



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

EDVANIA EMANNUELLE PINHEIRO SANTOS

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE DERIVADOS
DE 2-CIANOACETAMIDA

Campina Grande - PB

2017

EDVANIA EMANNUELLE PINHEIRO SANTOS

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE DERIVADOS
DE 2-CIANOACETAMIDA

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

Área de concentração: Química Medicinal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura

Campina Grande – PB

2017

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.

S237s Santos, Edvania Emanuelle Pinheiro.
Síntese e avaliação da atividade antibacteriana de derivados de
2-cianoacetamida [manuscrito] / Edvania Emanuelle Pinheiro
Santos. - 2017.
57 p.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) -
Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e
da Saúde, 2017.
"Orientação: Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura,
Departamento de Farmácia".

1. Resistência bacteriana. 2. Atividade antimicrobiana. 3.
Fármacos. 4. Bactérias patogênicas. I. Título.

21. ed. CDD 615.1

EDVANIA EMANNUELLE PINHEIRO SANTOS

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE DERIVADOS
DE 2-CIANOACETAMIDA

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

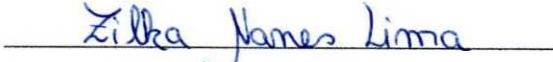
Área de concentração: Química Medicinal

Aprovado em: 29/03/2017

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura (Orientador)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Me. Zilka Nanes Lima

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Rodrigo Santos Aquino de Araújo

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

DEDICATÓRIA

Mãe, pai, irmãos, tios e amigos, sem vocês nada disso seria possível. Obrigada a todos pelo apoio, compreensão e pela confiança depositada em mim. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que iluminou meu caminho durante toda esta longa caminhada, agradeço;

Ao professor Ricardo Olimpio de Moura, pela orientação, pela disponibilidade, partilha de conhecimento, ensinamentos e por prestar toda a orientação e esclarecimentos necessários para o meu desempenho durante o trabalho, agradeço;

A professora Zilka Nanes Silva, pela sua disponibilidade e acompanhamento exercido durante toda a etapa de análise microbiológica, agradeço;

As técnicas do laboratório de microbiologia, Wilma Raianny Vieira da Rocha e Silvana de Brito Camelo, pela disponibilidade e colaboração durante a execução da etapa de análise microbiológica, agradeço;

A todos os estudantes da graduação, que contribuíram direta ou indiretamente para a execução do trabalho, agradeço;

Aos meus pais, Edvan da Silva Santos e Maria do Socorro Pinheiro Santos, a meus amados irmãos, Severino José dos Santos Neto e Jullianne Aluska Pinheiro Santos, que suportaram e apoiaram-me durante todo o curso, agradeço;

Aos meus queridos avós maternos, Antônio Eloísio Pinheiro Lima e Maria das dores Limeira Pinheiro, e avó paterna, Rosa Maria da Silva Santos, que pouco conhecem das ciências, mas continuam sendo doutores na academia da vida e incentivaram na realização deste sonho, agradeço;

Ao meu namorado, familiares, tios, tias e primos, agradeço;

A todos os amigos, por me passarem segurança e pelo incentivo de sempre, agradeço;

A todos aqueles que infelizmente esqueci, peço perdão e agradeço.

“O sucesso é uma consequência e não um objetivo.”
Gustave Flaubert

RESUMO

A resistência aos antibióticos representa um grande problema de saúde pública desde a implantação da antibioticoterapia. Apesar da grande diversidade de estruturas químicas e diferentes mecanismos de ação dos antibacterianos, o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes tem sido cada vez mais difícil. Não há, atualmente, um único antibacteriano em uso clínico, contra o qual não exista, pelo menos, uma cepa a ele resistente. Diante disso, há uma contínua busca para o desenvolvimento de estruturas biologicamente mais ativas e, como parte desta busca, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de novos derivados da 2-cianoacetamida (acrilamidas substituídas), através da síntese, caracterização estrutural e avaliação de suas atividades antibacterianas *in vitro*, visando obter novos agentes antibacterianos mais eficazes, seguros e potentes. A obtenção destes novos derivados deu-se por meio de reação de condensação do tipo Knoevenagel entre diferentes aldeídos aromáticos substituídos e a 2-cianoacetamida. A avaliação preliminar da atividade antibacteriana foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M7-A10 (CLSI, 2016). As cepas testadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Foram sintetizados seis compostos derivados da 2-cianoacetamida, apresentando rendimentos que variaram entre 26,87% e 78,50%, sendo um deles, o EE04, caracterizado por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C DEPT-Q. No RMN DE ^1H , o espectro obtido observamos sinais de deslocamento químico característicos, tais como o do CH metilênico em 8.32 ppm, sendo o principal sinal esperado da reação de condensação, além dos sinais aromáticos, e o RMN de ^{13}C , o espectro apresentou sinais característicos dos 6 carbonos quaternários e 4 terciários existentes na molécula, evidenciando assim, o sucesso da síntese. Todos os compostos apresentaram atividade significativa para a cepa de *S. aureus* ATCC, Gram positiva, com valor de CIM mínimo de 64 $\mu\text{g/ml}$ para o composto EE04, e máximo de 512 $\mu\text{g/ml}$ para os compostos EE02 e EE06. Já para a cepa de *E. coli* ATCC, Gram negativa, apenas os derivados EE01 e EE02 apresentaram boa atividade com CIM de 64 $\mu\text{g/ml}$ e 128 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Para a cepa de *S. aureus* resistente à meticilina, os compostos EE01 e EE02 mantiveram a atividade inibitória, com uma CIM de 64 $\mu\text{g/ml}$, esta cepa também apresentou inibição no composto EE03, apresentando a melhor CIM, com uma concentração de 32 $\mu\text{g/ml}$. Estes resultados se apresentam promissores para os novos candidatos a protótipos de fármacos antibacterianos.

Palavras-chave: Resistência. Acrilamidas substituídas. Avaliação. Microdiluição. Protótipos.

ABSTRACT

Resistance to antibiotics represents a major public health problem since the implementation of antibiotic therapy. Although the great diversity of chemical structures and different mechanisms of action of antibacterials, the treatment of infections caused by resistant bacteria has been increasingly difficult. Currently, there is not a single antibacterial in clinical use, against which there is at least one strain resistant to it. Therefore, there is a continuous search for the development of more biologically active structures and, the part of this search, the present study aimed at the development of new derivatives of 2-cyanoacetamide (substituted acrylamides) through synthesis, structural characterization and evaluation of its antibacterial activities in vitro, in order to obtain new antibacterial agents more effective, safe and powerful. These new derivatives were obtained by Knoevenagel type condensation reaction between different substituted aromatic aldehydes and 2-cyanoacetamide. The preliminary evaluation of the antibacterial activity was carried out using the broth microdilution technique according to the protocol M7-A10 (CLSI, 2016). The strains tested were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Six compounds derived from 2-cyanoacetamide were synthesized in yields ranging from 26.87% to 78.50%, one of them being EE04, characterized by ¹H NMR and ¹³C-DEPT-Q NMR. In the ¹H NMR spectra, we observed characteristic chemical shift signals, such as that of methylene CH in 8.32 ppm, the main expected signal of the condensation reaction, in addition to the aromatic signals, and ¹³C NMR, the spectrum showed characteristic signals of the 6 Quaternary and 4 tertiary carbons in the molecule, thus evidencing the success of the synthesis. All compounds showed significant activity for *S. aureus* strain ATCC, Gram positive, with a minimum MIC value of 64 µg /ml for compound EE04, and a maximum of 512 µg /ml for compounds EE02 and EE06. For the *E. coli* strain ATCC, gram negative, only the derivatives EE01 and EE02 showed good activity with MIC of 64 µg /ml and 128 µg /ml, respectively. For the methicillin-resistant *S. aureus* strain, the compounds EE01 and EE02 maintained the inhibitory activity, with an MIC of 64 µg /ml, this strain also showed inhibition in the EE03 compound, presenting the best MIC, with a concentration of 32 µg /ml. These results are promising for new candidates for prototypes of antibacterial drugs.

Keywords: Resistance. Substituted acrylamides. Evaluation. Microdilution. Prototypes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química da Linezolida.....	24
FIGURA 2	Sistemas heterocíclicos tienopiridina (A) e pirazolopiridina (B).....	25
FIGURA 3	Estrutura química da Chalcona.....	25
FIGURA 4	Estrutura química da β -lapachona.....	26
FIGURA 5	Estrutura química do Cimoxanil.....	27
FIGURA 6	Molécula de Acrilamida.....	28
FIGURA 7	Poliacrilamida.....	28
FIGURA 8	Microplaca com 96 poços.....	34
FIGURA 9	Reação de oxirredução da Resazurina.....	35
FIGURA 10	Esqueleto molecular geral dos derivados de 2-cianoacetamida.....	36
FIGURA 11	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H do composto EE04.	40
FIGURA 12	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H do composto EE04 (Sinais Ampliados).....	41
FIGURA 13	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^{13}C DEPT-Q do composto EE04.....	42
FIGURA 14	Estrutura molecular dos compostos da Série EE.....	44
FIGURA 15	Estrutura molecular dos compostos substituídos com o grupo cloro.....	46
FIGURA 16	Estrutura molecular dos compostos EE05 e EE06.....	47

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1	Reação de condensação de Knoevenagel.....	30
ESQUEMA 2	Reação de condensação de 2-cianoacetamida com diferentes aldeídos.....	31
ESQUEMA 3	Mecanismo reacional para obtenção da série EE.....	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Estrutura molecular dos compostos sintetizados e seus respectivos aldeídos aromáticos utilizados na síntese.....	36
TABELA 2	Características físico-químicas dos derivados sintetizados.....	38
TABELA 3	Concentração Inibitória Mínima de derivados de 2-cianoacetamida frente às cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 e <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	43
TABELA 4	Concentração Inibitória Mínima de derivados de 2-cianoacetamida frente às cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 e <i>S. aureus</i> resistente à meticilina (MRSA)	45
TABELA 5	Concentração Inibitória Mínima de derivados de 2-cianoacetamida frente às cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) e <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	46
TABELA 6	Concentração Inibitória Mínima de derivados de 2-cianoacetamida frente às cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) e <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CADD	Computer-Assisted Drug Design
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMH	Caldo Mueller Hinton
DEPT-Q	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer with tention of Quaternaries
DMSO	Dimetilsulfóxido
F.F.	Faixa de Fusão
FM	Fórmula Molecular
Log P	Coefficiente de Partição
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
PM	Peso Molecular
REA	Relação Estrutura-Atividade
Rend.	Rendimento
Rf	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAR	Structure-Activity Relationship

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1	Descoberta de novos fármacos	17
3.1.1	<i>Identificação de estruturas privilegiadas</i>	17
3.1.2	<i>Estratégias de desenvolvimento e modificação molecular</i>	18
3.2	As bactérias	18
3.2.1	<i>Bactérias patogênicas de interesse médico</i>	19
3.2.1.1	Estafilococos	20
3.2.1.2	Enterobactérias	21
3.2.2	<i>Principais antibacterianos de uso clínico e a resistência bacteriana</i>	22
3.3	Novos fármacos com atividade antimicrobiana	23
3.3.1	<i>Linezolida</i>	23
3.3.2	<i>Sistemas tienopiridina e pirazolopiridina</i>	24
3.3.3	<i>Chalconas</i>	25
3.3.4	<i>Lapachonas (Quinonas)</i>	26
3.4	Os compostos derivados da cianoacetamida	26
3.5	Condensação de Knoevenagel	29
4	METODOLOGIA	31
4.1	Etapa de síntese	31
4.1.1	<i>Reagentes para síntese</i>	31
4.1.2	<i>Síntese dos derivados de acrilamida</i>	31

4.1.3	<i>Procedimento geral para obtenção dos derivados de acrilamidas</i>	31
4.1.4	<i>Características físico-químicas e elucidação estrutural</i>	32
4.2	Etapa de avaliação da atividade antibacteriana dos derivados de acrilamida	32
4.2.1	<i>Micro-organismos utilizados</i>	32
4.2.2	<i>Teste por microdiluição</i>	33
4.2.3	<i>Padronização da suspensão bacteriana</i>	33
4.2.4	<i>Teste da Avaliação Antibacteriana</i>	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Compostos sintetizados e caracterização físico-química	36
5.2	Possível mecanismo de reação para a série EE	39
5.3	Elucidação estrutural	40
5.4	Avaliação antibacteriana	43
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXOS	55

1 INTRODUÇÃO

As bactérias surgiram na terra há bilhões de anos e para sobreviver desenvolveram mecanismos de resistência aos antibióticos que são encontrados livres na natureza. Não é surpreendente o fato de que muitos antibióticos lançados nas últimas décadas, que são em sua ampla maioria de origem natural ou semissintética, terem utilidade limitada na época de sua descoberta e em pouco tempo se tornarem obsoletos (ANTUNES., 2006)

O fenômeno da resistência é, de fato, algo muito preocupante uma vez que existem cepas resistentes a quase todos os agentes conhecidos atualmente. Outro fator que contribui muito para tornar um antibiótico menos eficiente é a sua utilização indiscriminada e incorreta, o que vem a favorecer o surgimento de micro-organismos resistentes e diminuir a eficácia do medicamento no organismo. 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 (DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

Atualmente, tem aumentado a procura por fármacos mais eficazes e seguros, que causem menos efeitos colaterais e que proporcionem aos seus usuários menor rejeição e maior sucesso nos tratamentos. Nesse contexto, através dos planejamentos e modificações moleculares, a química orgânica medicinal tem contribuído para a maior parte das novas descobertas, observando-se um crescimento considerável de compostos sintéticos para uso medicinal, os quais têm sido empregados no combate às diversas doenças (VERÇOSA et al. 2009).

