-methyl-thieno-benzodiazepine. US Patent** nº 5,229,382; 20 de Julho de 1993.

CHIN, CHUNG MAN & FERREIRA, ELIZABETH IGNE. **O processo de latenciação no planejamento de fármacos.** Quím. Nova [online]. vol.22, n.1, pp. 75-84. 1999.

CINTAS, PEDRO *et al.* Power ultrasound in metal-assisted synthesis: From classical Barbier-like reactions to click chemistry. **Ultrasonics SonoChemistry**, Itália. V.18, 2011 , p.836-841

CORRÊA, C. M.; **Latenciação do Sulfatiazol**, Medicinal Chermistry, 2006.

GEWALD, K. 2-Amiono-thiophene aus  $\alpha$ -oxo-mercaptanen und methylenaktiven nitrilen. **Chem. Ber.** v. 98, p. 3571-7, 1965.

GEWALD, K. **Zur Reaktion von  $\alpha$ -Oxo-mercaptanen mit Nitrilen.** Angewandte Chemie, v. 73, n. 3, p. 114, 1961.

GEWALD, K; CHINKE, E.; BOTTCHEER, H. 2 amino-tiophene aus methylenaktiven nitrilen, Carbonylverbindunger und schwefel. **Chem. Ber.** v. 99, p 94-100, 1996.

GIBBONS, S., UDO, E.E. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistance Staphylococcus aureus(MRSA) possessing the tet(K) determinant. **Phytotherapy Research** v.14, p. 139-140, 2000.

GRUNDNER, C.; PERRIN, D; Van HUIJSDUIJNEN, R. H.; SWINNEN, D.; GONZALEZ, J.; GEE, C. L.; WELLS, T. N.; ALBER, T. **Structural basis for selective inhibition of Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase PtpB.** Structure, 499-509, 2007.

GUIDO, RAFAEL V. C.; ANDRICOPULO, ADRIANO D. & OLIVA, GLAUCIUS. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estud. av.** [online] vol. 24, n.70, pp. 81-98, 2010.

GUIMARÃES, GEOVANI PEREIRA. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsão antifúngica contendo derivado tiofênico.** Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas – Universidade Estadual da Paraíba, pró-reitoria de pós graduação e pesquisa, 2013.

ISLOOR, ARUN M. *et al.* Synthesis, characterization and biological activities of some new benzo[b]thiophene derivatives. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, Índia, n. 45, p.825-830, 2010.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in Staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2650-2655. 1995.

KOUFAKI, MARIA; FOTOPOULOU, THEANO; HEROPOULOS, GEORGIOS A. Sinergistic effect of dual-frequency ultrasound irradiation in the on-pot synthesis of 3,5-disubstitutes isoxazoles. **Ultrasonic Sonochemistry**, Grécia. v.21, p.35-39, 2013.



KULANDASAMYA, RAVI; ADHIKARI, AIRODY VASUDEVA; STABLES, JAMES P.. A new class of anticonvulsants possessing 6 Hz activity: 3,4-Dialkyloxy thiophene bishydrazones. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, Estados Unidos, n. 44, p.4376-4384, 2009.

LI, DA-JING *et al.* Optimization Of The Ultrasound-Assistes Synthesis Of Lutein Dicusccinate Usin Uniform Design. **Ultrasonics Sonochemistry**, china, v.21 p.98-103, 2013.

MADIGAN, MICHAEL T; MARTINKO, JOHN M.; CLARCK, DAVID P. **Microbiologia de Brock**. 12 ed, Ed Artmed SA, 2010.

MAGALHÃES, UIARAN DE OLIVEIRA. **Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Físico-Químicos, Farmacocinéticos e Toxicológicos In Silico de Derivados Heterocíclicos com Atividade Leishmanicida** – Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 2009.

MEDEIROS, E. A. S. **Investigação E Controle De Epidemias (Surtos) Hospitalares São Paulo** – SP --- 2004 - versão 1.0 Curso Infecção relacionada à Assistência à Saúde - IrAS - versão 1.0 – 2004.

MENEGATTI, RICARDO; FRAGA CARLOS A. M.; BARREIRO, ELIEZER J.;Fármacos Sintéticos, Aspectos Históricos da Síntese de Fármacos. **Química Nova Escola**, Nº3 ano 2001.

