



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

JAISMARY GONZAGA BATISTA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE NOVOS
COMPOSTOS HÍBRIDOS CONTENDO OS FARMACÓFOROS
SULFONAMIDA E 2-AMINO TIOFENO**

CAMPINA GRANDE – PB

2014

JAISMARY GONZAGA BATISTA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE NOVOS COMPOSTOS
HÍBRIDOS CONTENDO OS FARMACÓFOROS SULFONAMIDA E 2-AMINO
TIOFENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior

CAMPINA GRANDE – PB

2014

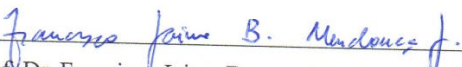
- O48a Oliveira, Jaismary Gonzaga Batista de.
Avaliação do potencial antimicrobiano de novos compostos híbridos contendo os farmacóforos Sulfonamida e 2-Amino Tiofeno [manuscrito] / Jaismary Gonzaga Batista de Oliveira. – 2013.
66 f. : il. color.
- Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2014.
- “Orientação: Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, Coordenação de Biologia.”
1. Microbiologia. 2. Hibridização molecular. 3. Antibióticos.
4. Indústria farmacêutica. I. Título.


JAISMARY GONZAGA BATISTA DE OLIVEIRA


**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE NOVOS COMPOSTOS
HÍBRIDOS CONTENDO OS FARMACÓFOROS SULFONAMIDA E 2-AMINO
TIOFENO**

Aprovado em 27 de 12 de 2013

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior
(Orientador)


Prof. Dr. Ricardo Olímpio Moura


Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo seu amor incondicional, por me mostrar o caminho, nunca me deixando fraquejar, me conduzindo e sendo completamente responsável por o que sou hoje.

A minha família, em especial **meus pais**, por seus inúmeros conselhos, preocupações com minha formação acadêmica e apoio. Sempre me mostrando que o estudo é o bem mais precioso que possuímos. Esse trabalho é a concretização de que a educação que me deram continua a gerar frutos.

Ao meu namorado, **Paulo Eduardo**, pelo afeto, atenção, paciência, e incentivo ao longo de todo esse percurso. Pela participação em diversas situações da minha vida, quem me amparou em momentos de desespero e em especial por compreender minha ausência devido a fase final dessa dissertação.

Ao meu orientador, **Francisco Jaime**, por seus sábios ensinamentos, pela paciência, confiança e incentivo. Sempre disposto e flexível, esse trabalho não seria possível de realização sem o seu apoio e orientação. Sendo sempre um grande exemplo para mim durante todos esses anos de jornada acadêmica.

A todos os estagiários do LSVM que participaram lado a lado dessa caminhada e crescemos juntos dentro do laboratório, sempre compartilhando os erros e acertos. Em especial a **Isley Diniz** pelo companheirismo nas manhãs de laboratório, que gentilmente acompanhou e colaborou com a parte química deste trabalho.

As minhas colegas de classe, laboratório e “teto” **Silvana Cartaxo e Camilla Aquino**, por sempre estarem presentes durante toda trajetória desse mestrado, pelos conselhos, por tantos trabalhos em grupo, dividindo alegrias e angústias, dívidas e caronas para Campina Grande.

As minhas amigas de longa data **Rayssa Marques e Ryldene Marques**, pelos inúmeros momentos inesquecíveis em todos esses 12 anos de amizade. Sendo bem mais que minhas companheiras de laboratório e congressos, mas pessoas que sempre contribuíram para o meu crescimento, apoiando e incentivando umas as outras. Com retribuição especial a **Ryldene Marques** pela colaboração e ensinamentos dos testes biológicos realizados na UFPB.

Ao **Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior** pela colaboração com os testes biológicos realizados na UFPB. Ao **Prof. Dr. Ricardo Olímpio**, pelos ensinamentos, convívio amigo, incentivo, caronas, disponibilidade e contribuições. Ao **Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino** pela parceria, disponibilidade e colaboração com os espectros de RMN 1H, RMN

13C e IV.

A **Sileide Souza** e demais colegas de trabalho da UFPB, em especial a Coordenação de Administração da PRA, pela acolhida, incentivo, flexibilidade e compreensão, tornando possível conciliar a concretização desse trabalho junto às minhas responsabilidades como servidora da instituição.

RESUMO

O aumento dos índices de morbidade e mortalidade ocasionados por infecções bacterianas é um problema de saúde pública, e tem provocado uma reflexão a nível mundial acerca do surgimento de micro-organismos multirresistentes. Parte desse fenômeno deve-se ao uso indiscriminado de antibióticos, que permitiu aos micro-organismos o desenvolvimento de mecanismos de resistência. Por isso, faz-se necessário a constante busca do desenvolvimento de novos fármacos candidatos a agentes antimicrobianos. Uma das estratégias da química medicinal empregadas no desenvolvimento de antimicrobianos é a hibridização molecular, que permite a conjugação de diferentes farmacóforos numa mesma molécula, ampliando o potencial terapêutico das mesmas. Nesse contexto esse trabalho objetivou a avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de novos compostos híbridos sintéticos contendo os farmacóforos sulfonamida e 2-amino-tiofeno. Para tanto, sete novos derivados foram sintetizados em duas etapas reacionais, iniciando pela reação de Gewald (obtenção de 2-amino-tiofenos), seguido pela condensação desses com cloreto de 4-acetamido-benzeno-sulfonila utilizando irradiação de ultrassom 40 kHz. Os compostos foram purificados, caracterizados e tiveram suas estruturas confirmadas através de análise de RMN¹H. Por último foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e suas atividades como modificadores da atividade antibiótica (inibidores putativos da bomba de efluxo), através da técnica de microdiluição, em linhagens de *Staphylococcus aureus* que superexpressam os genes NorA, MrsA e TetK. Os compostos híbridos foram obtidos em até 80 minutos, em rendimentos satisfatórios (40-99%), demonstrando que a irradiação de ultrassom é uma opção viável e adequada. Apesar de nenhum dos compostos apresentarem atividade antibacteriana relevante *in vitro* ($\geq 256 \mu\text{g/mL}$), alguns compostos, como Sulfa 01, Sulfa 02 e Sulfa 04, atuaram como modificadores da atividade antibiótica, provavelmente por inibição de bomba de efluxo, em especial na linhagem SA-1199B (que superexpressa o gene norA) ao reduzir a CIM da Norfloxacina em até 16 vezes (128 para 8 $\mu\text{g/mL}$). Como as sulfonamidas não têm ação inibitória de bombas de efluxo, nossos resultados nos levam a crer que a porção tiofênica é a responsável por essa atividade, sugerindo assim, que os novos compostos hibridizados, quando *in vivo* (visto se tratarem de pró-drogas) poderão agir por dois mecanismos de ação distintos, potencializando suas ações. 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 increased morbidity and mortality caused by bacterial infection is a public health issue and has led a debate about the worldwide emergence of multiresistant microorganisms. Part of this phenomenon is due to the indiscriminate use of antibiotics, which allowed the microorganisms to develop resistance mechanisms. Therefore, it is necessary to constantly seeking to develop new drug candidates to antimicrobial agents. One of medicinal chemistry strategies for the antibiotics development is the molecular hybridization, which allows the combination of different pharmacophores in a single molecule, increasing their therapeutic potential. In this context this study aimed to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of novel synthetic hybrid compounds containing the sulfonamide and 2-amino-thiophene pharmacophores. Thus, seven new derivatives have been synthesized in two reaction steps, starting with the Gewald reaction (obtaining 2-amino-thiophenes), followed by condensation of these with 4-acetamido-benzene sulfonyl chloride using 40 kHz ultrasound irradiation. The compounds were purified, characterized and their structures confirmed by ¹H NMR. Finally we determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) and its activities as modifiers of antibiotic activity (putative efflux pump inhibitors) by microdilution, in *Staphylococcus aureus* strains overexpressing the NorA, MrsA and TetK genes. The hybrid compounds were obtained until 80 minutes in satisfactory yields (40-99%), demonstrating that ultrasound irradiation is a viable and appropriate option. Although none of the compounds showed significant *in vitro* antibacterial activity ($\geq 256\mu\text{g/mL}$), some compounds such as Sulfa 01, 02 and 04 acted as modifiers activity antibiotic, presumably by inhibiting the efflux pump, in particular the strain SA - 1199B (which overexpresses the norA gene) reducing the Norfloxacin CIM up to 16 times (128 to 8 mg / mL). How sulfonamides have no inhibitory action of efflux pumps, our results lead us to believe that thiophene moiety is responsible for this activity, suggesting that the new hybridized compounds when *in vivo* (they refer to prodrugs) may act by two distinct mechanisms of action, potentiating their actions. The results indicate that the new hybrid derivatives are potential candidates for antibiotics prototypes, with great potential to act by a synergistic action mechanism.