A recente preocupação com o meio ambiente está aumentando o interesse do desenvolvimento de processos limpos e econômicos para a produção de produtos químicos finos. Neste contexto, a reação de condensação de Knoevenagel vem sendo bastante aplicada em síntese orgânica. Neste tipo de reação, moléculas complexas e contendo grupos funcionais específicos podem ser formadas através da condensação de duas ou mais moléculas simples, empregando como catalisador, uma base fraca. Entre outras vantagens deste tipo de reação, estão a simplicidade e a fácil execução (PEREZ et al., 2009; VELOSO et al., 2001).

Os compostos derivados da cianoacetamida possuem um considerável interesse científico, além de possuírem uma importante atividade biológica. Estes derivados são utilizados como fungicidas sistêmico e tópico, apresentando eficácia contra os fungos da ordem dos Peronosporales que causam prejuízos a diversos tipos de plantas (PINILLA-

MONSALVE et al., 2014). E apesar do seu uso em copolímeros de acrilamida em piscinas e torres de arrefecimento para inibir algas e bactérias (HOOVER, 1970), não há na literatura relatos de testes realizados para avaliar a sua eficácia contra bactérias patogênicas.

Baseado na atividade dos compostos derivados da cianoacetamida e no conhecimento prévio de inúmeras viabilidades sintéticas, unido à contínua busca para o desenvolvimento de estruturas biologicamente mais ativas e terapeuticamente úteis, vislumbrou-se a possibilidade de obtenção e caracterização de novos derivados da cianoacetamida, as acrilamidas, a fim de testar sua possível atividade antibacteriana frente a cepas referência de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a síntese dos derivados de cianoacetamida, obtidas através da reação de condensação, e a avaliação preliminar da atividade antibacteriana *in vitro*, visando obter potenciais agentes antibacterianos mais eficazes, seguros e potentes.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar derivados de cianoacetamida, objeto de estudo, através do emprego da síntese orgânica medicinal em escala de bancada;
- Realizar a caracterização físico-química e estrutural dos compostos;
- Avaliar de forma preliminar a atividade antimicrobiana *in vitro* das moléculas sintetizadas em seu estado puro frente às cepas de referência de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).
- Identificar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de cada molécula testada.
- Realizar o estudo da relação estrutura-atividade dos derivados sintetizados.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Descoberta de novos fármacos

O processo de descobrimento de um novo fármaco pode ser feito através de várias estratégias em um processo que envolve diversas etapas. Uma destas estratégias consiste na escolha de um alvo molecular selecionado (por exemplo, enzima, receptor), seguida pela validação deste alvo e do ensaio bioquímico/farmacológico. Em seguida passa pela identificação de um composto-protótipo, modificação/otimização deste composto protótipo até a aprovação nos testes clínicos em humanos, onde o tempo total envolvido em todo o processo leva aproximadamente 15 anos (DIAS; CORREA, 2001).

3.1.1 *Identificação de estruturas privilegiadas*

O reconhecimento molecular de uma droga pelo seu alvo farmacológico é o resultado de diversos tipos de interações com biomacromoléculas que envolvem dispersão e interações hidrofóbicas, forças eletrostáticas, ligações covalentes e de hidrogênio. As interações entre o arranjo espacial das subunidades estruturais da micromolécula com os sítios complementares do biorreceptor dependem de requisitos farmacofóricos e definem qualitativamente o grau de afinidade e seletividade da droga - complexo biorreceptor (BARREIRO; MANSSOUR, 2001; DUARTE et al., 2007).

O interesse na identificação de estruturas moleculares denominadas estruturas privilegiadas, tem crescido, conforme se observa na literatura. Elas correspondem a uma estrutura base presente em diversos compostos protótipos de fármacos que é capaz de fornecer pontos ligantes para mais de um tipo de biorreceptor, cuja seletividade pode ser modulada pela adequada introdução de unidades farmacofóricas auxiliares. Este conceito foi formulado por Evans e Patchett e tomou um significado além do original, ao identificarem propriedades nessas estruturas que tornam a interação delas com biomacromoléculas, mais fácil, e ocasionalmente mais distinta daquelas que envolvem os respectivos ligantes endógenos (DUARTE et al. 2007).

Uma das estratégias que vem sendo empregada por grupos de pesquisadores consiste em se preparar coleções de moléculas com estruturas privilegiadas utilizando a Química Combinatória. A criação de quimiotecas através da síntese simultânea de vários compostos,

aumenta a probabilidade de chegar a uma substância protótipo. O emprego de recursos computacionais e da modelagem molecular aliado a propriedades estruturais ou físico-químicas dessas moléculas, permitem o planejamento racional da diversidade química molecular (VILLAR; KOEHLER, 2000).

3.1.2 Estratégias de desenvolvimento e modificação molecular

A escolha da estratégia de planejamento estrutural a ser adotada para o desenho molecular do novo ligante dependerá do nível de conhecimento estrutural do alvo terapêutico eleito. A eleição do alvo terapêutico é a etapa crítica no sucesso desta estratégia e vai depender dos conhecimentos bioquímicos sobre a fisiopatologia da doença que se pretende tratar, prevenir ou curar e seus mecanismos farmacológicos (BARREIRO; MANSSOUR, 2001; LINDSAY, 2003).

O planejamento molecular dos análogos ativos pode se dar por meio do emprego das estratégias de simplificação molecular, hibridação molecular, restrição conformacional, homologação, bioisosterismo entre outras. Independente da estratégia adotada, deve-se, obrigatoriamente, levar em conta todas as possíveis contribuições toxicofóricas das subunidades moleculares presentes na série congênere de compostos planejados, especialmente quanto ao potencial tóxico relacionado ao sistema (BARREIRO; FRAGA, 2005).

As estratégias acima citadas podem ser realizadas em conjunto ou isoladas e direcionada a um determinado alvo biológico associada a uma patologia, como doença infecciosa causada por micro-organismos, dentro dos quais destacamos as bactérias.

3.2 As bactérias

As bactérias são seres unicelulares de estrutura simples, micro-organismos procariotos que podem apresentar-se isolados ou formando colônias. O tamanho de sua célula pode variar entre 0,3 a 5 μm , podendo ser móveis ou imóveis e classificadas como saprófitas e patogênicas (KAYSER, 2005).

As bactérias podem se apresentar sob a forma de cocos, bacilos e espirilos. Os cocos são normalmente redondos, podendo ser ovais ou alongados. Os bacilos assemelham-se a

bastonetes e os espirilos assemelham-se a vírgulas. De acordo com a organização dos cocos em pares, cadeias ou cachos identificam-se os grupos de micro-organismos denominados diplococos, estreptococos e estafilococos, respectivamente (KONEMAN et al. 2008).

Os micro-organismos, assim como as demais células, são constituídos por compostos químicos orgânicos, como carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, e inorgânicos, tais como sódio, potássio, ferro, cálcio e cloro (MARZOCCO; TORRES, 2007).

A célula bacteriana possui um genoma, um citoplasma, uma membrana citoplasmática, parede celular e algumas, possuem ainda, uma cápsula externa. As bactérias se diferenciam pela estrutura da parede celular, seus componentes e funções. Em relação à estrutura da parede celular, elas são classificadas em Gram-positivas e Gram-negativas, de acordo com a capacidade de retenção do corante de Gram (BROOKS et al., 2014).

Nas bactérias Gram-positivas, aproximadamente 90 % da parede é composta de peptidoglicano e além desta macromolécula, são encontrados ácidos teicóicos e proteínas que podem apresentar até 50% da massa seca da parede. Já a parede celular das bactérias Gram-negativas, possui uma composição química mais complexa o que confere propriedades bioquímicas e fisiológicas diferenciadas. É formada por poucas camadas de peptidoglicano e por uma membrana externa. Na parede externa da membrana citoplasmática, acima da camada de peptidoglicano localiza-se o espaço periplasmático, um compartimento que contém uma alta concentração de enzimas de degradação e proteínas de transporte. O peptidoglicano está ligado a membrana externa da parede através de pequenas lipoproteínas (localizadas no espaço periplasmático). Esta membrana externa é uma estrutura em dupla camada; sua camada interna é composta de fosfolipídeos (20%) e proteínas (50%) assemelhando-se à da membrana citoplasmática, possui canais especiais constituído de moléculas protéicas denominadas porinas que permitem a difusão passiva de açúcares, aminoácidos e certos íons; enquanto a camada externa possui em sua composição lipopolissacarídeos (BROOKS et al., 2014; RYAN; RAY, 2004).

3.2.1 *Bactérias patogênicas de interesse médico*

A variedade de micro-organismos encontrados no corpo humano em todo e qualquer sítio anatômico é denominada microbiota normal. Algumas bactérias são encontradas em locais anatômicos particulares, enquanto outras podem estar presentes ocasionalmente ou

apenas serem encontradas em determinadas fases da vida do hospedeiro (TRABULSI et al., 2004).

Ainda que inúmeros micro-organismos sejam constituintes da microbiota normal do corpo humano, alguns podem causar doenças infecciosas, que podem ser adquiridas tanto no ambiente comunitário quanto no ambiente hospitalar. A estas doenças infecciosas adquiridas no ambiente hospitalar dá-se o nome de infecções nosocomiais e são responsáveis por grandes índices de morbidade e mortalidade, o que tem despertado um grande interesse na área médica (PESSOA, 2011). Dentre os micro-organismos causadores de infecções nosocomiais, destacamos neste trabalho, os *Staphylococcus* e a enterobactéria *Escherichia coli*.

3.2.1.1 Estafilococos

O *Staphylococcus* (do grego “staphyle” = cachos de uvas, “cocos” = grão) foi descrito pela primeira vez em 1880 pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston, em pus de abscessos cirúrgicos, e atualmente é um dos micro-organismos mais comumente encontrados em infecções piogênicas em todo o mundo (PONTES, 2009).

Os *Staphylococcus* são cocos gram-positivos catalase-positivos e oxidase-negativos, com exceção de algumas espécies, tais como *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* e *S. saccharolyticus*, que são catalase negativos. São imóveis, não esporulados, geralmente não encapsulados possuindo aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro. Apresentam-se de diversas formas que vão desde isolados, aos pares, em pequenas cadeias, a agrupados em forma de cachos. Esse gênero é composto por 43 espécies sendo o *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a espécie mais conhecida e frequentemente associada a uma variedade de infecções oportunistas em seres humanos e animais. Ao nível patológico, destacam-se também as espécies *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* (PESSOA, 2011; QUINN et al., 2011).

Aproximadamente 70% das bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves, e dentre esses, a maioria são *Staphylococcus* coagulase negativos que possuem baixa virulência comparados com o *S. aureus*. Eles também são encontrados na mucosa do trato respiratório superior e inferior, do trato urogenital e como transientes no trato digestivo (QUINN et al., 2011; REDEL et al., 2013).

O *S. aureus* representa a espécie mais envolvida em infecções humanas, tanto de origem comunitária como de origem hospitalar. Aproximadamente 70 % dos isolados de infecções nosocomiais nos principais hospitais brasileiros, são resistentes à metilicina, denominados MRSA., isto é, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (SOUSA; FIGUEIREDO, 2008).

3.2.1.2 Enterobactérias

As bactérias pertencentes a família *Enterobacteriaceae* são bastonetes Gram-negativos de até 3 mm de comprimento. Essa família contém mais de 40 gêneros e mais de 180 espécies. Constituem os principais componentes da flora intestinal normal em seres humanos, sendo relativamente incomum em outros lugares do organismo (QUINN et al., 2011; PESSOA, 2011; MURRAY et al., 2000).

As enterobactérias podem ser agrupadas em três categorias: agentes patogênicos, patógenos oportunistas e agentes não patogênicos. Aqueles que não têm importância patogênica para animais e humanos, tais como *Hafnia* e *Erwinia*, podem ser isolados de fezes e também do ambiente e podem contaminar amostras clínicas. Patógenos oportunistas são aqueles que podem causar, ocasionalmente, doença clínica em situações de desequilíbrio do organismo. Os principais agentes patogênicos que são responsáveis por doenças entéricas e sistêmicas e até infecções hospitalares, são *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Enterobacter* sp. e *Serratia marcescens*, representam 80% de todos os bastonetes Gram-negativos e 50% de todas as bacteremias observadas clinicamente (QUINN et al., 2011; PESSOA, 2011; MURRAY et al., 2000).