MEOTTI, FLAVIA C. *et al.* Thiophenes and furans derivatives: a new class of potential pharmacological agents. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, Brasil, p.37-44, 2003.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. **Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais**. MOLEGRO, disponível em <<http://www.clcbio.com/products/molegro/#molecular-viewer>> acesso em 14 de agosto de 2013. **Química Nova**. v.24, n.1, 105-111, 2001.

NEYFAKH, A. A., BORSCH, C. M., KAATZ, G. W. **Fluoroquinolone resistance protein NorA of Staphylococcus aureus is a multidrug efflux transporter**. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 37, p. 128-129. 1993.

OLIVEIRA A.C., SILVA R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem** [Internet], 2008. Acesso em: <<http://www.fen.ufg.br/revista/v10/n1/v10n1a17.htm>> Em 20 jun 2014.

PEDRETTI, A.; VILLA, L.; VISTOLI, G. VEGA - an open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming,. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, 18: 167–173, 2004.

RAJUA, B. RAMA *et al.* Ultrasound promotes synthesis of Nile Blue derivates. **Ultrasonics Sonochemistry**, Portugal, n.21, p 360-366, 2013.

ROITT, IVAN *et al.* **Imunologia**. 5º ed. São Paulo: Editora Manole LTDA, 1999.

ROSS, J.I., FARRELLI, A.M., EADY, E.A., COVE, J.H, CUNLIFFE, W.J. Characterization and molecular cloning of the novel macrolide-streptogramin B resistance determinant from *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 24, p. 851-862. 1989.

SADJADI, SODEH *et al.* Ultrasound-promotes greener synthesis of benzoheterocycle derivatives catalyzed by nanocrystalline copper (II) oxide. **Ultrasonics Sonochemistry**, Irã, v.17, p.764-767, 2010.

SANT'ANNA, CARLOS M. R; Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Rev. Virtual Quim.** v1, n.1, 49-57, 2009.

SANTOS, JEAN LEANDRO DOS. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de compostos híbridos potencialmente ativos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme** / Jean Leandro dos Santos. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista.– Araraquara, 2007.

SHOICHET, BRIAN K.; MACGOVERN, SUSAN L.; WEI, BINQING; IRWIN, JOHN J. Lead discovery using molecular docking. **Current Opinion in Chemical Biology**, 6:439–446, 2002

SILVA, ANTONIO T. de ALBUQUERQUE. **Desenvolvimento de compostos potencialmente ativos contra *Helicobacter pylori***. 115 f. Araraquara, 2008.

SILVA, BÁRBARA ATHAYDE V. G. **Aplicação De Metodologias Do CADD A Um Conjunto De Pirrolidina Carboxamidas: Mapeamento Do Farmacóforo E Planejamento De Novos Protótipos Tuberculostáticos Potenciais**. – Dissertação - São Paulo, 2012.

SINGHA, BALVANT S. *et al.* Comparative material study and synthesis of 4-(4-nitrophenyl)oxazol-2-amine via sonochemical and thermal method. **Ultrasonics Sonochemistry**, India, v.20, p. 633-639, 2013.

SIQUEIRA, G.M.; NEUENFELDT, P.D.; DUARTE, A.; BRETANHA, L.C.; FREITAS, R.A.; CUNICO, W. Aplicação de  $\alpha$ -OxocetenoDitioacetais em Síntese Orgânica. **Química Nova**, v.33, n.3, 707-715, 2010.

STAVRI, M., PIDDOCK L.J.V., GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p.1247-1260, 2007.

TEIXEIRA, C.; BARBAULT, F.; REBEHMED, J.; LIU, K.; XIE, L.; LU, H.; JIANG, S.; FAN, B.; MAUREL, F. Molecular modeling studies of N-substituted pyrrole derivatives--Potential HIV-1 gp41 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 3039-3048, 2008.

THOMAS, GARETH. **Química Medicinal, uma introdução**. Traduzido por Franklin David Rumjanek. Guanabara Koogan, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUMM, F.; GOMPERTZ, O. F.; **Candeias, J. N.,** **Microbiologia**, 3ª edição, Atheneu, São Paulo, 2000.