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1. RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	14
2.1.1. Mecanismos de Resistência.....	15
2.2. IMPORTÂNCIA DOS DERIVADOS TIOFÊNICOS	18
2.3. IMPORTÂNCIA DAS SULFONAMIDAS.....	21
2.4. HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR	26
3. OBJETIVOS	29
3.1. OBJETIVO GERAL.....	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. METODOLOGIA.....	30
4.1. Parte Química	30
4.1.1. Rota Sintética.....	30
4.1.2. Procedimento experimental padrão de síntese das Sulfas.....	31
4.2. Parte Biológica	31
4.2.1. Linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
4.2.2. Antibióticos	32
4.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos novos compostos e antibióticos padrão	32
4.2.4. Determinação da CIM da Norfloxacina, Tetraciclina e Eritromicina na Ausência e na Presença dos compostos – Avaliação da Atividade Moduladora	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. Parte Química	33
5.2. Parte Biológica	38
6. CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS	45
Apêndice A – Trabalho publicado na Acta Crystallographica Section E	53
Apêndice B– Resumo apresentado ao 6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry	61
ANEXO 01 – RMN ¹H DO COMPOSTO SULFA 01.....	62
ANEXO 02 – RMN ¹H DO COMPOSTO SULFA 02.....	63
ANEXO 03 – RMN ¹H DO COMPOSTO SULFA 03.....	64
ANEXO 04 – RMN ¹H DO COMPOSTO SULFA 04.....	65
ANEXO 05 – RMN ¹H DO COMPOSTO SULFA 08.....	66

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Procedimento padrão para síntese de 2-aminotiofeno.....	20
Esquema 2. Provável mecanismo da reação de Gewald.....	20
Esquema 3. Síntese do Ácido Tetrahidrofólico (THF).....	24
Esquema 4. Produção do PABA através do Corsimato.....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do composto heterocíclico – tiofeno.....	18
Figura 2. Estrutura química da Biotina e Banminth.....	19
Figura 3. As principais classes de agentes farmacológicos desenvolvidos a partir de sulfonamidas (1): antibacterianas, como o sulfatiazol (2); inibidores da anidrase carbônica, como o acetazolamida (3); diuréticos, como o furosemida (4); agentes hipoglicêmicos como a Glibenclamida (5); agente anticâncer como o E7070 (6) que está em fase de estudos clínicos avançados; e agentes anti-Aids, como o inibidor da HIV protease Amprevanir (7).....	22
Figura 4. Similaridade estrutural das Sulfonamidas e do PABA.....	23
Figura 5. Estrutura do ácido tetraidrofólico (THF).....	23
Figura 6. Obtenção da Estramustina através de hibridização molecular.....	27
Figura 7. Estrutura química da tropisetrona.....	16
Figura 8. Rota sintética empregada.....	30
Figura 9. Novos compostos híbridos sintetizados.....	34
Figura 10. Derivados sintetizados por Leitans em 2013.....	35
Figura 11. Derivados sintetizados por Malmström em 2012.....	36
Figura 12. Espectro RMN ¹ H do composto Sulfa 08	37
Figura 13. Estrutura Química do Protonsil e da Sulfanilamida (seu metabolito ativo)	40
Figura 14. Estrutura química do INFF55.....	42
Figura 15. Estrutura química dos compostos sintetizados por Chabert et al. (2007).....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Agentes por quais foi observado resistência.....	14
Tabela 2. Características físico-químicas dos compostos hibridizados.....	34
Tabela 3. Dados dos espectros de RMN ¹ H. (δ em ppm).....	36
Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima dos compostos derivados do tiofeno hibridizados com sulfonamidas frente às linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i>	39
Tabela 5. Atividade Moduladora dos compostos hibridizados.....	40

1. INTRODUÇÃO

O aumento do número de infecções está se tornando um problema mundial, especialmente entre pacientes imunocomprometidos devido à AIDS, transplante de órgãos, quimioterapia e outros procedimentos invasivos. (LIMA-NETO et al., 2012). Esse fenômeno deve-se em grande parte à crescente capacidade de microrganismos patogênicos tornarem-se resistentes aos antibióticos utilizados na terapêutica.

O uso indiscriminado de antibióticos permite que bactérias, vírus, fungos e outros parasitas desenvolvam mecanismos de adaptação e resistência a poderosos antibióticos. Já foram encontrados mecanismos de resistência para cada classe de antibiótico (WERMUTH, 2008) e a busca de novos fármacos eficazes contra várias bactérias multirresistentes é provavelmente um dos desafios mais difíceis da química medicinal para a próxima década. Dessa forma, o desenvolvimento de novas classes de antibióticos ou versões mais potentes das classes é essencial para a terapêutica atual.

Investigadores trabalhando em grupos de pesquisas em universidades (entre eles o LSVM – Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas da UEPB), em indústrias farmacêuticas e em institutos de pesquisa de todo o mundo realizam sínteses orgânicas e testes biológicos, na busca por protótipos de novos fármacos, moléculas que, muitas vezes, podem ser extremamente simples, mas que apresentam potencial ação farmacológica e que podem ser empregadas no tratamento de infecções bacterianas.

Através da química medicinal é possível realizar o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos (protótipos), o estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção das relações entre a estrutura química e a atividade biológica (LIMA, 2007).

Nas últimas décadas, o processo da descoberta de fármacos utilizou e beneficiou-se do advento de novas técnicas, como a hibridização molecular que consiste na conjugação de dois grupos farmacóforos possuidores de atividade biológica já comprovada na literatura, ampliando o potencial terapêutico dos compostos.

Dentre os compostos com potencial antimicrobiano que podem ser explorados como protótipos de novos antibacterianos, estão os tiofenos e as sulfonamidas, os quais já são amplamente relatados na literatura por apresentar essa atividade.

Os derivados 2-amino-tiofênicos apresentam além da simplicidade estrutural e sintética, o que permite que sejam realizadas modificações em sua estrutura, diversas atividades biológicas associadas já descritas na literatura, em especial atividade antibacterianas e antifúngica (Puterová et al, 2009; SIQUEIRA et al., 2010). Como já descrito em trabalhos anteriores realizados no LSVM que demonstraram relevante atividade antifúngica frente a cepas de *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* (LIMA-NETO et al., 2012) (SCOTTI et al., 2012).

As sulfonamidas, por sua vez, possuem estrutura química similar ao ácido *para*-aminobenzóico (PABA), e por consequência são capazes de se ligar à enzima dihidropteroato sintase, inibindo assim a síntese de ácidos nucleicos e de proteínas bacterianas (PATRICK, 2009).

Sabendo-se que entre os fármacos comercializados atualmente cerca de 62% são derivados heterocíclicos e que destes, 28% possuem um átomo de enxofre (WERMUTH, 2008), tiofenos heterocíclicos contendo um átomo de enxofre conjugados com grupamento sulfato são consideradas ainda mais promissoras, e recebem atenção especial neste trabalho. Principalmente devido ao fato de que fragmentos de sulfonamida podem aumentar relevantemente a atividade de agentes antibacterianos contra os microrganismos Gram-positivo e Gram-negativos (KIM et al., 2008),

Com base na importância medicinal de porções de sulfonamida e de tiofeno, relatou-se aqui a síntese de uma nova classe de compostos hibridizados contendo em suas estruturas dois farmacóforos possuidores de atividades antibacterianas (2-amino-tiofenos e sulfonamidas) visando o desenvolvimento de derivados com atividade mais pronunciada, mais seguros, eficazes e com menos efeitos tóxicos.

As estruturas dos compostos sintetizados foram atribuídas com base no IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C e dados de espectro de massa. Estes compostos foram avaliados *in vitro* quanto à sua atividade antimicrobiana, em diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. RESISTÊNCIA BACTERIANA

A partir dos estudos realizados nos anos 1930, foi desencadeado uma nova era para o tratamento de infecções - o desenvolvimento de tratamentos com antibióticos como penicilina, streptomicina, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, vancomicina, cefalosporinas, quinolonas, entre outros (WERMUTH, 2008). E desde então foi observado o surgimento de cepas bacterianas resistentes ao seu mecanismo de ação (Tabela 1).

Tabela 1. Agentes por quais foi observado resistência.

Antibióticos	Introdução	Primeiro caso de resistência descrita
Penicilina G	1943	1943
Streptomicina	1947	1947
Tetraciclina	1952	1952
Meticilina	1960	1961
Ácido Nalidíxico	1964	1966
Gentamicina	1967	1969
Cefotaxima	1981	1981
Linezolida	2000	2000

Em populações de bactérias que são sensíveis aos antibióticos específicos, existem cepas de ocorrência intrinsecamente resistentes a pelo menos, um fármaco (resistência natural).

Segundo Nicole Kemper (2008), a resistência pode ser provocada pela repetida exposição de bactérias a doses sub-letais de antibióticos e que a formação de resistência aos fármacos ocorre através da transferência de genes entre as células bacterianas pertencentes a

diferentes cepas ou mesmo gêneros, durante um processo de recombinação (transferência horizontal de genes).

A resistência de bactérias patogênicas a sulfonamidas (SNs) pode ser devida a alterações estruturais na enzima dihidropteroato sintetase (DHPS), necessária ao metabolismo e reprodução bacteriana, levando a mutações pontuais no gene DHPS (folP) (BARAN et al., 2011). Assim, estas mutações afetam a expressão da enzima DHPS com uma menor afinidade para SNs.

Resistência a SNs também pode ser distribuída por elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, transposons e integrons. Já foram relatados três genes conhecidos que codificam resistência a SNs: sul 1, sul 2 e sul 3 (BARAN et al., 2011). O gene sul 3 foi encontrado em cepas patogênicas de *E. coli* isoladas a partir de porcos. A disseminação de cada gene sul 1 a sul 3 depende do sítio de localização da amostragem e das espécies bacterianas. Entre as Gram-negativas isolados resistentes a SNs, principalmente *E. coli* e *Salmonella sp.*, os genes sul 1 e sul 2 são os mais comumente encontrados com frequências iguais (BYRNE-BAILEY et al., 2009). Espécies bacterianas resistentes, no geral, carregam apenas um destes genes, no entanto, nos últimos anos observou-se o número de patógenos que possuem os três genes (BARAN et al., 2011).