O gênero *Escherichia* compreende as espécies *Escherichia coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris*. A *E. coli* é a espécie de maior importância prática e pode ser encontrada no solo, na água e na microbiota de quase todos os animais de sangue quente, incluindo os seres humanos. A maioria das cepas de *E. coli* são consideradas comensais e de baixa virulência, mas pode causar infecções oportunistas em locais extra-intestinais tais como no trato urinário. As cepas que causam enterocolite normalmente não fazem parte da flora normal e causam infecções através do contato direto com animais infectados, ou através da ingestão de alimentos ou água contaminada. Estirpes patogênicas de *E. coli* possuem fatores de virulência que permitem colonizar as superfícies de mucosas e com isso causar doença (DEPIZZOL, 2006). As cepas patogênicas têm sido isoladas de

diversos lugares do corpo humano, podendo causar pneumonias, meningites, infecções intestinais, urinárias e até septicemia. Algumas delas podem produzir uma potente endotoxina, a qual é capaz de causar diarreias graves em todos os grupos etários (QUINN et al. 2011; DOYLE et al. 2001; MERCK, 2010).

3.2.2 Principais antibacterianos de uso clínico e a resistência bacteriana

Os antimicrobianos podem ser classificados de várias maneiras, considerando seu espectro de ação, o tipo de atividade antimicrobiana, o grupo químico ao qual pertencem e o mecanismo de ação. Dentre as principais classes de antibióticos, estão os β -lactâmicos, os aminoglicosídeos, os macrolídeos, os glicopeptídeos, as tetraciclinas, o cloranfenicol, as quinolonas e fluoroquinolonas e as sulfonamidas, que podem atuar inibindo quatro alvos principais: biossíntese da parede bacteriana, biossíntese de proteínas, biossíntese de ácidos nucleicos, metabolismo do ácido fólico e membrana celular (PATRICK, 2008).

Apesar da grande diversidade de estruturas químicas e diferentes mecanismos de ação dos antibacterianos, o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes tem sido cada vez mais difícil, não existindo atualmente, um único antibacteriano em uso clínico, contra o qual não exista, pelo menos, uma cepa a ele resistente (CLANCY; MELVIN; MCCAFFERTY, 2010). Isto, somado ao uso indiscriminado e/ou incorreto destes antibacterianos, faz com que aumente a resistência bacteriana, diminuindo a eficiência do medicamento no organismo (PAZIAN; DA SILVA SASS, 2007).

A resistência aos antibacterianos tem sido um sério problema para a medicina, desde a implantação da antibioticoterapia nos primórdios da década de 1940. Em pleno século XXI, esse problema se mostra ainda mais crítico, face ao crescente aparecimento de cepas bacterianas multirresistentes e troca de resistência entre as diferentes espécies de bactérias (Ex.: *E. faecalis*, *M. tuberculosis*, *N. gonorrhoeae*, *P. pneumoniae* e *S. aureus*) (ANDERSSON; HUGHES, 2010).

As bactérias podem desenvolver resistência aos antibacterianos por meio de alguns mecanismos bioquímicos já bem difundidos na literatura. Esses mecanismos incluem a modificação química do antibacteriano através de enzimas específicas, a alteração do sítio de ligação do antibacteriano, a substituição do sítio de ligação, a diminuição da permeabilidade ao antibacteriano, o aumento da síntese de substrato com o qual o fármaco compete, o efluxo do antibacteriano por intermédio de transporte ativo e a síntese de proteínas protetoras dos ribossomos (ROUVEIX, 2007).

Desta forma, o sucesso no combate às infecções bacterianas e o controle sobre o aparecimento de bactérias resistentes é dependente do emprego criterioso dos antibacterianos e da descoberta de novas moléculas que possam ser disponibilizadas para uso em hospitais e na comunidade, o que leva, em média, de 10 a 15 anos para acontecer (ROLAIN; RAOULT, 2005; SEPUTIENNE et al., 2010)

3.3 Novos fármacos com atividade antimicrobiana

Novas fontes para a descoberta de protótipos de antibacterianos, sejam esses de origem natural ou sintética, são de grande interesse para a comunidade mundial, permitindo uma melhoria no tratamento de infecções por organismos patogênicos resistentes a moléculas atualmente utilizadas na clínica (WHO, 2016).

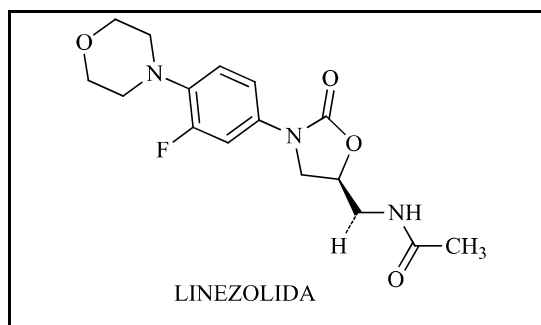
Dentre os novos antibacterianos, destacamos a Linezolida, os Sistemas tienopiridina e pirazolidina, as Chalconas e as Lapachonas.

3.3.1 Linezolida

A Linezolida é um antibacteriano de uso recente. Tem sido utilizada no tratamento de infecções associadas a *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina e no tratamento de infecções hospitalares causadas por *S. aureus* resistentes a meticilina (Figura 1). Porém, a toxicidade e casos emergentes de resistência, prolongam o tratamento, podendo torná-la ineficaz (LOHRAY et al., 2004).

Recentes descobertas revelam que a fusão do linezolida com o anel tienopiridina origina derivados que apresentam atividade semelhante ao Linezolida contra *S. aureus in vitro*, sendo moléculas em potencial para o estudo antibacteriano (LOHRAY et al., 2004; CAMINERO et al., 2010). Isso aponta esses sistemas cíclicos como novas opções para a criação de novas moléculas ativas.

Figura 1 – Estrutura química do Linezolida



Fonte: Desenhado pela autora

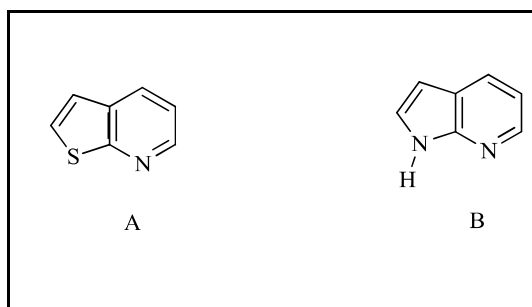
3.3.2 Sistemas tienopiridina e pirazolopiridina

A literatura descreve diferentes atividades biológicas, incluindo ação antimicrobiana, para os derivados tienopiridina (Figura 2). Estes estudos incluem derivados do tetraidrotienopiridinil oxalidinona semelhante a Linezolida que mostraram atividades antibacterianas contra *Bacillus pumilus*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *E. faecalis* (LOHRAY et al., 2004).

Alguns derivados do ácido 4-oxothienol[2,3-b]piridina-5-carboxílico também tem exibido boa atividade contra cepas de *S. aureus* ATCC, *S. faecalis* ATCC, *E. coli* ATCC, *K. pneumonia* ATCC, *E. cloacae* ATCC, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* ATCC (EL-ABADELAH et al., 1997). Quanto ao sistema 1H-pirazolo[3,4-b]piridina (Figura 2), alguns artigos da literatura, que tratam da química e das aplicações biológicas do sistema, descrevem diversas atividades como inibidor da Xantina Oxidase (YU et al., 2001; SEPUTIENNE et al., 2010) e na quimioterapia de alguns tumores (BARE et al., 1989). Outros derivados deste sistema se apresentam ainda eficazes como vasodilatadores e conseqüente potencial no tratamento da disfunção erétil (YU et al., 2001).

Derivados do sistema 1H-pirazolo[3,4-b] piridina foram capazes ainda de inibir a atividade das enzimas transcriptase reversa (RT) do vírus HIV tipo 1 (PEREIRA et al., 1996), bem como apresentaram atividade frente aos vírus HSV e Vaccínia e atividade antileishmania (ZERVOSEN et al., 2002; DE MELLO et al., 2004). Estes resultados denotam o potencial promissor destas séries a ser verificado também para atividade antibacteriana.

Figura 2 – Sistemas heterocíclicos tienopiridina (A) e pirazolopiridina (B)



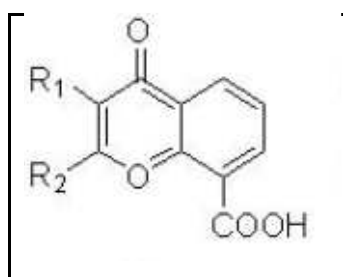
Fonte: Desenhado pela autora

3.3.3 Chalconas

As chalconas (Figura 3) são moléculas de grande interesse químico e farmacológico por apresentarem diversas atividades biológicas. Estas estruturas atuam em alvos específicos, como enzimas ou mediadores químicos, afetando processos inflamatórios, com a inibição da produção de óxido nítrico (NO) e PGE2 (prostaglandina E2), principalmente em macrófagos. Isso afeta a expressão das enzimas induzíveis envolvidas, podendo ser uma importante estratégia para obtenção de agentes antiinflamatórios (KIM et al., 2011).

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina tem sintetizado derivados chalcônicos com o objetivo de identificar um núcleo base no qual modificações moleculares possam ser realizadas, levando a um melhoramento da estrutura e da função antibacteriana, gerando futuros protótipos que possam contribuir para o tratamento de infecções causadas por cepas multirresistentes (MASCARELLO et al., 2010).

Figura 3 – Estrutura química da Chalcona

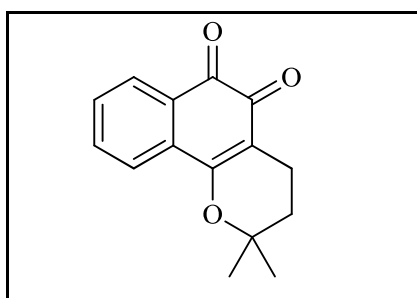


Fonte: Desenhado pela autora

3.3.4 Lapachonas (Quinonas)

As quinonas têm sido estudadas e se mostraram atuantes contra diversos quadros patológicos o que inclui tumor, inflamação, e infecções por fungos e parasitas. O perfil biológico observado para estas moléculas está centrado em seu núcleo *orto* e *para* quinoide que geralmente aceita um ou/e dois elétrons (ciclo redox) para formar o radical ânion ou diânion correspondente *in situ* da β -lapachona (Figura 4). Assim o radical semiquinona acelera a hipóxia intracelular dos micro-organismos pela produção dos superânions. Devido a este mecanismo, as quinonas podem apresentar uma elevada citotoxicidade contra as células do hospedeiro, possivelmente por afetar as topoisomerases, um grupo de enzimas necessárias para a replicação do DNA nas células (DA SILVA et al., 2011).

Figura 4 – Estrutura química da β -lapachona



Fonte: Desenhado pela autora

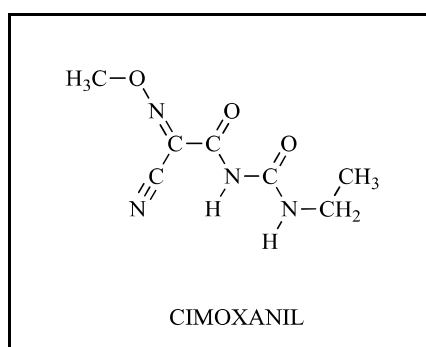
Apesar do vasto arsenal terapêutico existente para bactérias, como já mencionado, existe pelo menos uma cepa resistente a todos os fármacos disponíveis e isso tem incentivado pesquisadores da área, na busca por novas estruturas, entre elas, os derivados das cianoacetamidas, as acrilamidas.

3.4 Os compostos derivados da cianoacetamida

Os compostos derivados da cianoacetamida possuem um considerável interesse científico, além de possuírem uma importante atividade biológica. Uma cianoacetamida que é utilizada como fungicida sistêmico e de contato em plantas e apresenta atividade preventiva e curativa após infecções, é o Cimoxanil (Figura 5). Devido à sua composição, esta substância em doses baixas (20 vezes menor do que os fungicidas clássicos) penetra

mais facilmente as plantas sistemicamente, sendo eficaz contra a maioria dos fungos da ordem dos Peronosporales, responsável por causar ferrugens brancas e mofos em plantas. O cimoxanil controla a atividade do fungo destruindo seletivamente o micélio do mesmo na superfície das folhas no momento de incubação, impedindo germinação dos esporos que podem causar lesões e perda em culturas. Além de evitar a germinação de esporos, o cimoxanil emprega outros mecanismos de ação dentro do qual a inibição da síntese de RNA, respiração micelial com a destruição do micélio de fungos durante o período de incubação não permitindo danos ou novos ferimentos, alteração da permeabilidade da membrana celular e redução da esporulação (PINILLA-MONSALVE et al., 2014).

Figura 5 – Estrutura química do Cimoxanil



Fonte: Desenhado pela autora

O derivado da cianoacetamida, a acrilamida, cujo um dos objetivos deste trabalho é a síntese dos seus derivados substituídos, é um sólido cristalino branco, com peso molecular de 71.08 g/mol e um ponto de fusão de 84,5 ° C, possuindo uma tendência a sublimação, mesmo à temperatura ambiente. É altamente solúvel, tanto em água como em solventes orgânicos polares e reage com os compostos hidroxil, amino e sulfidril. A acrilamida é estável em solução e não se polimeriza espontaneamente. A molécula de acrilamida consiste em dois principais grupos funcionais: um grupo amida e um grupo vinil conjugados conforme a figura 6 (BIKALES, 1973).

Apesar da importante atividade biológica dos derivados da cianoacetamida conforme já mencionado, não há relatos na literatura de testes realizados para avaliar a sua eficácia contra bactérias patogênicas. Em razão disso, vislumbrou-se a possibilidade de obtenção e caracterização de novos derivados, a fim de testar sua possível atividade antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). Para a obtenção destes derivados, utilizou-se a condensação de Knoevenagel.