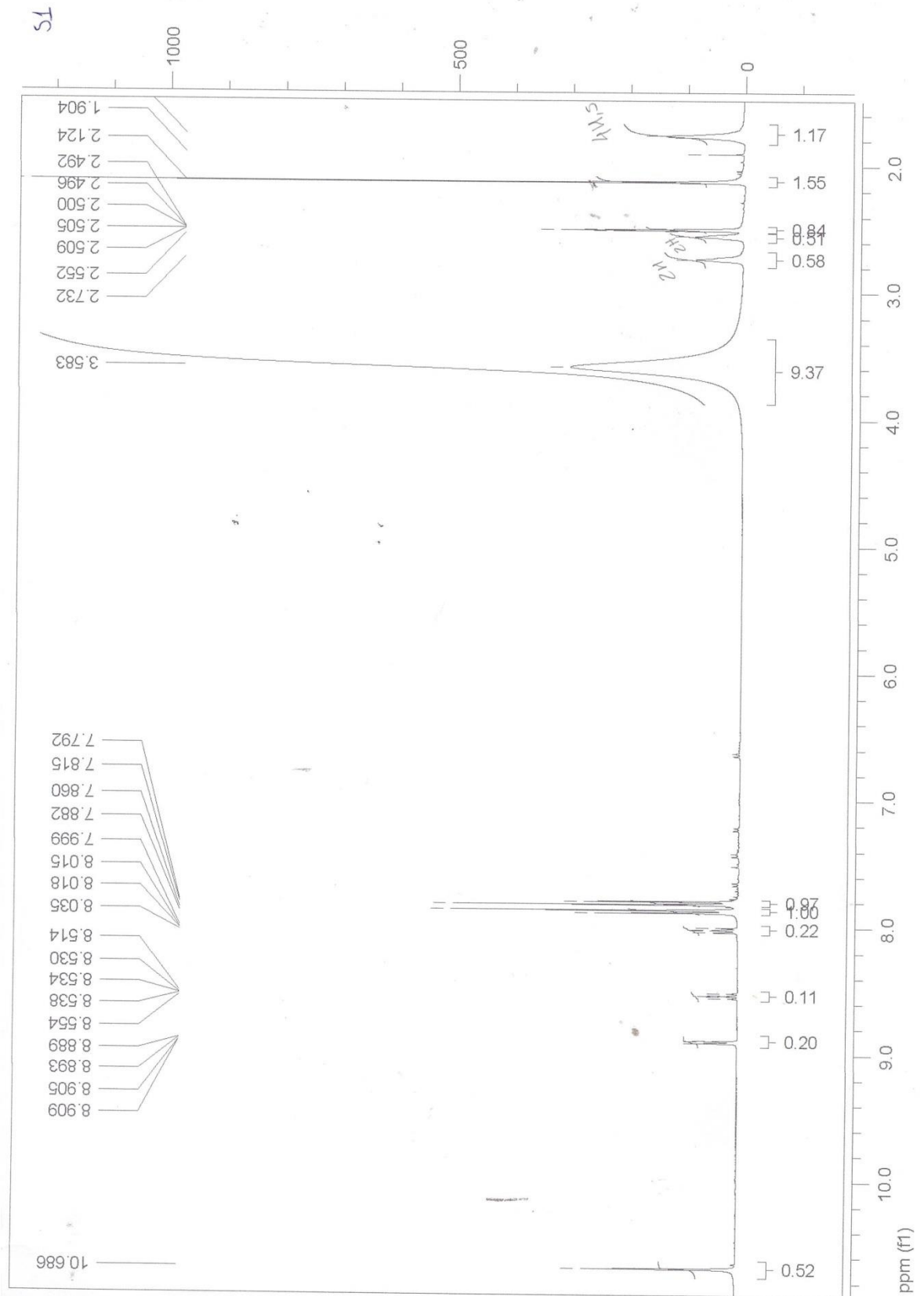
VOET, DONALD; JUDITH, G. VOET; CHARLOTE W. PRATT. **Fundamentos de Bioquímica: A vida em nível molecular.** Artmed Editora, 2.ed. 2006.

WALTER, HELENA M.; **Planejamento Racional de Imidas Cíclicas e Sulfonamidas Com atividade Antinociceptiva.** [dissertação] Florianópolis, 2004.