SNs têm mostrado a maior resistência às drogas, quase o dobro como tetraciclina e muitas vezes maior do que outros antibióticos (BARAN et al., 2011). Entre outros fatores, a presença de SNs no meio aumenta a resistência antimicrobiana dos microrganismos levando a um aumento sistemático do número de cepas bacterianas resistentes aos SNs nos últimos anos.

Diante do exposto nota-se que existe uma necessidade crescente para a identificação de novas estruturas e combinações que podem ser utilizadas na concepção de novos, potentes e menos tóxicos agentes antimicrobianos.

2.1.1. Mecanismos de Resistência

Os mecanismos por meio dos quais as bactérias se tornam resistentes são bastante versáteis. Esses mecanismos podem ser agrupados em quatro grupos distintos:

1) Inativação ou modificação da droga, onde as enzimas inativam os antibióticos. Por exemplo, as β -lactamases que hidrolisam os antibióticos da classe dos β -lactâmicos;

2) Modificação do alvo, que ocorre devido a mutações no gene da molécula -alvo do antibiótico, impedindo o reconhecimento do mesmo e conseqüentemente sua ação. Esse mecanismo de resistência é bem verificado em fluoroquinolonas, que têm como alvo duas proteínas da replicação do DNA: topoisomerase e DNA girase;

3) Impermeabilidade da membrana, onde a droga não consegue penetrar eficientemente na célula bacteriana. É o caso da resistência à vancomicina;

4) Bombas de efluxo, que promove a eliminação de agentes antimicrobianos para o meio extracelular mais rápido que a difusão pela membrana plasmática. Logo, a concentração intracelular do agente se mantém insuficiente para bloquear as funções celulares (KÖHLER et al., 1999).

Os dois primeiros mecanismos são específicos para um ou mais antibióticos relacionados, já os dois últimos mecanismos estão geralmente associados à resistência múltipla as drogas (MDR – Multi Drug Resistance) (KÖHLER et al., 1999).

2.1.1.1. Bomba de Efluxo (proteína transportadora)

Bombas de efluxo são proteínas transmembrana envolvidas no transporte de substratos tóxicos, incluindo todas as classes de antibióticos clinicamente relevantes, do interior da célula para o ambiente extracelular, diminuindo a concentração intracelular do substrato antimicrobiano e tornando a célula menos susceptível ao agente. Assim, a proteína de efluxo nas bactérias contribui para a sobrevivência delas no seu habitat (VAN BAMBEKE et al., 2003).

A maior proteína de efluxo MDR caracterizado em *S. aureus* é a NorA, encontrada tanto em linhagens MSSA como MRSA (GIBBONS et al., 2004; PIDDOCK, 2006). O gene *norA* foi o primeiro identificado em *S. aureus*, em 1990. Sua proteína (NorA) transporta diversos substratos, tais como: fluoroquinolonas hidrofílicas (norfloxacin, ciprofloxacina, lomefloxacina e ofloxacina), brometo de etídio, acriflavina, rodamina, centrimida, cloreto de benzalcônio, brometo de tetrafenilfosfônio, clorafenicol, além do alcalóide berberina (NEYFAKH et al., 1993; KAATZ; SEO, 1995). A desativação da proteína NorA fornece o

aumento da susceptibilidade bacteriana de quatro a oito vezes mais para as fluorquinolonas (YAMADA et al., 1997).

Sabe-se atualmente que as bombas de efluxo contribuem para a resistência intrínseca e adquirida aos antibióticos, estimulando o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

2.1.1.2. Agentes Modificadores de Atividade Antibiótica

Os inibidores de resistência, também chamados modificadores de atividade antibiótica ou adjuvantes de antibióticos, são considerados como a alternativa mais apropriada das novas terapias antibacterianas (VAN BAMBEKE et al., 2006). A estratégia dos inibidores pode estar envolvida com antibióticos que são inativados por enzimas, como os bens sucedidos inibidores de β -lactamase e pelo sistema de efluxo.

Os mecanismos pelos quais os inibidores de bomba de efluxo podem atuar não estão claramente compreendidos, mas têm sido propostas algumas formas de ação, como: ligar -se diretamente a um ou mais sítios de ligação na proteína de efluxo, de maneira competitiva ou não-competitiva; apresentar afinidade pelo substrato transportado pela bomba, formando um complexo que poderá não ser mais reconhecido pela bomba de efluxo; interferir no gradiente de próton; interagir com a membrana plasmática modificando a conformação da proteína de efluxo ou inibir a expressão do gene de efluxo. Todos esses mecanismos interferem no efluxo do substrato da bomba. Assim, a aplicação desses inibidores em associação com antibióticos convencionais poderá aumentar a concentração intracelular desses antibióticos, restaurando sua eficiência, além de reduzir o emergente desenvolvimento da resistência bacteriana (LOMOVSKAYA; BOSTIAN, 2006; MARKHAM et al., 1999).

A escassez de inibidores de efluxo efetivos leva a constante procura pela identificação e desenvolvimento de novos inibidores, tanto contra os sistemas de efluxo em microrganismos como em células tumorais resistentes a múltiplas drogas (KAATZ et al., 2003). A procura por novos agentes tem focado os produtos sintéticos como moduladores da atividade antibiótica por bomba de efluxo.

2.2. IMPORTÂNCIA DOS DERIVADOS TIOFÊNICOS

Os compostos orgânicos que contêm os anéis de cinco membros heterocíclicos aromáticos estão largamente distribuídos na natureza e muitas vezes desempenham um papel importante em vários processos bioquímicos. Derivados tiofênicos pertencem a um grupo heterocíclico aromático e, conseqüentemente, eles são fragmento estrutural importante em muitos compostos farmacêuticos e químicos. Como resultado, eles são incorporados em novas entidades químicas por químicos medicinais. (MEOTTI et al., 2003).

Derivados tiofênicos são, sem dúvida, uma das classes mais importantes de heterociclos, visto que algumas moléculas contendo o grupo do tiofeno têm sido relatadas por exibir interessantes propriedades farmacêuticas incluindo antimicrobiana, anticancerígeno, a atividade bacteriostática e fungistática, anti-inflamatório e eficazes cardioprotetores (DESAI et al., 2011).

O tiofeno é um hidrocarboneto cíclico, de fórmula molecular C_4H_4S (Figura 1). Trata-se também de um composto heteroaromático visto que um dos pares de elétrons livres do enxofre tem potencial para participar da ressonância conjuntamente com elétrons π das duplas ligações.

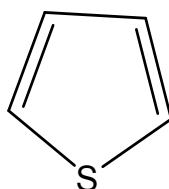


Figura 1. Estrutura do composto heterocíclico - tiofeno

Atualmente, a síntese de compostos contendo átomos de enxofre em sua composição é de grande interesse, tanto pelo seu uso como intermediário sintético como pelo seu potencial biológico.

Benzo[*b*]tiofenos são heterociclos importantes como moléculas biologicamente ativas (FERREIRA et al., 2004). Estudos revelaram que os sistemas de anel de tiofeno ocupam uma posição única no desenho e síntese de novos agentes biologicamente ativos com atividades analgésicas e anti-inflamatória notável, em adição a sua atividade antimicrobiana.

Tiofenos aromáticos participam em parte no metabolismo animal; por exemplo, na Figura 2, Biotina, uma das vitaminas (vitamina H) é um tetrahidro-tiofeno. Enquanto que tiofenos aromáticos ocorrem em algumas plantas, em associação com poliacetilenos com o qual eles estão ligados biogeneticamente e Banminth (Pirantel®), um medicamento antihelmíntico de uso veterinário utilizados em quimioterapia. (AMR et al., 2010).

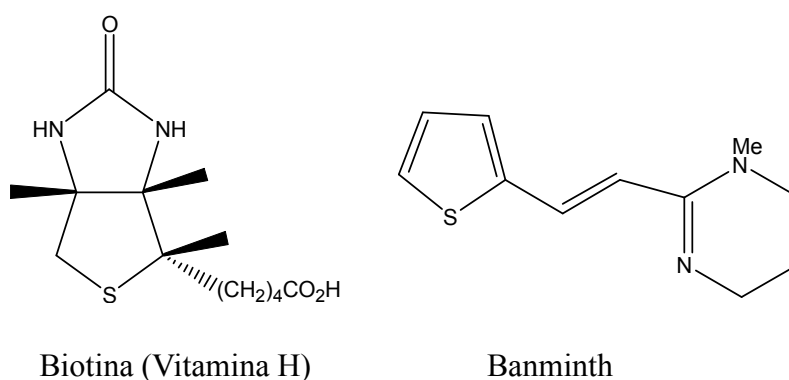
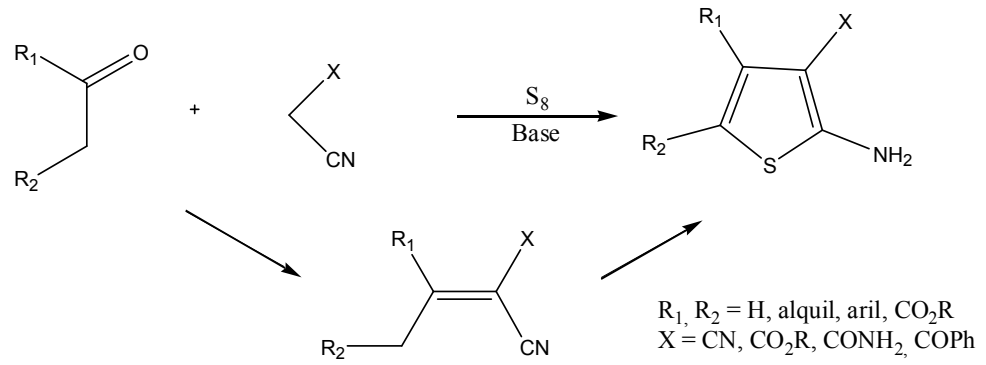