3.5 Condensação de Knoevenagel

A reação de Knoevenagel consiste na condensação de aldeídos ou cetonas que geralmente não possuem átomo de H ácido, na posição β , com um composto que contenha um grupo metileno ativo ($Z-CH_2-Z'$ ou $Z-CHR-Z'$; Z e Z' = CHO, COR, COOH, COOR, CN, etc) (MARCH, 1992). Esta reação é catalisada por bases, como amônia, amidas, aminas ou seus respectivos sais. (TIETZE; BEIFUSS, 1991).

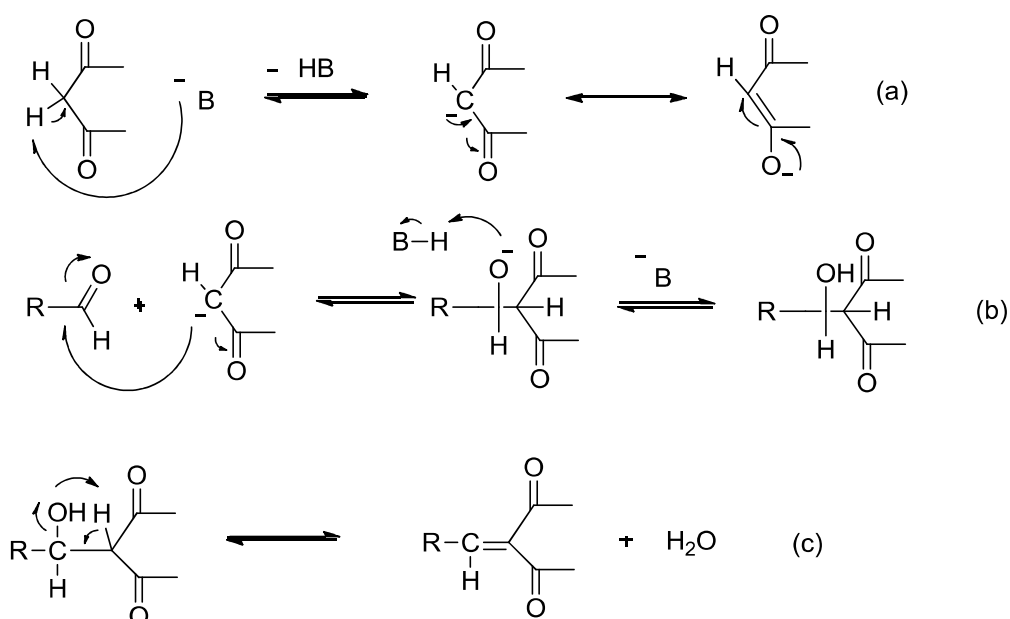
A condensação de Knoevenagel é uma importante reação aplicada em síntese orgânica, para o aumento (TIETZE; BEIFUSS, 1991) e funcionalização da cadeia carbônica (NOKAMI et al. 2001), pois pode introduzir, por exemplo, uma unidade dicarbonílica, que é relevante na síntese de alguns produtos orgânicos (HUCKIN; WEILER, 1974). Essa reação vem sendo bastante empregada na síntese de cumarinas e seus derivados, que são importantes matérias-primas para a produção de cosméticos, perfumes e compostos com aplicações farmacêuticas (BIGI et al. 1999).

Nos últimos anos, a condensação de Knoevenagel vem sendo aplicada utilizando-se sistemas catalíticos heterogêneos (BIGI et al. 1999), uma vez que estes catalisadores podem ser separados e reciclados facilmente, o que em alguns casos reduz custos de produção. Usualmente, na condensação de Knoevenagel, os compostos com os quais os aldeídos ou cetonas se condensam possuem ligação C-H ácida, pois o metileno é vizinho a um ou mais grupos como CN, COOR, COR, entre outros. A acidez da ligação C-H varia com o grupo vizinho.

A reação de Knoevenagel pertence à classe geral das condensações do tipo aldólicas, catalisadas por bases (TIETZE; BEIFUSS, 1991). Um dos mecanismos aceitos para esta reação, é semelhante ao aceito para condensações aldólicas. McBee e outros (1992), Kohler

e Corson (1975) e Cope (1937) defendem o mecanismo de caráter aldólico como sendo o provável para a reação de condensação. De acordo com este mecanismo, a reação ocorre em três etapas (Esquema 1): (a) desprotonação do composto com metileno ativo; (b) adição do carbânion ao composto carbonílico; (c) eliminação de água, a partir do intermediário aldólico.

Esquema 1 – Reação de condensação de Knoevenagel



Fonte: Desenhado pela autora

A velocidade e o rendimento da reação de condensação dependem de vários fatores, tais como: solvente, tipo dos grupos eletro-retiradores dos compostos metilênicos, catalisador básico e composto carbonílico (geralmente aldeídos ou cetonas). (JONES, 1967; HENDRICKSON et al., 1970).

A recente preocupação com o meio ambiente está aumentando o interesse do desenvolvimento de processos limpos e econômicos para a produção de produtos químicos finos. Neste contexto, a utilização da reação de condensação de Knoevenagel torna-se vantajosa, pois além da simplicidade ela é de fácil de execução (VELOSO et al., 2001; WEITKAMP; HUNGER; RYMSA, 2001; PEREZ et al., 2009).

4 METODOLOGIA

4.1 Etapa de síntese

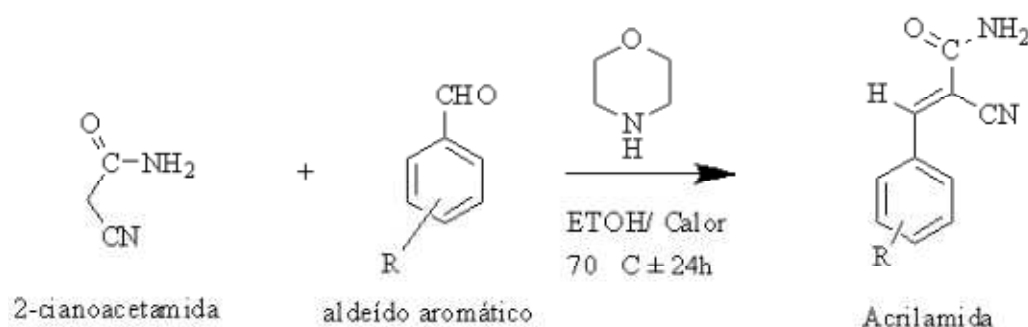
4.1.1 Reagentes para síntese

Para a obtenção dos derivados de acrilamida foram utilizados a 2-cianoacetamida, o 2,3-diclorobenzaldeído, o 2,4-diclorobenzaldeído, o 2,6-diclorobenzaldeído, o 4-clorobenzaldeído, o *p*-toluilbenzaldeído e o 4-metóxi-benzaldeído. Foram utilizados ainda, o álcool etílico e a morfolina.

4.1.2 Síntese dos derivados de acrilamida

Os derivados de acrilamida foram sintetizados de acordo com o método de condensação de Knoevenagel utilizando a 2-cianoacetamida e variando-se os aldeídos aromáticos substituídos, conforme o esquema 2. Para isto, foram pesadas quantidades proporcionais de cada reagente, de modo a obedecer à razão estequiométrica molar de 1:1.

Esquema 2 - Reação de condensação de 2-cianoacetamida com diferentes aldeídos



Fonte: Desenhado pela autora

4.1.3 Procedimento geral para obtenção dos derivados de acrilamidas

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 0,3g de 2-cianoacetamida e 1 equivalente do aldeído aromático substituído. O solvente utilizado na reação foi o etanol, na quantidade de 15mL. Além disso, utilizou-se para catálise da reação, 6 gotas de morfolina

dosadas com conta-gotas. A mistura reacional foi submetida à agitação mecânica e aquecida à temperatura de 70°C, por aproximadamente 24 h, e acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada Analítica. Depois de finalizada a reação, observou-se a formação de um produto único e o produto de partida completamente consumido.

A separação do produto final e da solução mãe foi realizada pelo processo de filtração através de papel filtro e lavagem com água destilada. Por conseguinte, o produto era mantido em capela de exaustão à temperatura ambiente para secagem até a obtenção de um pó completamente seco, pesado em balança de precisão (BEL Engineering Mark M214A) para realizar o cálculo do rendimento.

4.1.4 *Características físico-químicas e elucidação estrutural*

Após a síntese dos compostos foi realizado a caracterização físico-química dos mesmos sendo avaliado: aparência, cálculo de fator de retenção (Rf) - por meio de cromatografia de camada delgada analítica (CCDA)-, faixa de fusão (F.F)- através do aparelho Quimis Modelo Q-340M-, rendimento (%), peso molecular (P.M), fórmula molecular e coeficiente de partição 34 teórico (log P) através do programa ChemDraw Ultra 12.0. E por último, um dos compostos teve a estrutura elucidada através de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C DEPT-Q) Varian 400 nmrs 400 MHz (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) e Bruker Avance Spectrometer (AC-400 ou AC-500).

4.2 **Etapa de avaliação da atividade antibacteriana dos derivados de acrilamida**

4.2.1 *Micro-organismos utilizados*

Foram utilizadas as seguintes cepas de referência: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) devidamente identificada quanto ao perfil de resistência através de normas padronizadas pelo documento M100-S25 do Clinical and Laboratorial Standards Institute - CLSI (2016).

4.2.2 *Teste por microdiluição*

Os testes referentes à atividade antibacteriana dos compostos sintetizados foram realizados através da técnica de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M7-A10 pelo *Clinical and Laboratorial Standards Institute* (CLSI, 2016), para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das bactérias aeróbicas por microdiluição em caldo e diluição em ágar.

4.2.3 *Padronização da suspensão bacteriana*

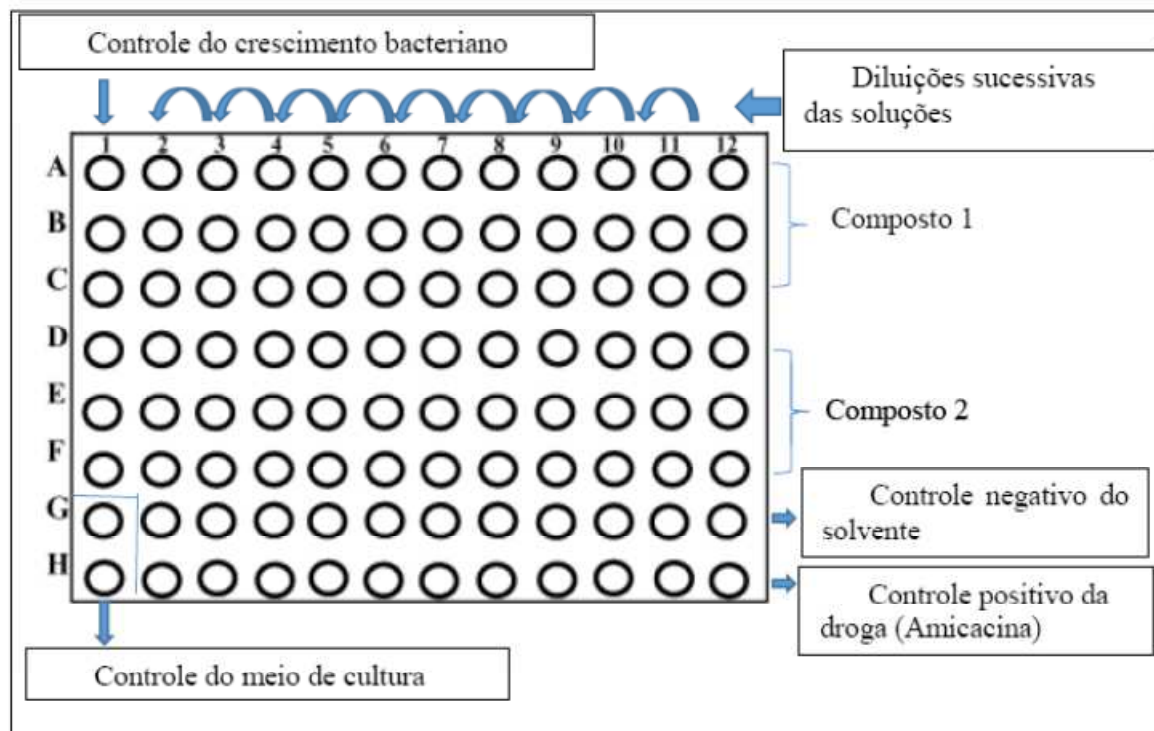
A suspensão bacteriana foi padronizada a partir de uma cultura em caldo BHI de 24 horas em solução salina à 0,9% estéril até atingir turvação igual a suspensão do tubo de McFarland. Em seguida, foi verificada a leitura em espectrofotômetro (Biospectro SP22®) com comprimento de onda de 625 nm, que resulta em uma concentração de 1 a 2×10^8 UFC/mL (corresponde a 0,5 na escala de 35 McFarland). Em seguida, o inóculo foi inserido diretamente nos orifícios da microplaca contendo as moléculas testes já diluídas.

4.2.4 *Teste da Avaliação Antibacteriana*

As concentrações finais dos derivados de acrilamida variaram entre 1024 a $1 \mu\text{g/mL}$. Os testes foram realizados em triplicatas. O meio de cultura utilizado nos testes foi o CMH. A droga controle utilizada foi a Amicacina e alguns poços foram reservados para os testes de esterilidade do meio e controle do crescimento bacteriano.