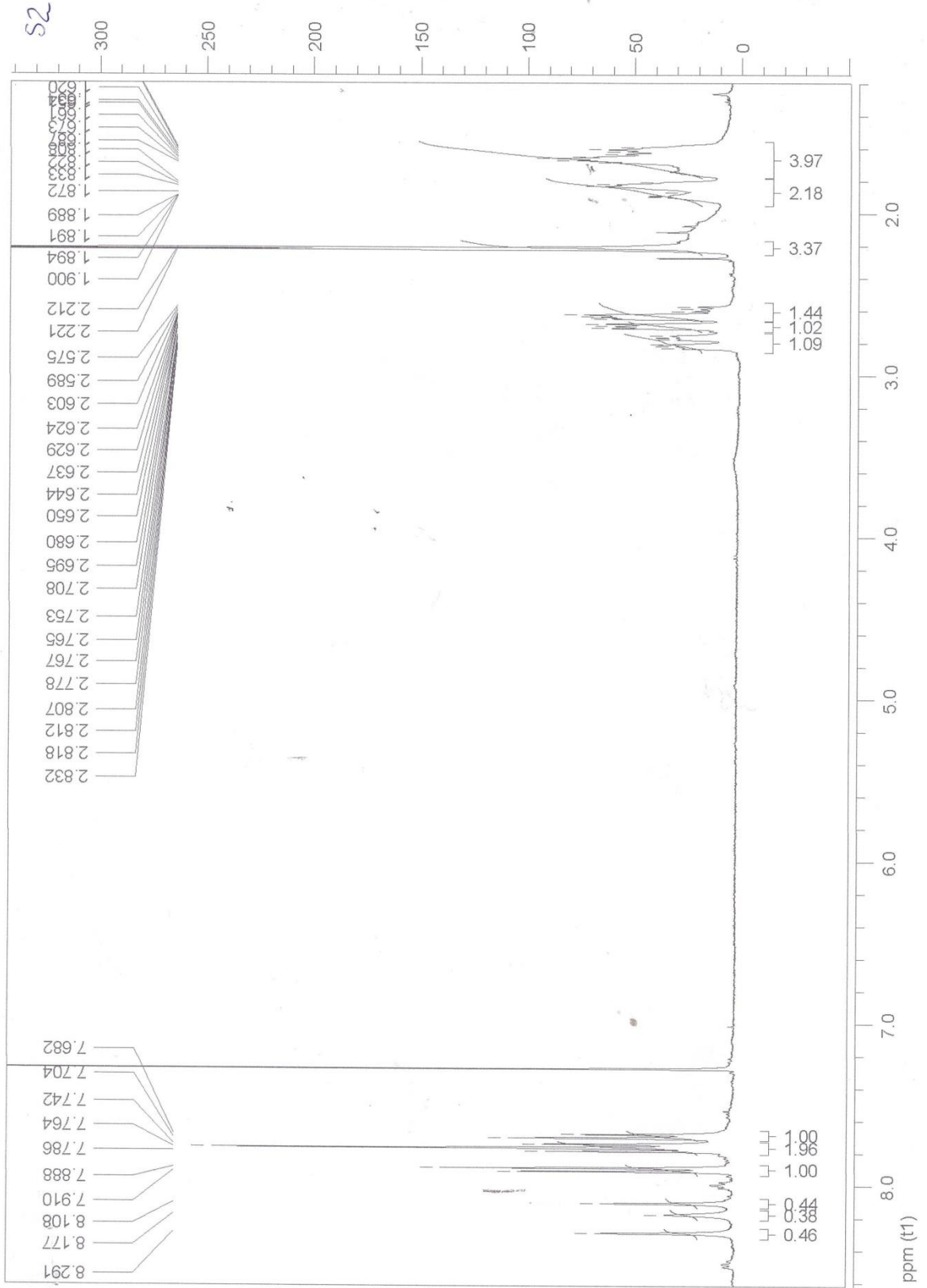
WESTON, A. *et al.* Biosynthetic Origin of Mycobacterial Cell Wall Galactofuranosil Residues. **Tubercle and Lung Diseases**, v.78 , p. 123-131, 1998.