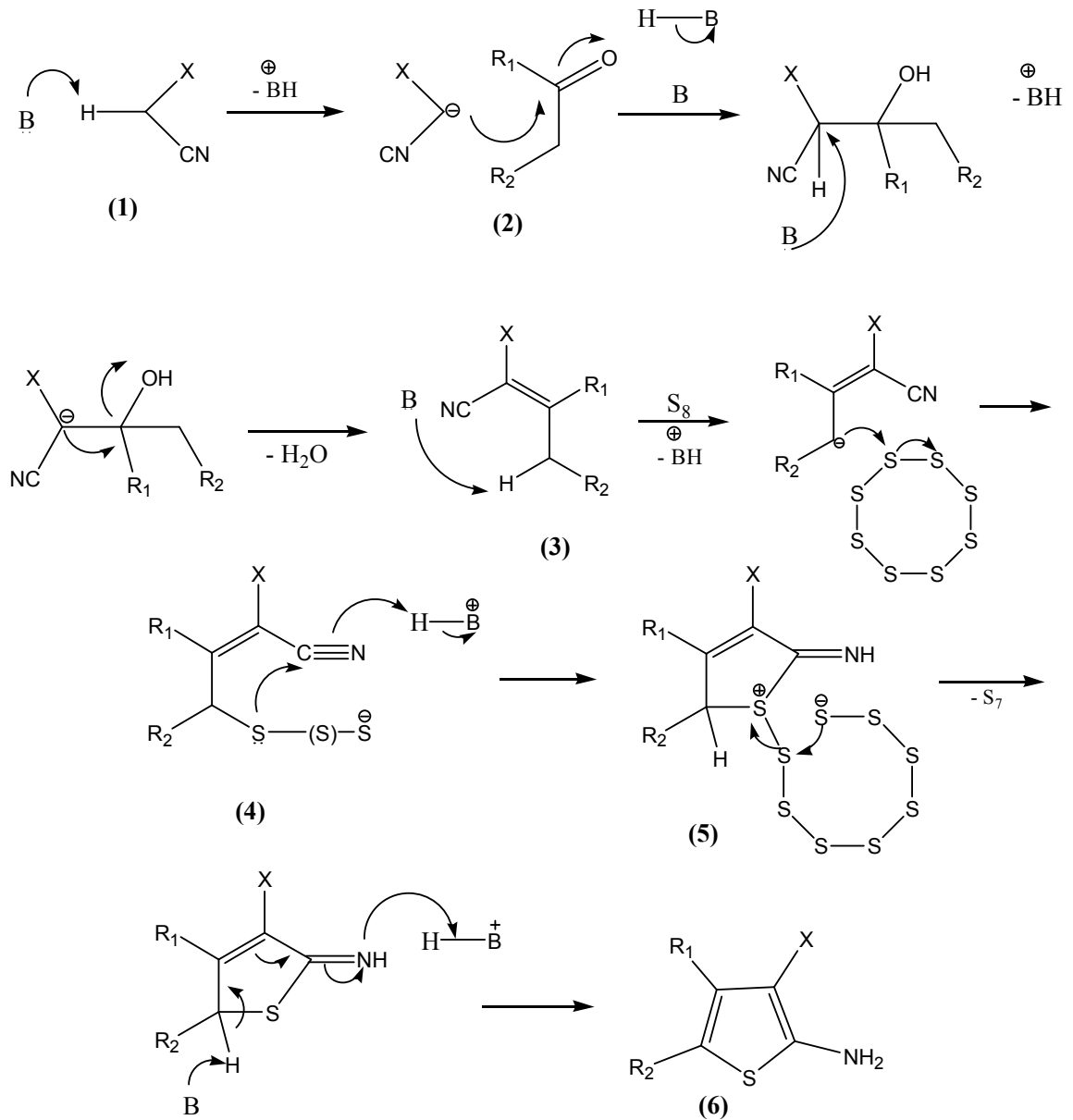
Figura 2. Estrutura química da Biotina e Banminth

Tiofenos possuem um amplo espectro de atividades biológicas conhecidas, vários destes derivados são potentes analgésicos, anticonvulsivante (KULANDASAMYA; ADHIKARI; STABLES, 2009), antidepressivo, anti-inflamatório e antipiréticos, anti-tumoral, anti-câncer de mama (AL-SAIDA et al., 2011), antimalárico (CARIDHA et al., 2010), antiparasitária (ALOMAR et al., 2012), antimicrobiana (LU et al., 2011) (ISLOOR et al., 2010), anti-histamínica (H1), anti-arrítmico e antagonista da serotonina (AMR et al., 2010; AL-SAID et al, 2011). Antiepilépticos ativos atualmente disponíveis (AEDs) como tiagabina, etizolam e brotizolam contém porção tiofeno em suas estruturas como farmacóforo ativo.

Através da clássica reação de Gewald (Esquema 1) é possível a obtenção de 2-aminotiofenos, os quais tem diversas aplicações na química combinatória medicinal. Seus derivados são de grande importância na indústria farmacêutica. Consiste na reação de compostos carbonila (cetonas alifáticas, aldeídos ou compostos de 1,3-dicarbonila) com nitrila ativada e enxofre na presença de uma amina secundária a temperatura ambiente, resultando 2-aminotiofenos (Esquema 1). O mecanismo da reação acredita-se proceder como indicado no Esquema 2.



Esquema 1. Procedimento padrão para síntese de 2-aminotiofenos



Esquema 2. Provável mecanismo da reação de Gewald

O primeiro passo da reação Gewald é uma condensação de Knoevenagel de uma nitrila ativada com um componente cetona ou aldeído para produzir um acrilonitrila, que é então tiolada no grupo γ -metileno com enxofre elementar de acordo com um mecanismo de SNX. O composto sulfurado (4) sofre fecho do anel por meio de ataque nucleofílico, ao mercapteto ciano de carbono para proporcionar o intermediário (5). Finalmente, um rearranjo prototrópico proporciona o 2-aminotiofeno (6).

2.3. IMPORTÂNCIA DAS SULFONAMIDAS

O grupo sulfonamida $-\text{SO}_2\text{NH}-$ está presente em vários compostos biologicamente ativos, que incluem drogas antimicrobianas, saluréticos, inibidores da anidrase carbônica (LEITANS et al., 2013) (WANG et al., 2013), agentes antitireoidianos, medicamentos anti-tumorais, (AL-SAID et al, 2011) e entre outros (Figura 3).

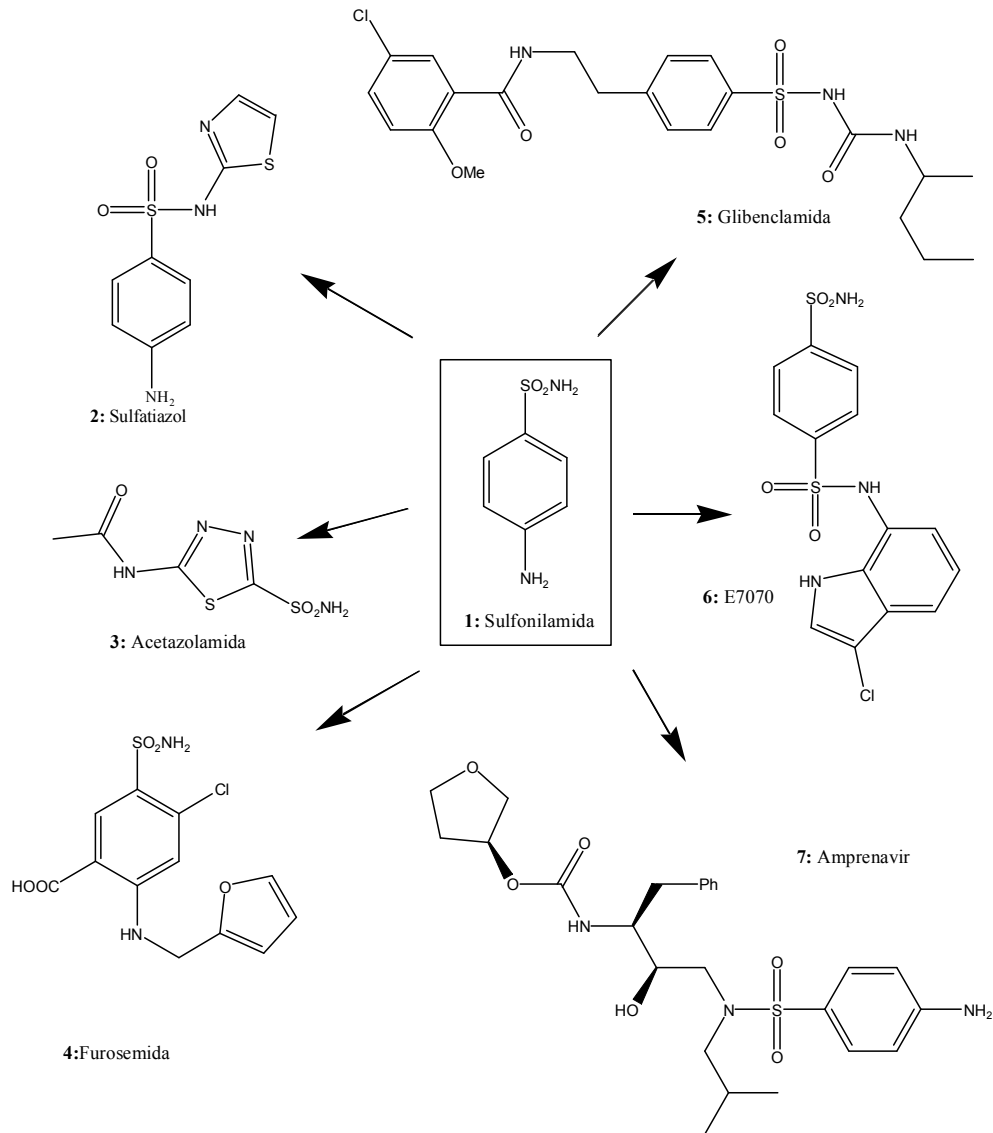


Figura 3. As principais classes de agentes farmacológicos desenvolvidos a partir de sulfonamidas (1): antibacterianas, como o sulfatiazol (2); inibidores da anidrase carbônica, como o acetazolamida (3); diuréticos, como o furosemida (4); agentes hipoglicêmicos como a Glibenclamida (5); agente anticâncer como o E7070 (6) que está em fase de estudos clínicos avançados; e agentes anti-Aids, como o inibidor da HIV protease Amprenavir (7).