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100 μL de CMH, com exceção dos poços referentes a coluna 12 da microplaca, e a partir da coluna 11, foi realizada a diluição seriada da solução-teste até a coluna 2, como mostra a figura 8.

Figura 8 – Microplaca com 96



Fonte: Desenhado pela autora

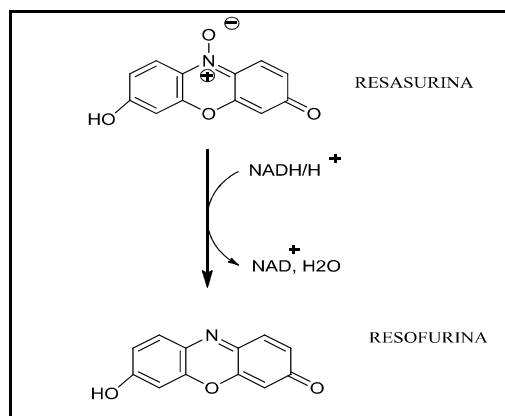
Em seguida, foram distribuídos 10 μL das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas, com exceção dos poços G e H da coluna 1, apresentando somente o meio de cultura para verificação da esterilidade do mesmo. A linha G, da coluna 2 até a coluna 12 foi destinada para o controle negativo do solvente (DMSO) e a linha H, da coluna 2 até a coluna 12, para a droga controle (Amicacina). Na coluna 1, da linha A até a F, foi realizado o controle da viabilidade do micro-organismo, contendo apenas o CMH e o inóculo bacteriano.

Ao final de todo o procedimento, as microplacas foram incubadas por 24 horas em estufa à 36°C. As leituras foram realizadas através da utilização do revelador resazurina a 0,01%. Foram adicionados 20 μL deste revelador em cada orifício das placas, sendo incubadas por 3 horas. Após decorrido esse tempo, verificou-se a presença de cor azul ou rosa, no qual a cor azul representa ausência de crescimento e a cor rosa indica o crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-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 9. 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 9 – Reação de oxirredução da Resazurina



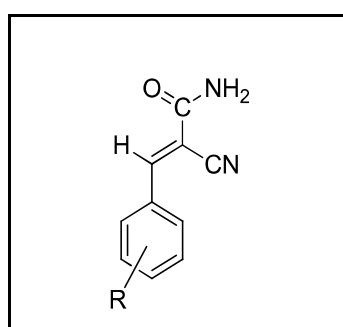
Fonte: Desenhado pela autora

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Compostos sintetizados e caracterização físico-química

Foram sintetizados seis novos compostos derivados de 2-cianoacetamida (Figura 10) codificados por EE os quais se encontram na Tabela 1 e as características físico-químicas de cada um, estão descritas na Tabela 2.

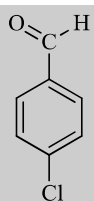
Figura 10 - Esqueleto molecular geral dos derivados de 2-cianoacetamida



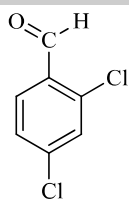
Fonte: Desenhado pela autora

Tabela 1 - Estrutura molecular dos compostos sintetizados e seus respectivos aldeídos aromáticos utilizados na síntese.

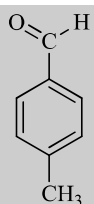
Aldeídos aromáticos	Compostos sintetizados
<p>2,6-dicloro-benzaldeído</p>	<p>EE01: 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil)acrilamida</p>
<p>2,3-dicloro-benzaldeído</p>	<p>EE02: 2-ciano-3-(2,3-diclorofenil)acrilamida</p>



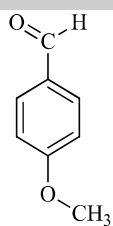
4-cloro-benzaldeído



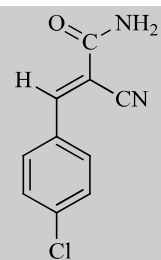
2,4-dicloro-benzaldeído



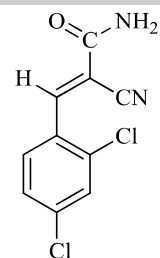
p-toluil-benzaldeído



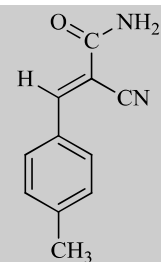
4-metóxi-benzaldeído



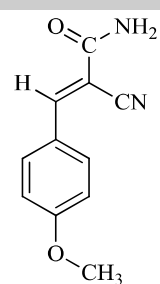
EE03: 3-(4-clorofenil)-2-cianoacrilamida



EE04: 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil)acrilamida



EE05: 2-ciano-3-(p-toluil)acrilamida



EE06: 2-ciano-3-(4-metoxifenil)acrilamida

Fonte: Desenhado pela autora

Tabela 2 - Características físico-químicas dos derivados sintetizados

Compostos	Aparência/ Cor	Rend (%)	Rf	Faixa de fusão (°C)	FM	PM (g/mol)	Log P
EE01	Branco	68,39	0,87 (H:A/6:4)	190-193	C ₁₀ H ₆ Cl ₂ N ₂ O	241,07	2,29
EE02	Amarelo	74,81	0,85 (H:A/8:2)	227-230	C ₁₀ H ₆ Cl ₂ N ₂ O	241,07	2,29
EE03	Amarelo	26,87	0,92 (H:A/6:4)	164-166	C ₁₀ H ₇ ClN ₂ O	206,63	1,74
EE04	Amarelo	62,17	0,86 (H:A/6:4)	210-213	C ₁₀ H ₆ Cl ₂ N ₂ O	241,07	2,29
EE05	Amarelo	28,89	0,96 (H:A/6:4)	168-170	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O	220,65	2,22
EE06	Amarelo claro	78,50	0,65 (H:A/6:4)	235-237	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₂	236,65	1,61

Fonte: Dados da pesquisa

Rend (%): Rendimento; Rf: Fator de Retenção; FM: Fórmula Molecular; PM: Peso Molecular; Log P: Coeficiente de Partição; H:A: Hexano/Acetato de Etila

Conforme mostrado na Tabela 2, quase todos os compostos apresentaram rendimento acima de 50%, com exceção do EE03 e do EE05 que tiveram um rendimento de 26,87% e 28,89% respectivamente, isso demonstra boa viabilidade da rota sintética utilizada. Com relação aos compostos EE03 e EE05, o fator que pode ter influenciado no rendimento, pode ter sido o processo de recristalização em etanol feito para estes compostos. Nesse processo deve-se levar em consideração o fato de que a 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, podem mesmo impedir inteiramente a formação de cristais; ademais pode ocorrer perda considerável de material (MANO; SEABRA, 2002). Quanto a faixa de fusão, a variação de temperatura para todos os compostos foi de até 3°C. Os valores ficaram entre 164°C (EE03) a 237°C (EE06).

Quanto ao Log P, os compostos que apresentaram menor lipofilia foram os EE03 (1,74) e EE06 (1,61) sendo os que obtiveram maior solubilidade no DMSO para o teste biológico. Todos os outros compostos apresentaram praticamente o mesmo Log P, entre 2,22 e 2,29. Pode-se observar então, que todos os compostos apresentaram Log P <5, estando de acordo com a regra de Lipinski o que pode indicar um bom perfil de

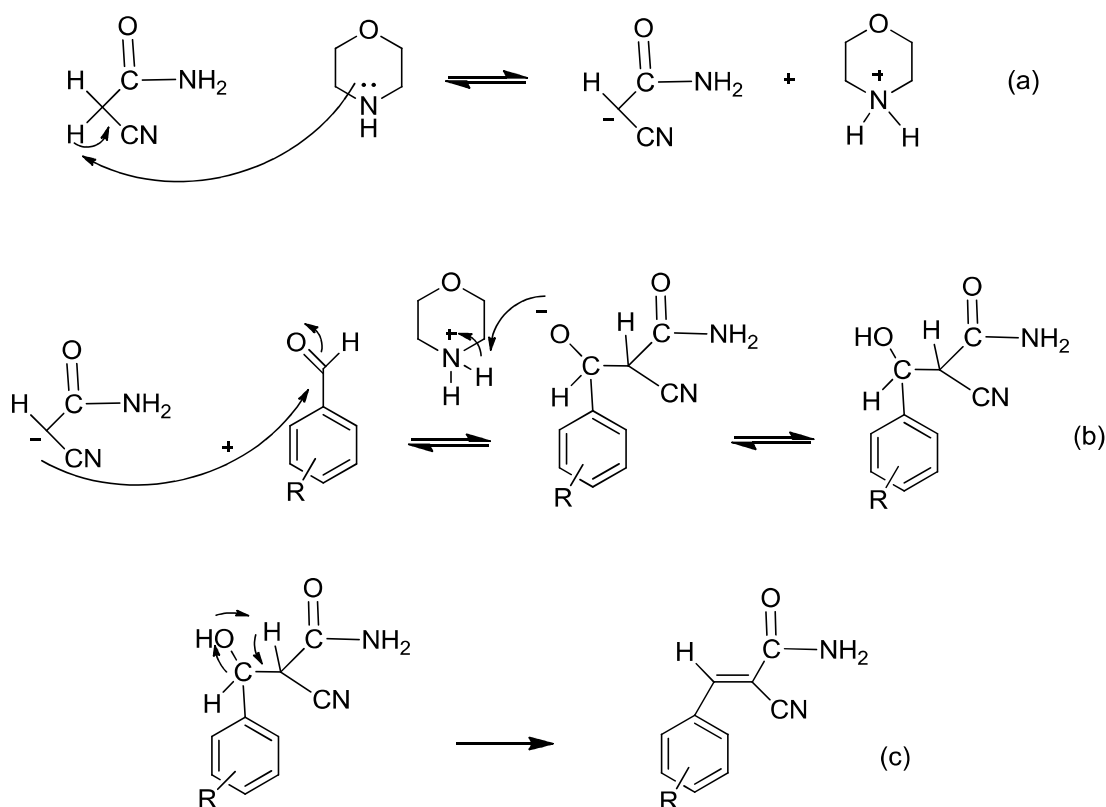
biodisponibilidade (BARREIRO; FRAGA, 2005), resultando em um aumento de sua ação farmacológica.

5.2 Possível mecanismo de reação para a série EE

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; BEIFUSS, 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 (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 reacional para obtenção da série EE