WOLF, L.K. New software and Websites for the Chemical Enterprise, **Chem. Eng. News**, 31-87, 2009

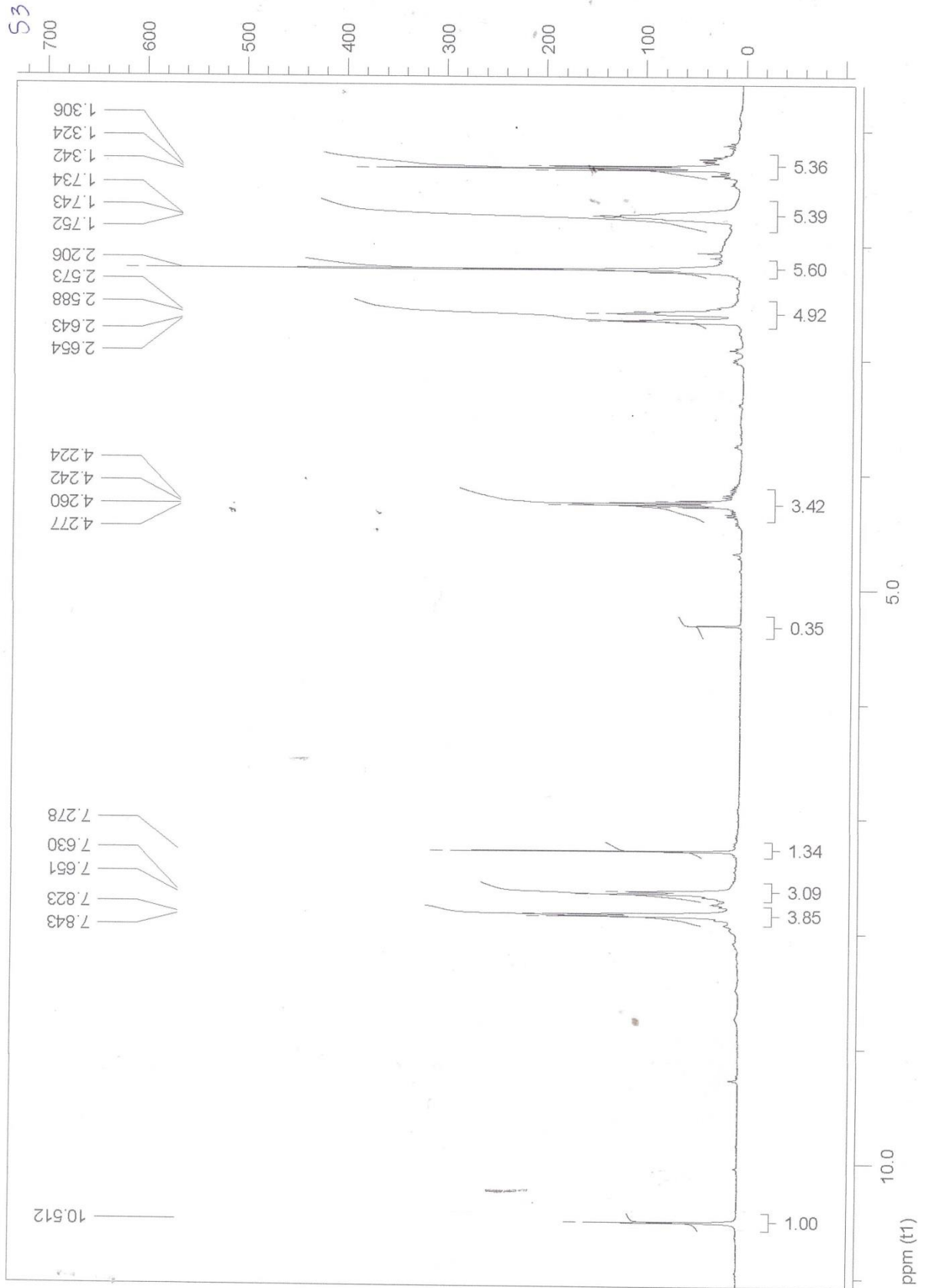
ZHONGHAI, W. **Experimental and theoretical studies on organic attachment to silicon surfaces.** Tese (Doutorado em Filosofia) - Departamento de Química, Universidade Nacional de Singapura. 203 p. 2005.