Sulfonamidas estão entre os agentes antibacterianos mais utilizados no mundo, principalmente por causa de seu baixo custo, baixa toxicidade e excelente atividade contra doenças bacterianas comuns. A ação sinérgica de sulfonamidas com trimetoprim trouxe enorme ressurgimento do uso de sulfonamidas em todos os lugares ao longo da última década. (OZBEK et al., 2007)

Sulfonamidas agem geralmente como análogos estruturais de ácido 4-aminobenzóico – PABA (Figura 4), constituinte do THF. Estruturalmente, THF consiste de pteridina (derivada de GTP), ácido p-aminobenzóico (PABA) derivada do corismato e uma extremidade poli-glutamil (derivado do glutamato), Figura 5.

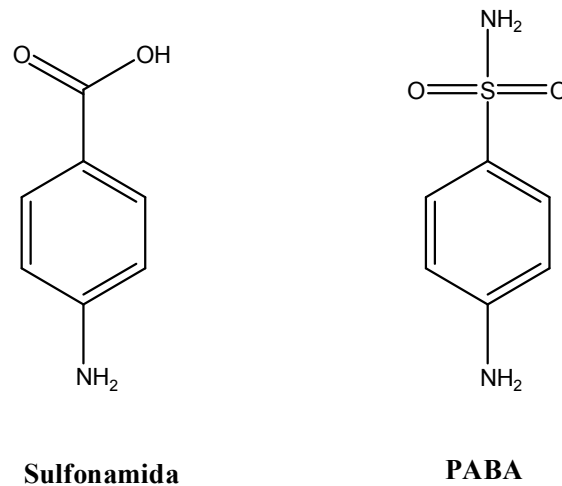


Figura 4. Similaridade estrutural das Sulfonamidas e do PABA

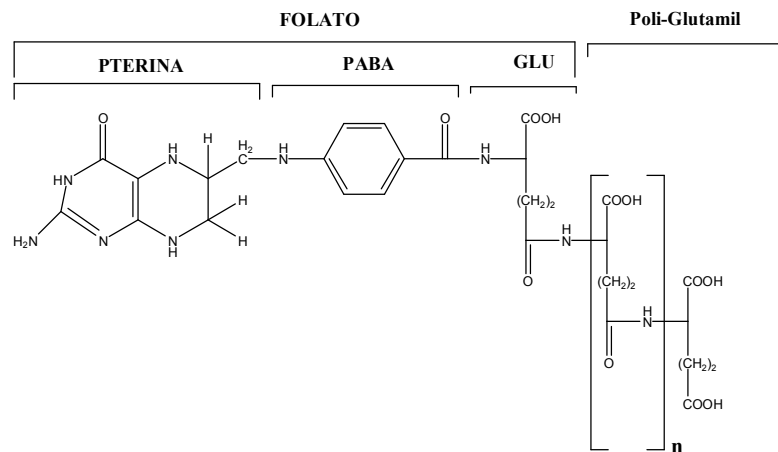
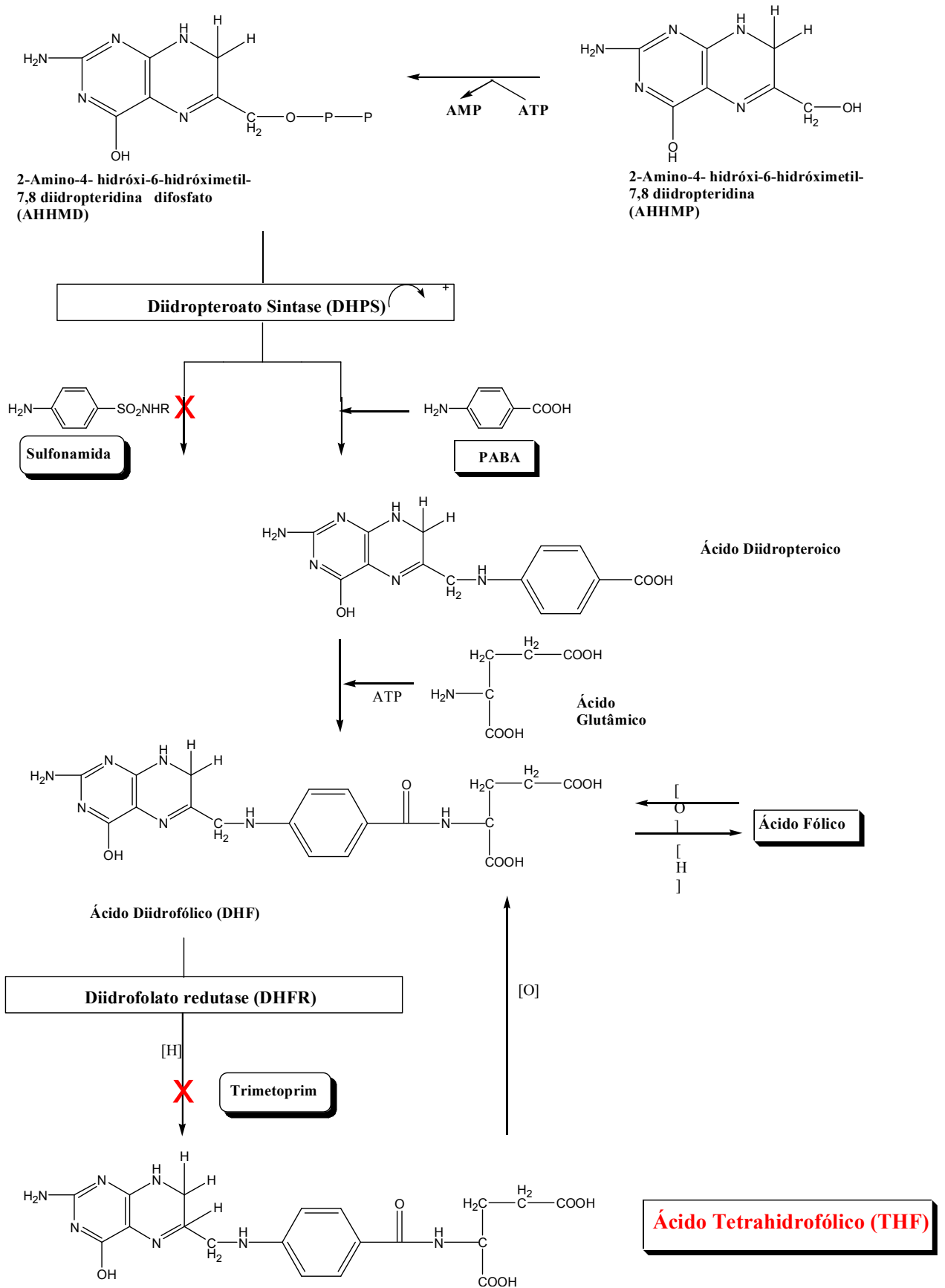


Figura 5. Estrutura do ácido tetrahydrofólico (THF)

Sulfonamidas por serem estruturalmente similares ao ácido 4-aminobenzóico (PABA), portanto, inibem competitivamente a enzima dihidropteroato sintase (DHPS) (Figura 6). Esta enzima catalisa a conversão do PABA para dihidropteroato, precursor da síntese do folato (Esquema 1)



Esquema 3. Síntese do Ácido Tetrahidrofólico (THF).



Figura 6. Estrutura terciária da enzima diidropteroato sintase (PDB id: 1AD1 - *Staphylococcus aureus*). Posição de seu sítio ativo destacados em círculo azul.

O ácido tetrahidrofólico (THF) participa na síntese de ácidos nucleicos que são essenciais para construção do DNA e RNA bacteriano. Por consequência, é possível a inibição da síntese de ácidos nucleicos e de proteínas. SNs também inibem a permeabilidade da parede celular bacteriana através do ácido glutâmico, o qual também é um componente essencial na síntese do ácido fólico (BARAN et al., 2011).

Como as células humanas obtêm o seu ácido fólico da dieta, estas não são afetadas. Ao contrário das células bacterianas, que por serem incapazes de absorvê-lo, apresentam seu crescimento limitado em decorrência da deficiência de THF.

Algumas bactérias do trato intestinal humano, como *E. coli*, produzem PABA através do corismato em duas etapas (Esquema 2). Na primeira etapa, as proteínas PabA e PabB cooperam para substituir o grupo hidroxil do corismato por um grupo amino, resultando o 4-amino-4-deoxi-chorismato (ADC). Na segunda etapa, ocorre a eliminação do piruvato e aromatização do anel do ADC, catalizado pelo ADC lyase (PabC) (WEGKAMP et al., 2007).

potencializar suas ações (BOURGUIGNON, 1996). Para realização dessa estratégia de hibridização, os químicos medicinais tem uma grande preferência pelos compostos heterociclos, seja devido às grande possibilidade sintéticas desses compostos, seja pelo grande potencial terapêutico que apresentam tanto medicinais como agroquímicos.