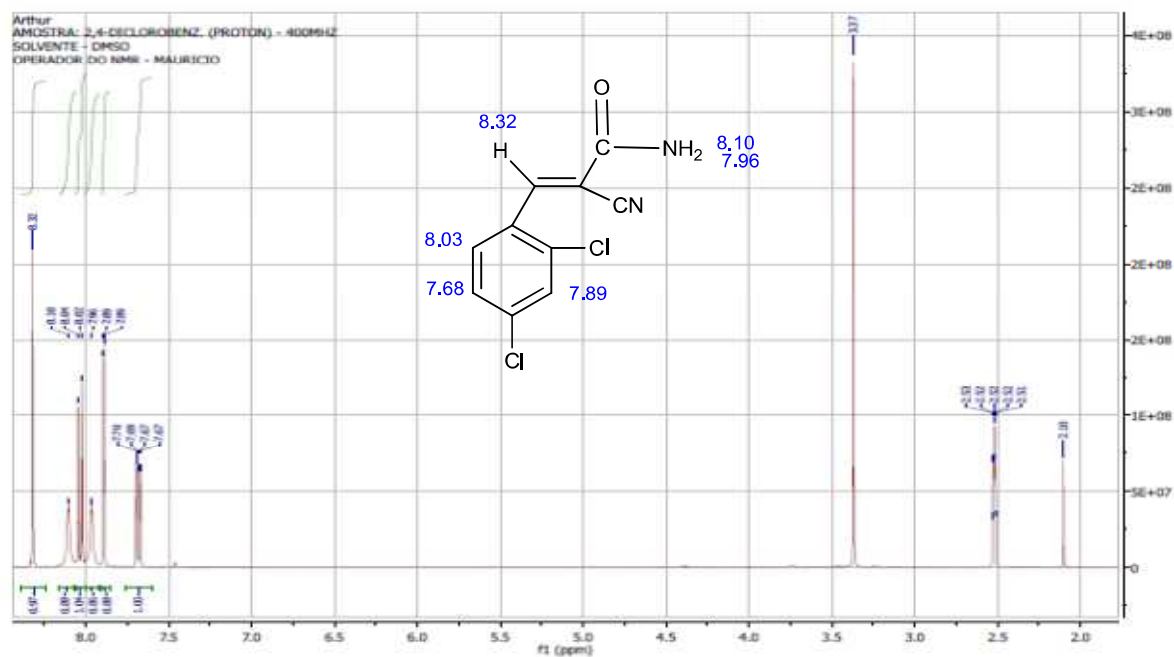


Fonte: Desenhado pela autora

5.3 Elucidação estrutural

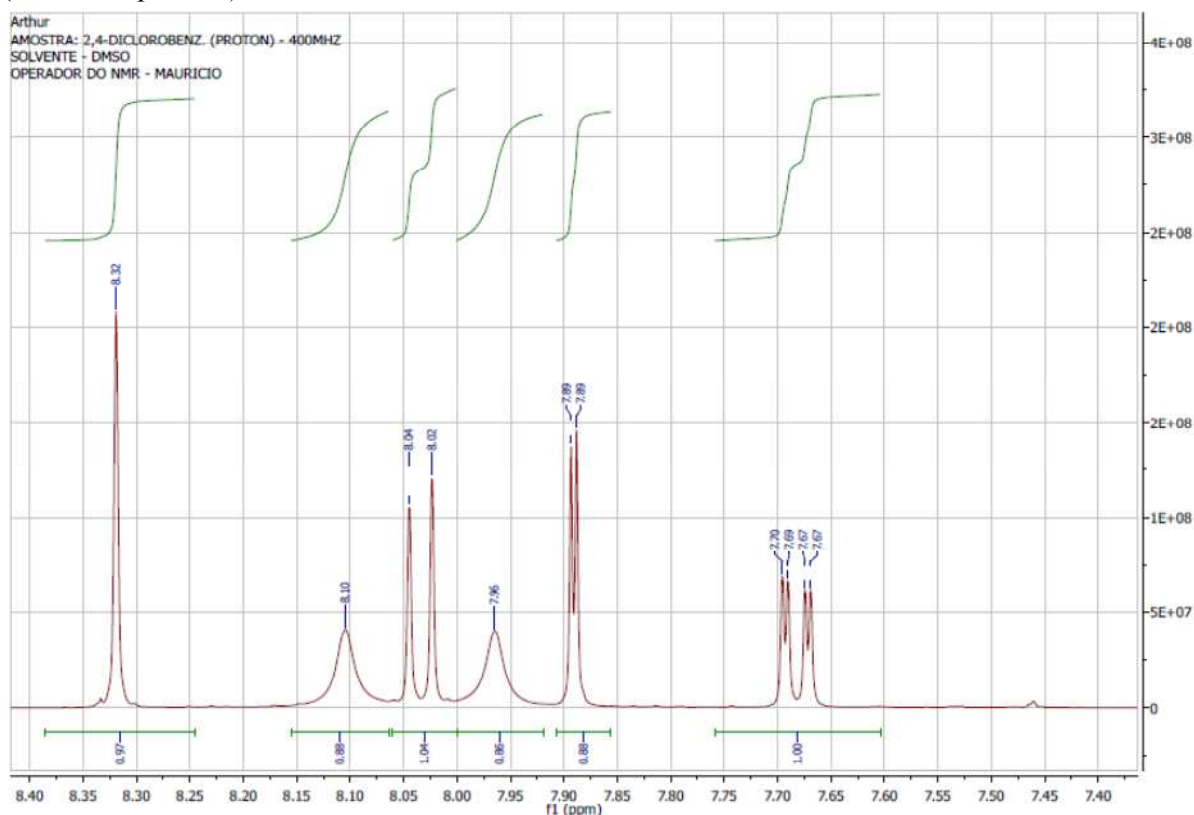
O composto utilizado para a obtenção dos espectros através das técnicas de RMN ^1H (Figuras 11 e 12) e de RMN ^{13}C (Figura 13) foi o EE04, conforme mostrado abaixo.

Figura 11 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H do composto EE04



EE04: RMN de ^1H (400 MHz, δ ppm, DMSO): δ 8.32 (1H, C=CH, s); 8.10 (1H, NH, s); 7.96 (1H, NH, s); Aromáticos: δ 8.03 (1H, d, $J=8,0$ Hz, CH), 7.89 (1H, d, CH), 7.68 (1H, dd, $J=8,0$ Hz, CH).

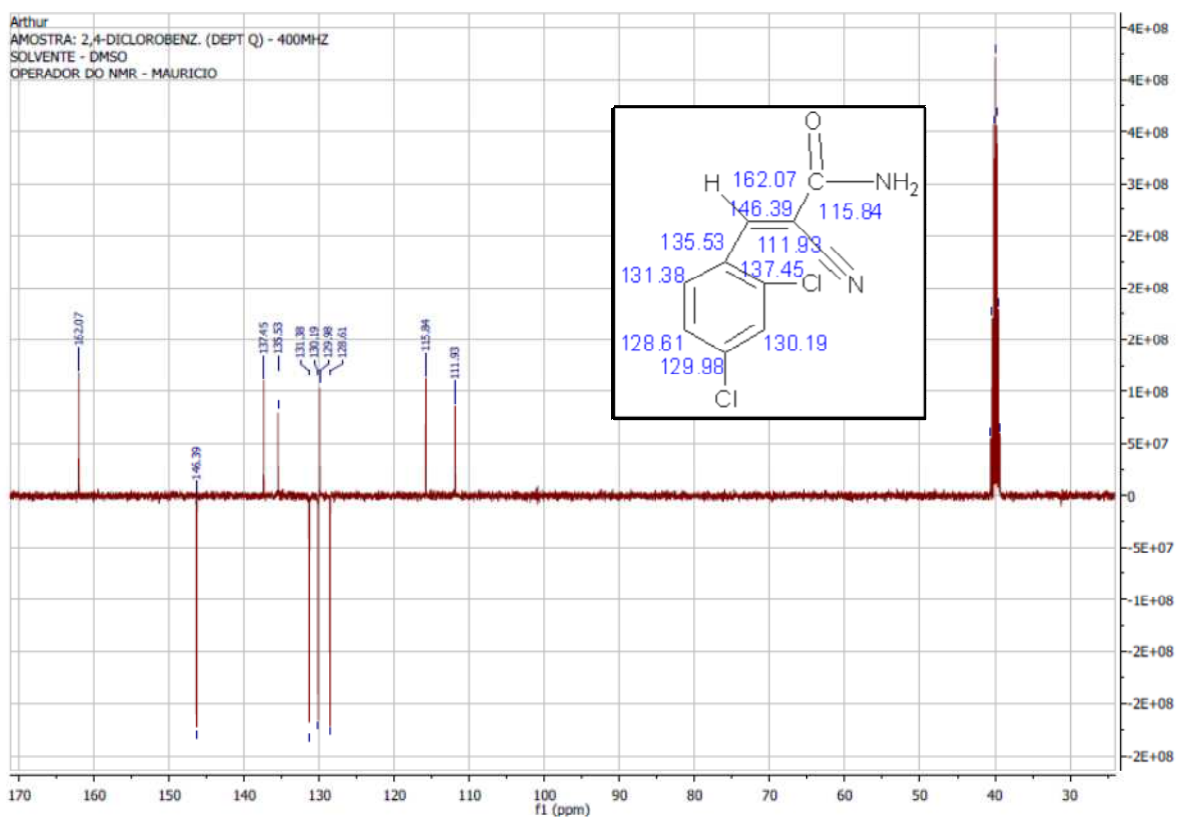
Figura 12 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H do composto EE04 (Sinais ampliados)



EE04: RMN de ^1H (400 MHz, δ ppm, DMSO): δ 8.32 (1H, C=CH, s); 8.10 (1H, NH, s); 7.96 (1H, NH, s); Aromáticos: δ 8.03 (1H, d, $J=8,0$ Hz, CH), 7.89 (1H, d, CH), 7.68 (1H, dd, $J=8,0$ Hz, CH).

O composto EE04 teve sua estrutura elucidada por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C . O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais característicos como o CH metilênico em 8.32 ppm, sendo este, o primeiro sinal característico da reação de condensação. Pode-se observar também, dois sinais largos, um deles em 8.10 ppm e o outro em 7.96 ppm, que correspondem ao NH da amida devido a possível formação de pontes de hidrogênio destes sinais com os solventes deuterados. As variações de posição são correspondentes aos possíveis rotâmeros assumidos pelos dois hidrogênios da função amida. Observa-se ainda, os sinais dos hidrogênios aromáticos, como dubletos e duplo-dubletos, demonstrando a existência de três hidrogênios aromáticos e comprovando assim, a estrutura proposta. Além desses sinais, pode-se observar um sinal em 3.5 ppm e outro em 2.5 ppm, que correspondem à água do solvente e ao DMSO, respectivamente. O sinal em 2.0 ppm é característico de impurezas na molécula sintetizada.

Figura 13 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^{13}C DEPT-Q do composto EE04



EE04: RMN de ^{13}C DEPT-Q (100 MHz, δ ppm, DMSO): δ CH: 146.39, 131.38, 130.19, 128.61; C: 162.07, 137.45, 135.53, 129.98, 115.84, 111.93.

Conforme pode-se observar, a análise do RMN ^{13}C DEPT-Q, que separa carbonos primários e terciários dos carbonos secundários e quaternários, apresentou dez sinais característicos dos carbonos como esperado para a estrutura da molécula proposta, sendo eles de seis carbonos quaternários e quatro de carbonos terciários, comprovando assim, a existência da estrutura proposta.

Devido as análises serem realizadas em universidade parceira, infelizmente não conseguimos em tempo hábil a caracterização dos demais compostos da série. Entretanto, como todas as reações para a obtenção dos demais compostos seguiram o mesmo padrão, acreditamos na formação das estruturas propostas.

5.4 Avaliação antibacteriana

Após as sínteses e avaliações estruturais, os compostos da série EE foram submetidos à avaliação biológica frente às cepas de *S. aureus* ATCC, de *E. coli* ATCC e *S. aureus* MRSA, a fim de identificar as concentrações inibitórias mínimas de cada composto. Os valores encontram-se nas Tabelas 3, 4, 5 e 6.

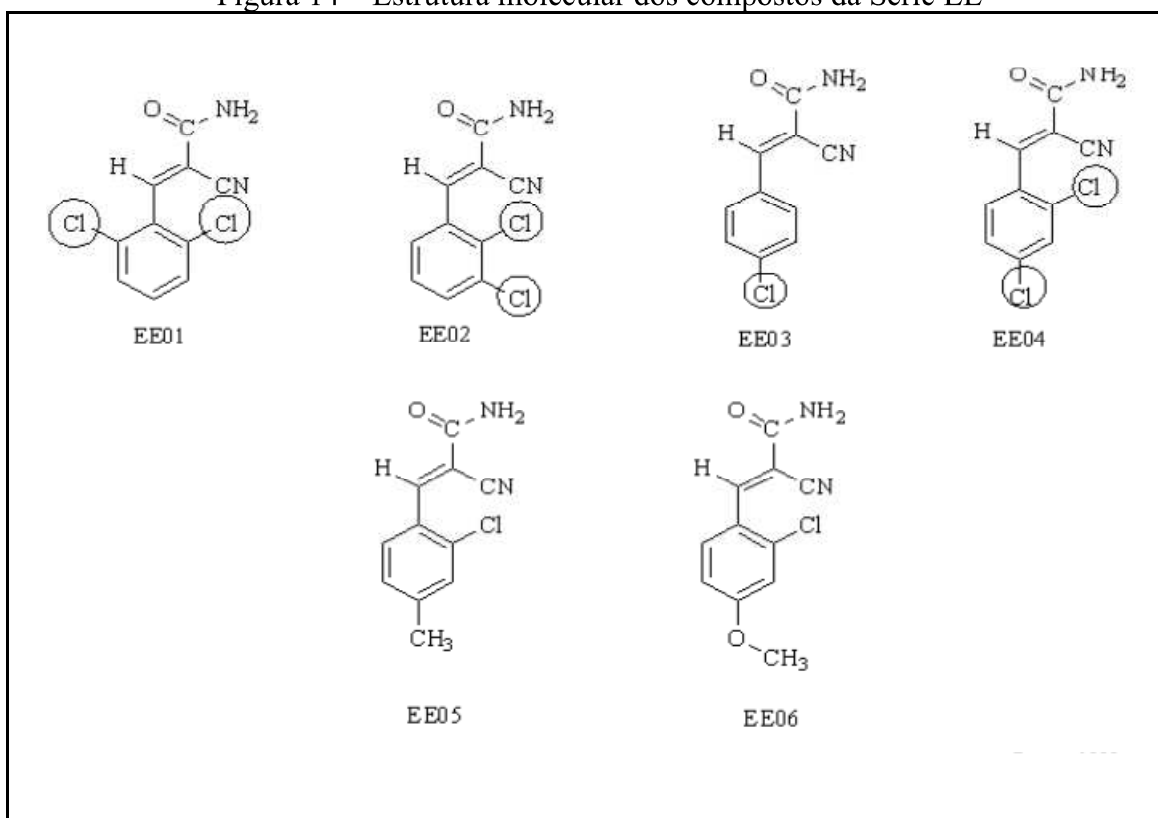
Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima de derivados de 2-cianoacetamida frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922.

Compostos Testados	<i>S. aureus</i> ATCC	<i>E. coli</i> ATCC
	25923	25922
	CIM (µg/ml)	CIM (µg/ml)
EE01	256	64
EE02	512	128
EE03	128	>1024
EE04	64	>1024
EE05	128	>1024
EE06	512	>1024

Fonte: Dados da pesquisa

Dentre a série de compostos testados (Figura 14) para as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922, pode se observar que a CIM apresentada pela cepa de *E. coli* somente apresentou um resultado relevante mediante os compostos EE01 e EE02 cujos valores encontrados foram 64 µg/ml e 128 µg/ml, o restante dos compostos da série apresentaram valores acima de 1024 µg/ml. Já a CIM apresentada pela cepa de *S. aureus* teve valores abaixo de 1024 µg/ml para todos os compostos da série, isso pode ser explicado devido ao fato de a bactéria *E. coli* ser Gram negativa e a *S. aureus* ser Gram positiva, mostrando que as diferenças nas paredes das células de cada uma influenciam de forma significativa na atividade dos compostos.