ANEXO 1 - RMN <sup>1</sup>H DO COMPOSTO SULFA 01

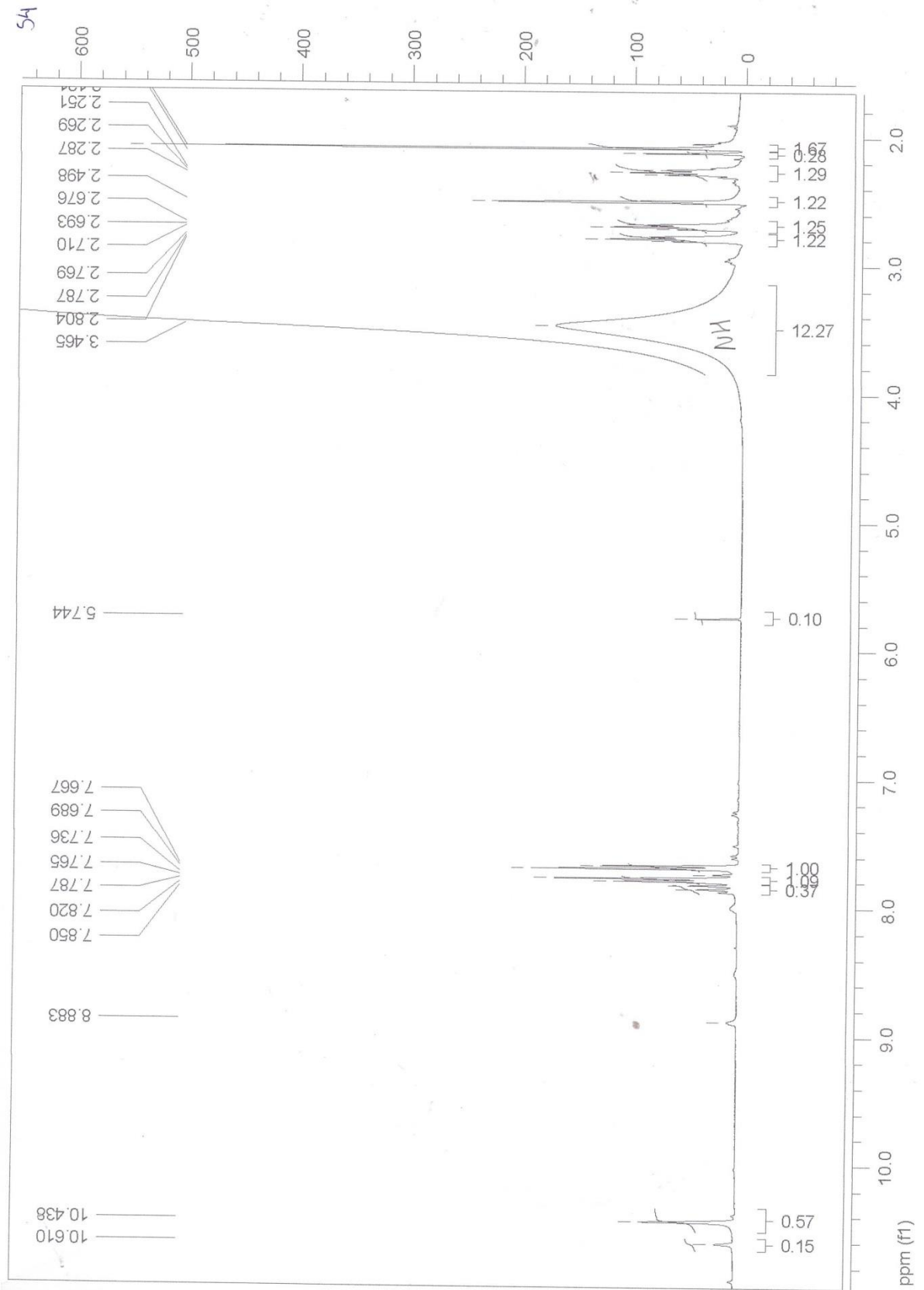
ANEXO 2 - RMN <sup>1</sup>H DO COMPOSTO SULFA 02



ANEXO 3 - RMN <sup>1</sup>H DO COMPOSTO SULFA 03



ANEXO 04 – RMN <sup>1</sup>H DO COMPOSTO SULFA 04



ANEXO 05 – RMN <sup>1</sup>H DO COMPOSTO SULFA 08