Como no caso da Estramustina (Figura 6), conhecido antineoplásico utilizado na quimioterapia como opção de tratamento de câncer de próstata. A Estramustina é obtido através da conensação de um derivado de estrogênio (especificamente, o estradiol) com uma mostarda nitrogenada atuando como anti-mitótico (WERMUTH et al., 2008).

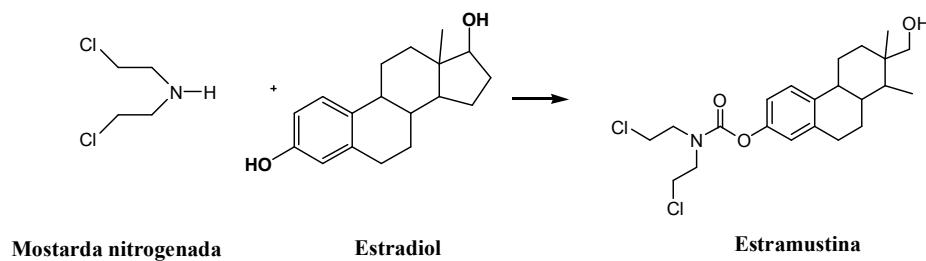


Figura 6. Obtenção da Estramustina através de hibridização molecular

A tropisetrona (Figura 7) também foi planejada a partir da hibridação molecular entre os protótipos cocaína e serotonina, desenvolvida em 1983 pelo laboratório Sandoz. Esta hibridação molecular incluiu na nova substância o núcleo indólico da serotonina com o sistema bicíclico-octano do alcaloide tropânico da cocaína, mantendo a função éster presente na cocaína. Utilizada principalmente como um anti-emético para tratar náusea e vômitos decorrentes de quimioterapia, embora já venha sendo utilizada experimentalmente como um analgésico em casos de fibromialgia (WERMUTH et al., 2008).

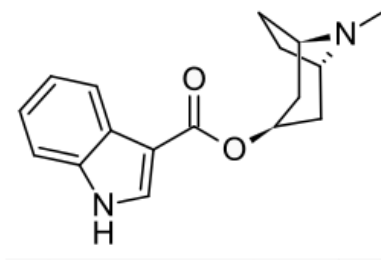


Figura 7. Estrutura química da tropisetrona

Levando em consideração os fatos acima mencionados e, em continuação do interesse na síntese de heterociclos contendo porção tiofênica e sulfonamida, para identificar novos candidatos que podem ser potentes agentes antimicrobianos, seletivos e menos tóxicos, neste trabalho foi feita a síntese e avaliação de compostos incorporando tanto a porção sulfonamida quanto tiofeno.

Esta combinação foi racionalizada de modo a incluir dois farmacóforos responsáveis por atividade antimicrobiana já comprovada, a fim de investigar a influência de hibridação e variação na estrutura das atividades biológicas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar novos derivados sintéticos contendo uma porção 2-amino-tiofênica associada a uma porção sulfonamida potenciais inibidores da enzima dihidropteroato sintase e determinar a atividade antibacteriana *in vitro*, frente a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Promover a síntese química de novos derivados hibridizados contendo uma porção 2-amino-tiofeno associada a uma porção sulfonamida.
- Determinar as propriedades físico-químicas, rendimentos e realizar a comprovação estrutural dos novos compostos sintetizados;
- Determinar o espectro de ação antimicrobiana *in vitro* dos novos compostos sintetizados frente a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, com determinação das concentrações mínima inibitória (CMI).
- Determinar a atividade moduladora dos compostos sintetizados em cepas de *S. aureus* que super-expressam genes de bombas de efluxo.

4. METODOLOGIA

4.1. Parte Química

4.1.1. Rota Sintética

A rota sintética empregada visando a obtenção dos novos compostos híbridos contendo uma porção tiofeno e uma porção sulfonamida é apresentado na Figura 8.

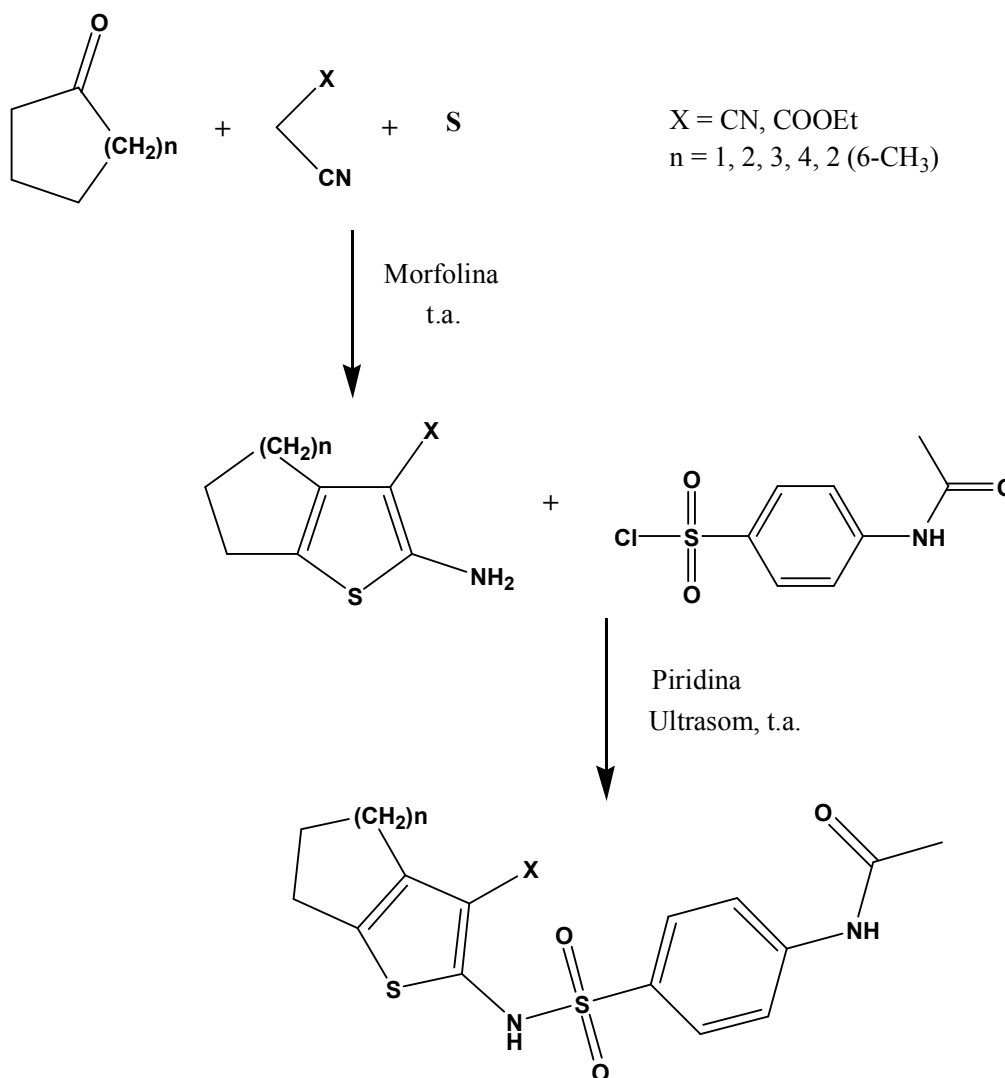


Figura 8. Rota sintética empregada

A síntese foi composta por duas reações amplamente descritas na literatura. Primeiro foi utilizada a clássica reação de Gewald (GEWALD et al., 1966), visando a obtenção dos

compostos de partida 2-amino-tiofenos, que se trata de uma rota convergente, que utiliza condições brandas, reagentes de baixo custo, e resulta nos compostos desejados em bons rendimentos (CHAKRABARTI et al., 1993; CALLIGARO et al., 1997). Posteriormente, esses adutos de Gewald foram condensados ao cloreto de 4-acetamidobenzeno-sufonila através de uma reação de *N*-sulfonilação em meio básico, sob irradiação em banho de ultrassom 40kHz, fornecendo 7 compostos finais, as **Sulfas 1-4, 6, 7-9**.

4.1.2. Procedimento experimental padrão de síntese dos compostos híbridos.

Em um schlenk foram adicionados 1 equivalente do aducto de Gewald (derivado 2-amino-tiofeno) e 1,5 equivalentes de cloreto de 4-acetamido-benzeno-sulfonila. O ar foi retirado do meio reacional, e foram adicionados 3mL de piridina anidra ao meio reacional com auxílio de uma seringa. O frasco foi colocado no banho de ultrassom (40kHz) e foi ajustado o tempo de irradiação (30 a 80 minutos). Após constatação do término da reação, através de cromatografia em camada delgada, a solução reacional foi neutralizada com adição de ácido clorídrico 1M, até pH 5,0. Foram adicionado 30 mL de diclorometano, e fase orgânica foi lavada 5 x com solução saturada de sulfato de cobre, 2 x com Bicarbonato de sódio 10% e 2 x com água destilada. A fase orgânica foi seca sob cloreto de cálcio e concentrada sob pressão reduzida até a secura. O resíduo sólido obtido foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica, utilizando como solventes um gradiente de concentração de diclorometano/metanol. Apenas para a **Sulfa 01** não foi necessário a etapa de purificação com coluna cromatográfica, visto que durante o processo de extração e lavagem do meio reacional, o produto desejado, precipitou e estava em elevado grau de pureza.