Figura 14 – Estrutura molecular dos compostos da Série EE



Fonte: Desenhado pela autora

De acordo com Guimarães et al (2010), as bactérias Gram negativas são mais resistentes a ação dos antibióticos devido à natureza mais complexa da parede celular que os impedem de cruzar efetivamente esta barreira lipídica. Para ter acesso à célula bacteriana, os antibióticos devem atravessar a parede celular através dos canais proteicos de porina, embebidos na estrutura lipídica, que apresentam o interior com características hidrofílicas. Assim, os antibióticos que possuem maior atividade frente as cepas Gram negativas, são aqueles que apresentam grupos ionizáveis em suas estruturas químicas permitindo que os mesmos passem por estes canais de porina e alcancem o interior da célula bacteriana.

Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima de derivados de 2-cianoacetamida frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA)

Compostos Testados	<i>S. aureus</i> ATCC	<i>S. aureus</i>
	25923	MRSA
	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	CIM ($\mu\text{g/ml}$)
EE01	256	64
EE02	512	64
EE03	128	32
EE04	64	>1024
EE05	128	>1024
EE06	512	>1024

Fonte: Dados da pesquisa

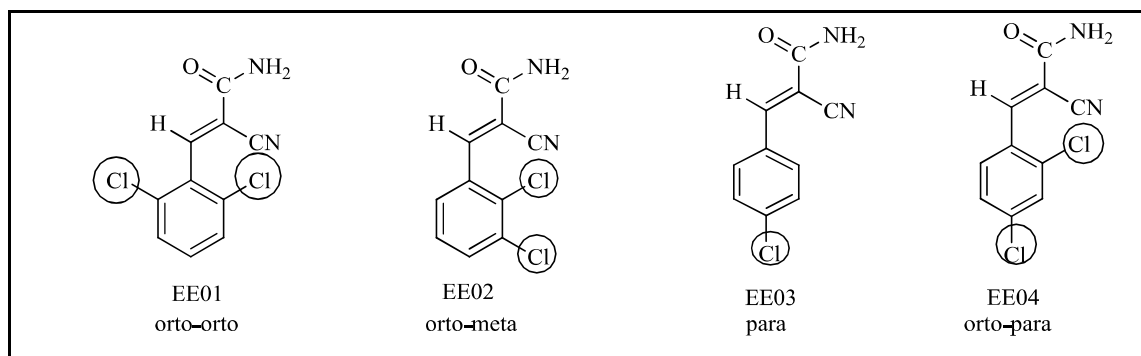
O teste realizado para as cepas de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), apresentou melhores resultados para os compostos EE01, EE02 e EE03 quando comparado à cepa de *S. aureus* não resistente. Os compostos EE04, EE05 e EE06 somente apresentaram atividade significativa perante a cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Como se observa na Tabela 4, a CIM apresentada pela cepa de *S. aureus* ATCC 25923 para os compostos EE01, EE02 e EE03, foi de 256, 512 e 128 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, enquanto que a CIM apresentada pela cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) para os mesmos compostos, foi de 64, 64 e 32 $\mu\text{g/ml}$. Para os compostos EE04, EE05 e EE06, a CIM apresentada para a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 foi de 64, 128 e 512 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

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 (GAWESKA et al., 2004).

Segundo Pasin et al (2010), a introdução dos halogênios e grupos halogenados em moléculas orgânicas confere frequentemente mudanças significativas e úteis em sua composição química, propriedades físicas e biológicas. Pensando nisso, foi testado a

presença do cloro em quatro dos compostos da série, EE01, EE02 e EE04, estes dissustituídos, com exceção do EE03, monoclorado (Figura 15).

Figura 15 – Estrutura molecular dos compostos substituídos com o grupo cloro



Fonte: Desenhado pela autora

Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima de derivados de 2-cianoacetamida frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *E. coli* ATCC 25922.

Compostos Testados	<i>S. aureus</i> ATCC	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> ATCC
	25923	MRSA	25922
	CIM (µg/ml)	CIM (µg/ml)	CIM (µg/ml)
EE01	256	64	64
EE02	512	64	128
EE03	128	32	>1024
EE04	64	>1024	>1024

Fonte: Dados da pesquisa

Dentre os testes realizados frente à cepa de *S. aureus* ATCC conforme observado na Tabela 5, todos os compostos apresentaram atividade, sendo o composto EE04 dissustituído em posição *orto-para*, o que apresentou maior atividade com uma CIM de 64 µg/ml, e levando em consideração o seu isômero, o composto EE01, cuja única diferença é a posição dos halogênios (*orto-orto*), que apresentou uma redução da atividade, apresentando uma CIM de 256 µg/ml, e ainda o composto EE02 dissustituído em posição *orto-meta*, que apresentou uma atividade ainda mais reduzida, de 512 µg/ml para a mesma cepa testada, enfatizando também a importância da posição dos grupos substituintes para a atividade

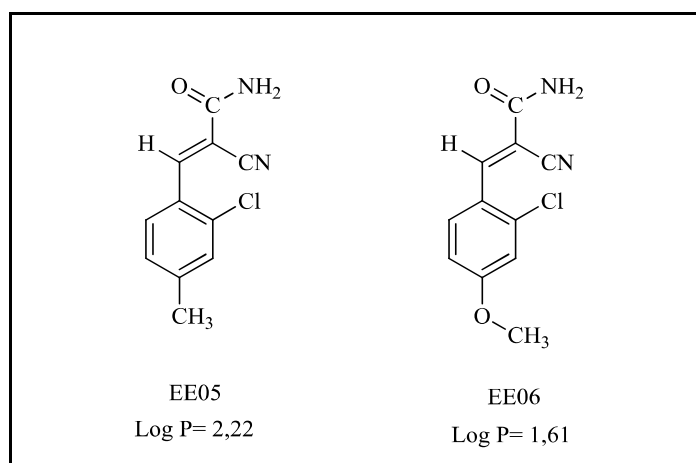
proposta. Frente às cepas de *S. aureus* MRSA e *E. coli*, os compostos EE01 e EE02, que são dissustituídos, apresentaram uma boa atividade (*S. aureus* MRSA – EE01: 64 µg/ml, EE02: 64 µg/ml; *E. coli* – EE01: 64 µg/ml, EE02: 128 µg/ml), já o composto EE03, monoclorado em posição *para* do anel benzênico, apresentou ótima atividade, com uma CIM de 32 µg/ml, frente a cepa de *S. aureus* MRSA e nenhuma atividade frente a cepa de *E. coli*.

Um ponto importante a ser observado em relação aos resultados obtidos para a cepa de *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), é que os compostos clorados, EE01 em posição *orto-orto*, EE02 em posição *orto-meta* e EE03 em *para*, apresentaram uma significativa atividade, enquanto que o composto EE04, apesar de também ser clorado, e substituído em *orto-para*, não apresentou atividade. O fato de o resultado obtido para o composto EE04 não ter seguido o padrão dos demais compostos clorados, causou uma certa estranheza, o que pode sugerir uma repetição nos testes em perspectivas futuras, para poder validar este composto frente a cepa testada, e, se possível, testá-lo ainda, frente outras cepas resistentes.

Ainda frente a cepa de *S.aureus* MRSA, a presença do grupo substituinte cloro em posição *para*, parece favorecer a atividade, isso pode ser confirmado pelo composto EE03 cuja CIM foi de 32 µg/ml. Substituições em *orto-meta* apresentam boa atividade, mas a substituição em *orto* parece favorecer ainda mais esta atividade frente todas as cepas testadas, o que pode estar relacionado aos efeitos eletrônicos indutivos negativos ou mesoméricos positivos apresentado por este átomo.

Também com o intuito de avaliar a importância da introdução de grupos doadores de elétrons na posição *para*, dois compostos foram testados, o EE05 com o grupo substituinte alquila (-CH₃), e o EE06, com o grupo substituinte metóxi (-OCH₃) (Figura 16).

t 16 – Estrutura molecular dos compostos EE05 e EE06



Fonte: Desenhado pela autora

Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima de derivados de 2-cianoacetamida frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *E. coli* ATCC 25922.

Compostos Testados	<i>S. aureus</i> ATCC	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> ATCC
	25923	MRSA	25922
	CIM (µg/ml)	CIM (µg/ml)	CIM (µg/ml)
EE05	128	>1024	>1024
EE06	512	>1024	>1024

Fonte: Dados da pesquisa

Dentre os testes realizados frente à cepa de *S. aureus*, conforme se observa na Tabela 6, verificou-se que o composto EE05 apresentou melhor atividade (128 µg/ml) que o composto EE06 (512 µg/ml). Este resultado pode estar relacionado a lipofilia do grupo -OCH₃ que é menor que -CH₃, uma vez que o log P do composto EE05, em 2,22, é maior que o log P do composto EE06, em 1,61. O maior log de P também poderá favorecer a atividade dos compostos, isto é o que se observa quando se compara o composto EE05 ao EE03, nota-se que o CH₃ (alquila) é um bioisostero do cloro, e que a substituição do Cl do EE03 pelo CH₃ do EE05 contribui para a manutenção da atividade para a cepa de *S. aureus* ATCC, enquanto que para a cepa *S. aureus* MRSA, esta substituição, leva a total perda de atividade.

Com relação aos controles realizados no teste por microdiluição, observou-se o não crescimento de bactérias no meio de cultura, confirmando a esterilidade do meio utilizado para a execução dos testes; a droga utilizada como controle positivo, inibiu completamente o crescimento bacteriano, confirmando a viabilidade dos micro-organismos utilizados; o solvente utilizado para o controle negativo, na concentração utilizada, mostrou não inibir o crescimento bacteriano.

Apesar de alguns dos resultados obtidos precisarem ser repetidos, as moléculas apresentaram atividade promissora como possíveis agentes antibacterianos, principalmente devido a inediticidade dos compostos, não havendo resultados na literatura para os alvos propostos, apresentando assim, novos possíveis “*scaffolds*” para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos.

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 dos compostos EE03 e EE05, do qual se obteve um rendimento de 26, 87% e 28, 89%, respectivamente, podendo ser justificado pela perda do primeiro no processo de recristalização e pela reatividade do segundo. A elucidação estrutural também comprovou que os compostos são, de fato, os propostos na pesquisa, principalmente pela presença do CH metilênico.

Com relação aos ensaios microbiológicos, todos os compostos apresentaram atividade significativa para a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 Gram positiva. Já para a cepa de *E. coli* ATCC, Gram negativa, apenas os derivados EE01 e EE02 apresentam boa atividade, com CIM de 64 µg/ml e 128 µg/ml, respectivamente, mostrando que a atividade dos diferentes compostos pode ser influenciada pela diferença na constituição da parede celular da bactéria.

A melhor atividade apresentada pelos compostos EE01, EE02, e EE03 mediante a cepa de *S. aureus* MRSA frente a cepa sensível, mostrou que a análise do fenótipo pode ser informativa acerca da interação entre os compostos e o sistema celular submetido no ensaio, porém sem obter maiores informações acerca do mecanismo de ação.

Para a cepa de *S. aureus* não resistente, o composto EE04, clorado em posição *orto-para*, apresentou melhor atividade que os seus isômeros de posição, o EE01 em posição *orto-orto* e o EE02 em posição *orto-meta*, mostrando que as posições dos grupos substituintes têm uma importância significativa para a atividade.

Para a cepa de *S. aureus* MRSA, a presença do grupo substituinte cloro em posição *para* favoreceu à atividade em relação as substituições em *orto-meta* ou *orto*, o que pode estar relacionado aos efeitos eletrônicos indutivos negativos ou mesoméricos positivos apresentado por este átomo. E a não atividade apresentada pelo EE04 *orto-para* substituído, fugindo do padrão em relação aos demais compostos clorados em posições *orto* e/ou *para*, sugere que a repetição dos testes seja realizada para que o composto seja validado.

A melhor atividade do composto EE05 frente o composto EE06, para a cepa de *S. aureus* sensível, mostrou que a lipofilia de um grupo substituinte também pode influenciar na atividade de um composto. Estes resultados validam o planejamento de novos candidatos a protótipos de fármacos antibacterianos.

REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, Dan I.; HUGHES, Diarmaid. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n. 4, p. 260-271, 2010.
- ANTUNES, Rossana M. Pessoa et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 16, n. 4, p. 517-524, Dec. 2006.
- BARE, Thomas M. et al. Synthesis and structure-activity relationships of a series of anxiolytic pyrazolopyridine ester and amide anxiolytic agents. **Journal of medicinal chemistry**, v. 32, n. 12, p. 2561-2573, 1989.
- BARREIRO, Eliezer J.; MANSSOUR, Carlos A.. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, ArtMed Editora Ltda: Porto Alegre, 2001.
- BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (Pronfar). **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, supl. p. S56-S63, Dec. 2005.
- BIKALES, Norbert M. Preparation of acrylamide polymers. In: *Water-Soluble Polymers*. **Springer US.**, p. 213-225, 1973.
- BIGI, F. ; CHESINI, L. ; MAGGI, R. ; SARTORI, G. **J. Org. Chem.**, v. 64, n. 4, p. 1033-1035, 1999.
- BROOKS, Geo. F. et al. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick & Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.
- BROWN, Kevin. The history of penicillin from discovery to the drive to production. **Pharmaceutical historian**, v. 34, n. 3, p. 37, 2004.
- CAMINERO, José A. et al. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. **Lancet Infect. Dis.**, v. 10, n. 9, p. 621-629, 2010.
- CLANCY, Kathleen W.; MELVIN, Jeffrey A.; MCCAFFERTY, Dewey G. Sortase transpeptidases: insights into mechanism, substrate specificity, and inhibition. **Peptide Science**, v. 94, n. 4, p. 385-396, 2010.