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*): 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 eritomicina (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 $\frac{1}{2}$) (SMITH et al., 2005). 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 putativos 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). Para a melhor visualização do crescimento bacteriano após 24hs, foi feito uso da solução

(0,01%) do indicador resazurina (Sigma-Aldrich).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Parte Química

Os compostos utilizados como produto de partida para a síntese destes novos compostos, os aductos de Gewald já se encontram amplamente descritos na literatura, e tiveram sua síntese realizada através dos procedimentos padrões utilizando meio etanólico e morfolina como base (GEWALD, 1965) (GEWALD, K. et al., 1966).

A partir da reação de condensação dos aductos 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-il-sulfamoil)-fenil]-acetamida; **Sulfa 02** - *N*-[4-(3-Ciano-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofen-2-il-sulfamoil)-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-il-sulfamoil)-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-il-sulfamoil)-fenil]-acetamida; e **Sulfa 09** - *N*-[4-(3-Ciano-6-metil-4,5,6,7-tetraidro-benzo[*b*]tiofen-2-il-sulfamoil)-fenil]-acetamida (Figura 9);

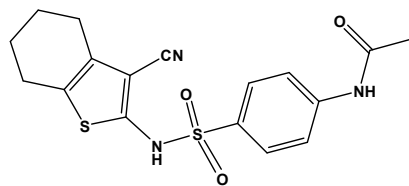
Os resultados obtidos com as etapas sintéticas foram satisfatórios, uma vez que os compostos foram obtidos em rendimentos de bons a moderados variando de 40% a 99% (Tabela 2), mostrando que o uso de irradiação de ultrassom é uma opção viável. Observou-se também que não houve uma coloração característica dos compostos, tendo estes apresentado aparência coloração amarela a marrom e cinza.

Os resultados referentes aos rendimentos e características físico-químicas dos compostos sintetizados encontram-se apresentados na Tabela 2.

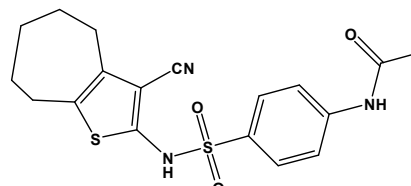
Tabela 2 – Características físico-químicas dos compostos hibridizados

COMPOSTOS	APARÊNCIA	P.F. (°C)	R _f	F.M.	M.M.	REND. (%)
SULFA 01	Amarelo claro	200 - 203	0,52	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃ S ₂	375	99
SULFA 02	Amarelo escuro	227 - 231	0,62	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₃ S ₂	389	72
SULFA 03	Marrom	233 - 236	0,57	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₅ S ₂	422	40,5
SULFA 04	Cinza	235 - 239	0,67	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₃ S ₂	361	56,5
SULFA 06	Laranja claro	230 - 232	0,56	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₅ S ₂	436	61
SULFA 08	Marrom	238 - 240	0,53	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₃ S ₂	403	40
SULFA 09	Laranja escuro	237 - 242	0,68	C ₁₈ H ₁₈ N ₃ O ₃ S ₂	388	85

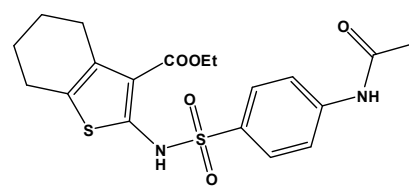
P.F. – Ponto de fusão, R_f – Fator de retenção, calculado em sistema de eluição hex/AcOEt (3:7), F.M. – Fórmula molecular, M.M. – massa molecular



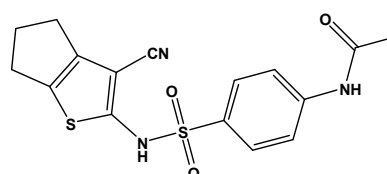
SULFA 01



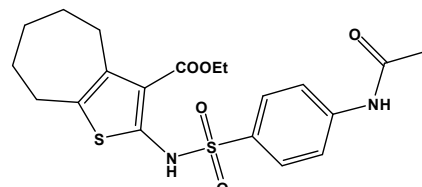
SULFA 02



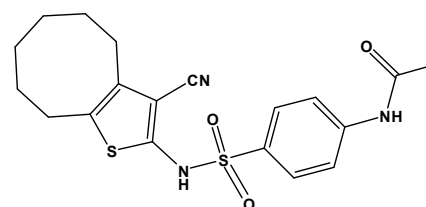
SULFA 03



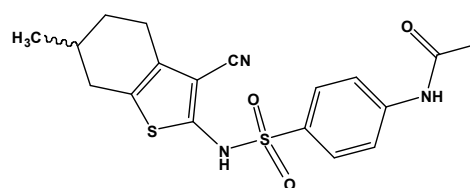
SULFA 04



SULFA 06



SULFA 08



SULFA 09

Figura 9. Novos compostos híbridos sintetizados

A faixa de fusão dos compostos, conforme a Tabela 2 foi pequena, oscilando entre 3°C a 5°C, indicando um aceitável grau de pureza.

As reações tiveram duração mínima de trinta minutos (Sulfa 01, 02, 03, 04, 06 e 09) a 80 minutos (Sulfa 08).

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; HEROPOULOS, 2013). A origem desta energia encontra-se no fenômeno de cavitação que envolve a formação sequencial, 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 (ILIES et al., 2000; MASAKI et al., 2003; CHAN et al., 2004; INNOCENTI et al., 2005; CARIDHA et al., 2010). Leitans et al. (2013) obtiveram tiofenos-sulfonamidas acoplados a triazóis em rendimento variando entre 54% e 96% (Figura 10).

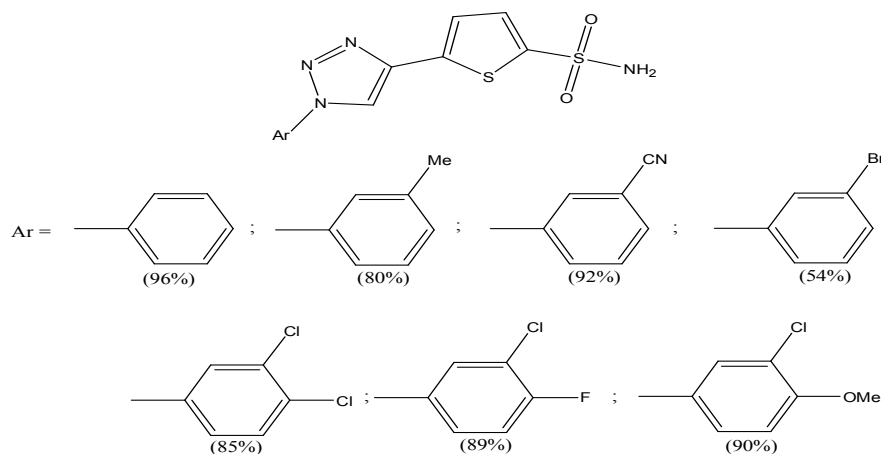
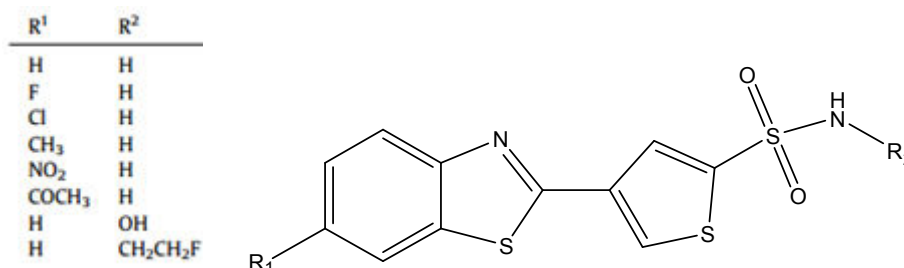


Figura 10. Derivados sintetizados por Leitans em 2013

Malmström et al. (2012) sintetizaram uma série de derivados 4-(1,3-Benzotiazol-2-il)tiofeno-2-sulfonamida (Figura 11), em rendimentos equiparados aos nossos, variando de 47% a 91%.

**Figura 11.** Derivados sintetizados por Malmström em 2012

Após sintetizados e purificados por coluna cromatografia, as estruturas químicas foram comprovadas através dos espectros de RMN ¹H. Os dados referentes à caracterização dos compostos sintetizados encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Dados dos espectros de RMN ¹H 400MHz. (δ em ppm)

	H-Aromáticos	COCH ₃	NH	Ciclo-tiofenos	COOEt
SULFA 01^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)	-
SULFA 02^a	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)	-
SULFA 03^a	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)
SULFA 04^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)	-
SULFA 08^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)	-

^a - CDCl₃, ^b - DMSO

Na Figura 12, representa a cópia do espectro de RMN ¹H do composto **Sulfa 08**, onde podem ser evidenciados com clareza e de maneira inequívoca a estrutura do composto planejado. Os espectros de RMN ¹H referentes aos demais compostos de RMN ¹H encontram-se em anexo.