CLSI. 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. v. 36, n. 1, M100-S25, 2016.

CLSI. 2016. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. v. 36, n. 1, M7-A10, 2016.

COPE, A. C. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 59, p. 2327-2330, 1937.

DA SILVA, Eufrânio N. et al. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 46, n. 1, p. 399-410, 2011.

DE MELLO, Heloisa et al. Antileishmanial pyrazolopyridine derivatives: synthesis and structure– activity relationship analysis. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 22, p. 5427-5432, 2004.

DEPIZZOL, Fernanda. **Avaliação da resistência a antibióticos em isolados de Escherichia sta provenientes de esgoto hospitalar e sanitário**. 2006. 144f. Dissertação (mestrado) - programa de pós-graduação em engenharia ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2006.

DEMAIN, Arnold L.; SANCHEZ, Sergio. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5-16, 2009.

DIAS, Ricardo L. Araújo; CORREA, Arlene G.. Aplicações da química combinatória no desenvolvimento de fármacos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 236-242, Apr. 2001.

DOYLE, M. P. ; BEUCHAT, L. R., MONTVILLE, T. J., **Food Microbiology** : Fundamentals and Frontiers. 2. ed. Washington: ASM Press, 2001.

DUARTE, Carolina D., BARREIRO, Eliezer. J., FRAGA, Carlos. A. M.. Privileged Structures: A useful concept for the rational Design of New Lead Drug Candidates, **Mini-Rev. Med. Chem.**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 11, p. 1108-1119, 2007.

EL-ABADELAH, Mustafa M. et al. Thienopyridinone antibacterials: synthesis and antibacterial activity of some 7-aryl-2-chloro-4, 7-dihydro-4-oxothieno [2, 3-b] pyridine-5-carboxylic acids. **European journal of medicinal chemistry**, v. 33, n. 1, p. 33-42, 1998.

FLOCK, Howard G.; RAUSCH, Emerson G. Application of polyelectrolytes in municipal waste treatment. In: Water-Soluble Polymers. **Springer US**, p. 21-73, 1973.

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

GAWESKA, Helena; KIELEC, Joseph; MCCAFFERTY, Dewey. A suppression strategy for antibiotic discovery. **Chemistry & biology.**, v. 11, n. 10, p. 1330-1332, 2004.

GUIMARÃES, Denise Oliveira et al. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química nova.**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HENDRICKSON, J. B.; CRAM, D. J.; HAMMOND, G. S. **Organic Chemistry**, New York :McGraw-Hill Book Co., 1970.

HOOVER, M. F. Bactericidal quaternary diallyl ammonium polymers. **US Patent**, v. 3, n. 539, p.684, 1970.

HUCKIN, S. N.; WEILER, L. **Can. J. Chem.**, v. 52, p. 2157-2164, 1974.

JONES, G. The Knoevenagel Condensation. **Org. React.**, v. 15, p. 204-599, 1967.

KAYSER, Fritz H. **Medical Microbiology**. New York: Thieme, 2005.

KONEMAN, Elmer W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOHLER, E. P.; CORSON, B. B. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 45, p. 1923, 1975.

KIM, Young-Joo et al. Stercurensin inhibits nuclear factor- κ B-dependent inflammatory signals through attenuation of TAK1-TAB1 complex formation. **Journal of cellular biochemistry**, v. 112, n. 2, p. 548-558, 2011.

LINDSAY, Mark. A. Target discovery, **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 10, p. 831-838, Out. 2003.

LOHRAY, Braj Bhushan et al. Novel tetrahydro-thieno pyridyl oxazolidinone: an antibacterial agent. **Bioorg. & Med. Chem.**, v. 12, n. 17, p. 4557-4564, 2004.

MANO, E. B.; SEABRA, A. P. **Práticas de Química Orgânica**. 3. ed. Edgard Blücher; 2002.

MARCH, J. **Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure**. 4^a ed. New York: Wiley-Interscience publication, 1992.

MARZOCCO, Anita; TORRES, Bayardo Baptista. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MASCARELLO, Alessandra et al. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. **Bioorg. & Med. Chem.**, v. 18, n. 11, p. 3783-3789, 2010.

MCBEE, E. T.; KIM, Y. S.; BRAENDLIN, H. P. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 84, p. 3154, 1962.

MERCK. **Manual MSD para a família**. Portugal, 2010. Disponível em: <<http://www.manuaismsd.pt>>. Acesso em: 09 set. 2016.

MURRAY, Patrick R. et al. **Microbiologia Médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara KOOGAN, 2000.

NOKAMI J.; KATAOKA, K.; SHIRAIISHI, K.; OSAFUNE, M. **J. Org. Chem.** n. 66, 1228-1232, 2001.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. 2000. 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.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. 2002. 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.

PASIN, J.S.M.; FERREIRA, A.P.O.; SARAIVA, A.L.L.; RATZLAFF, V.; ANDRIGHETTO, R. Antipyretic and antioxidant activities of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles in rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 43, p. 1193-1202, 2010.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 4^a ed. New York: Oxford University Press, 2008.

PAZIAN, Gabriela Mantovani; DA SILVA SASS, Zaiara Francis. Resistência bacteriana a antibióticos. **Revista Cesumar-Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**, v. 11, n. 1, p. 157-163, 2007.

PEREIRA, H. S. et al. Inibição seletiva das atividades das enzimas transcriptase reversa do vírus HIV-1 e DNA polimerases humanas por derivados dipirazolo-piridina. **DST j. bras. doenças sex. transm**, v. 8, n. 4, p. 14-8, 1996.

PÉREZ, Caridad Noda et al. Influence of basic properties of Mg, Al-mixed oxides on their catalytic activity in knoevenagel condensation between benzaldehyde and phenylsulfonylacetonitrile. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2341-2346, 2009.

PESSOA, Ilzo Costa. **Perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de amostras de água das escolas estaduais de Boa Vista-RR**. 2011. 101 f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2011.

PINILLA-MONSALVE, Gabriel David et al. Neurotoxicología de plaguicidas prevalentes en la región Andina Colombiana. **Medicas UIS**, Bicaramanga, v. 27, n. 3, p. 57-67, Dec. 2014.

PONTES, Luiz Antônio Eckhardt de. **Prevalência de Staphylococcus spp. resistentes a drogas em humanos, animais a ambiente hospitalar, em comunidades carentes de Campos Dos Goytacazes/ RJ, No Período de 2006-2008**. 2006-2008. 100f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 2009.

QUINN, P. J. et al. **Veterinary Microbiology and Microbial Diseases**. 2. ed. Oxford: Wiley-Blackwell Scienc, 2011.

REDEL, Henry et al. Quantitation and composition of cutaneous microbiota in diabetic and nondiabetic men. **Journal of Infectious Diseases**. v. 207, n. 7, p. 1105-1114, Apr. 2013.

RYAN, K. J., Ray, C.G. Medical microbiology. **McGraw Hill**, v. 4, p. 370, 2004.

ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. Genome comparison analysis of molecular mechanisms of resistance to antibiotics in the Rickettsia genus. **Ann. N. Y. Acad. of Sci.**, v. 1063, n. 1, p. 222-230, 2005.

ROUVEIX, B. Clinical implications of multiple drug resistance efflux pumps of pathogenic bacteria. **J. Anti. Chem.**, v. 59, n. 6, p. 1208-1209, 2007.

SEPUTIENNE, Vaida et al. Tigecycline—how powerful is it in the fight against antibiotic-resistant bacteria. *Medicina (Kaunas)*, v. 46, n. 4, p. 240-248, 2010.

SETTI, E. L.; MICETICH, R.. Modern Drug Design and lead discovery: an overview, **Curr. Med. Chem.**, v. 3, n. 5, p. 317-324, 1996.

SOUZA, Louremi Bianchi Gualda de.; FIGUEIREDO, Beatriz de Barros. Prevalence of Nosocomiais Infections Provoked by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (M.R.S.A.), in the Regional University Hospital of Maringá. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 40, n. 1, p. 31-34, 2008.

TIETZE, L. F.; BEIFUSS, U. In Comprehensive Organic Synthesis. **Pergamon Press.**, v. 2, p. 341-392, 1991.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneum, 2004.

VELOSO, C. O. et al. 23-P-29-Synthesis of fine chemicals intermediates over basic zeolites. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 135, p. 237, 2001.

VERÇOZA, George Leonardo et al. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de novas 4-tiazolidinonas obtidas a partir de formilpiridina tiossemicarbazonas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1405-1410, 2009.

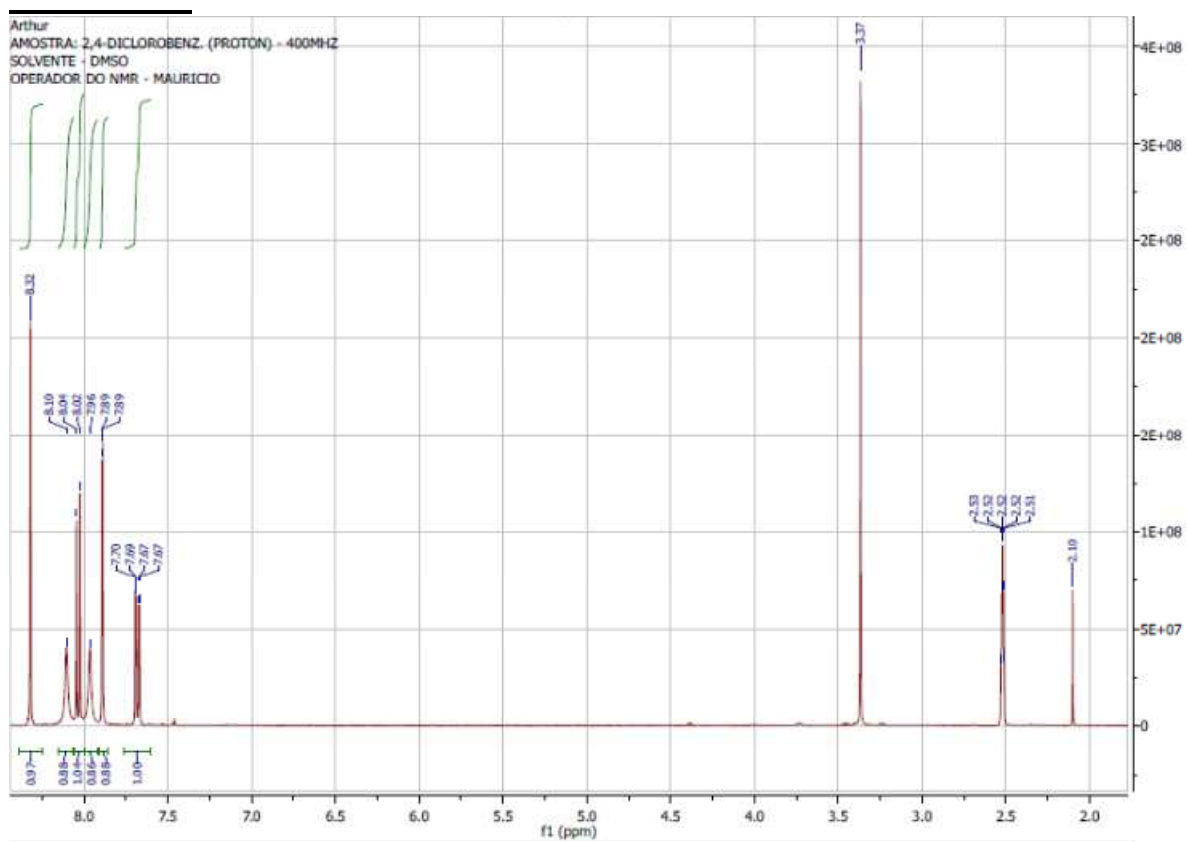
VILLAR, Hugo O.; KOEHLER, Ryan T. Comments on the design of chemical libraries for screening. **Molecular diversity**, v. 5, n. 1, p. 13-24, 2000.

WEITKAMP, Jens; HUNGER, Michael; RYMSA, Ute. Base catalysis on microporous and mesoporous materials: recent progress and perspectives. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 48, n. 1, p. 255-270, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Health, geneve**. <<http://www.who.int>>. Acesso em: 20 set. 2016.

YU, Guixue et al. Substituted pyrazolopyridines as potent and selective PDE5 inhibitors: potential agents for treatment of erectile dysfunction. **Journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1025, 2001.

ZERVOSEN, Astrid et al. Interactions between penicillin-binding proteins (PBPs) and two novel classes of PBP inhibitors, arylalkylidene rhodanines and arylalkylidene iminothiazolidin-4-ones. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 961-969, 2004.

ANEXO A - ESPECTRO DE RMN ^1H DO COMPOSTO EE04

ANEXO B - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DEPT-Q DO COMPOSTO EE04