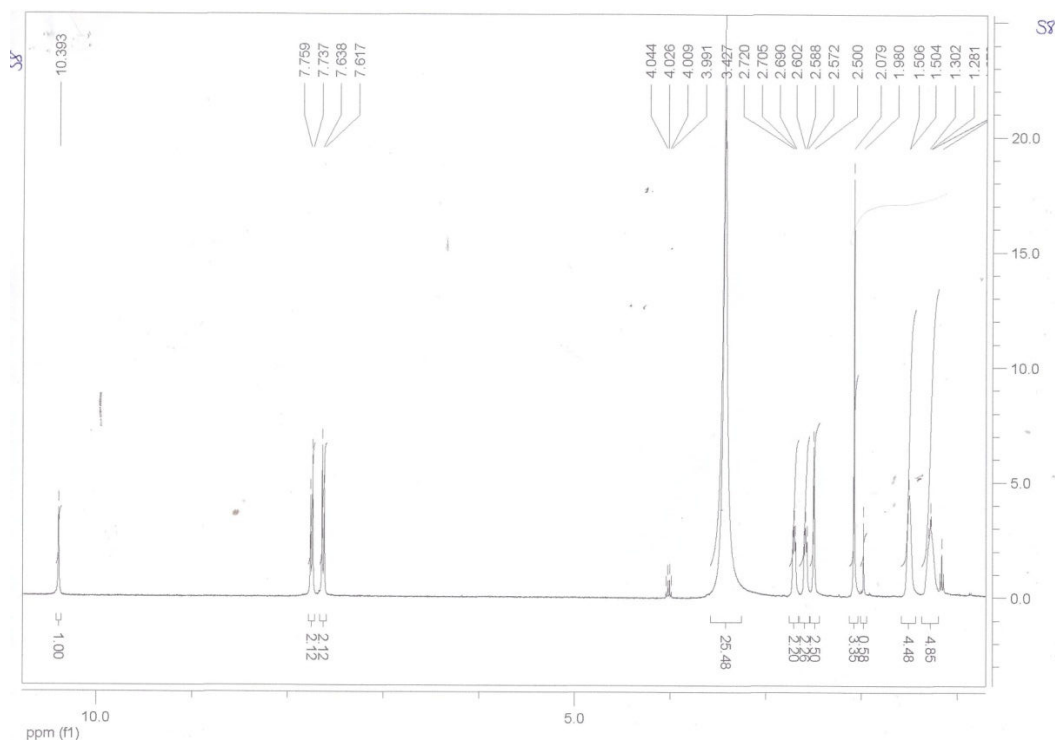


Figura 12. Espectro RMN ¹H do composto **Sulfa 08**

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica em que por utilização de campos magnéticos e radio-frequência é possível se diferenciar os átomos de uma molécula. No caso de RMN de hidrogênio, é possível determinar a quantidade e a localização dos hidrogênios de um dado composto.

Dessa forma, e para o estudo dos compostos químicos sintetizados nesse trabalho, a interpretação do espectro de RMN ¹H proporciona riqueza de informação necessária para caracterização destas moléculas.

Segundo Silverstein (2000), a região situada entre δ 2,0 e 5,0 ppm é característica dos deslocamentos químicos de hidrogênios alifáticos, e todos os hidrogênios dos anéis cicloalquiltiofênicos dos compostos foram encontrados dentro dessa faixa (ou melhor entre 1,27 e 2,88 ppm). Todos os hidrogênio aromáticos, também foram encontrados em suas regiões específicas, entre δ 6,0 e 9,0 ppm.

Devido às aminas e amidas estarem sujeitas à formação de ligação de hidrogênio, a

posição do sinal pode oscilar a depender da concentração, do solvente e da temperatura. O sinal de NH das amidas é observado entre $\sim \delta$ 8,5 e 10,0. Enquanto que as aminas aromáticas absorvem entre $\sim \delta$ 5,0 e 3,0. Ambos sinais de NH foram observados dentro de suas regiões características.

O radical metila da acetamida, apareceu em todos os compostos sob a forma de singletos intensos, integrando para 3 hidrogênios, na região entre 2,07 e 2,20 ppm. O éster etílico na posição 3 da **Sulfa 03**, também se mostrou da forma esperada, se mostrando como um tripleto integrando para 3 hidrogênios (CH₃) em 1,32 ppm, acoplado a quarteto integrando para 2 hidrogênio (CH₂) em 4,25 ppm.

Apesar dos compostos não estarem completamente caracterizados (faltarem espectros de RMN¹³C, IV e espectro de massas, além dos RMN¹H da **Sulfa 06** e da **Sulfa 09**), os dados de RMN¹H são suficientes para afirmar que os compostos híbridos planejados foram obtidos com sucesso.

5.2. Parte Biológica

Foram realizados primeiramente experimentos para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos novos compostos derivados do tiofeno hibridizados com sulfonamidas (Tabela 4) frente às linhagens de *Staphylococcus aureus*.

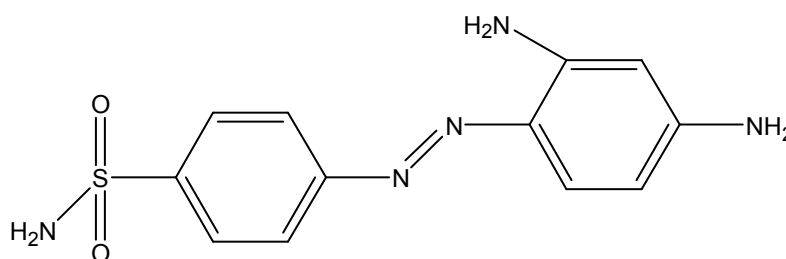
Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima dos compostos derivados do tiofeno hibridizados com sulfonamidas frente às linhagens de *Staphylococcus aureus*.

CIM ($\mu\text{g/ mL}$) /Linhagens Bacterianas

Compostos Hibridizados		RN-4220 (MrsA)	IS-58 (TerK)	SA-1199B (NorA)
Sulfas	01	>256	>256	>256
	02	>256	>256	>256
	03	256	256	256
	04	>256	>256	>256
	06	>256	>256	>256
	08	>256	>256	>256
	09	>256	>256	>256

Para as três linhagens de *Staphylococcus aureus* utilizadas, os valores das CIM para os compostos hibridizados não foram significativas (>256 µg/mL), ou seja, os compostos não foram capazes de promover a inibição do crescimento das cepas analisadas.

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*. Essa característica também é observada em outras sulfas, a exemplo do Prontosil (Figura 11) (CZEIZELA et al., 2001) que foi o primeiro medicamento eficaz contra infecções bacterianas (descoberto em 1932), que apenas era ativo quando administrativo em seres vivos. Da mesma forma que em nossos resultados, anos mais tarde, foi descoberto que o Protonzil sofre metabolismo enzimático e o verdadeiro agente bacteriano é seu metabólito: a sulfanilamida (Figura 13), obtida após hidrólise e desproteção do grupamento amino (CORRÊA, 2006).



Protonsil

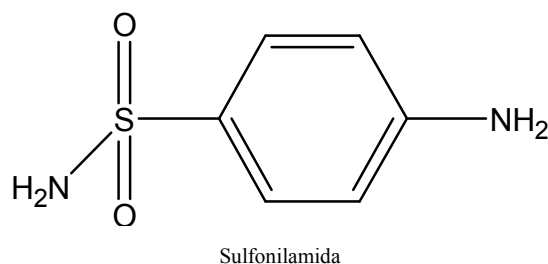


Figura 13. Estrutura Química do Protosnil e da Sulfanilamida (seu metabolito ativo)

Em seguida, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas dos antibióticos (eritromicina, tetraciclina e norfloxacina) usando-se concentrações crescentes e dobradas (4µg/mL até 256 µg/mL) na ausência, bem como, na presença dos compostos heterocíclicos ($\leq \frac{1}{4}$ da CIM) (Tabela 5). 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).

Tabela 5. Atividade Moduladora dos compostos hibridizados

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

*Os antibióticos Eritromicina, Tetraciclina e Norfloxacina foram avaliados respectivamente frente as linhagens RN-4220, IS-58 e SA-1199B

Foram utilizadas linhagens de *Staphylococcus aureus* RN-4220 que possui o plasmídeo pUL5054, o qual, carrega o gene que codifica a proteína para efluxo de macrolídeos (MrsA). IS-58, que possui o gene que codifica a proteína TetK para efluxo de tetraciclina e SA-1199B, que superexpressa o gene norA que codifica a proteína de efluxoNorA, responsável pelo efluxo de fluorquinolonas e outras substâncias.

Como podem ser observados na Tabela 5, os resultados relevantes foram obtidos dos compostos hibridizados com radical 3-nitrila (Sulfas **01**, **02** e **04**) os quais se observou uma modulação com redução da CIM da norfloxacin em até 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. Poucos compostos tem sido relatados como inibidores da resistência a tetraciclina, como o 13-CPTC (HIRATA et al., 1998), o Ro 07-3149 (HIRATA et al., 1997), e recentemente a baicaleína (5,6,7 trihidroxiflavona) (FUJITA et al., 2005), sendo todos reportados como inibidores de TetK.

No efluxo contínuo do antibiótico, os genes mutantes superexpressam proteínas transportadoras de membrana responsáveis pela entrada e saída de substâncias no meio citoplasmático, fazendo com que a retirada do antibiótico para o meio extracelular seja mais rápida que a sua difusão pela membrana bacteriana, mantendo uma concentração insuficiente para atuar como bloqueador de funções celulares (SILVEIRA et al., 2006).

Esta atividade pode ser relacionada com a lipofilicidade dos compostos, característica comum de vários inibidores putativos de bomba de efluxo (Gibbons et al, 2004). A lipofilicidade do composto é importante para a sua solubilidade na membrana bacteriana e a ligação às proteínas de efluxo, bem como ligação com os substratos da bomba (ZLOH et al., 2004), acarretando na inibição da remoção da droga. Outros meios de inibição da bomba de efluxo não podem ser descartados, como um efeito sobre a transcrição/tradução da proteína de efluxo (SMITH et al., 2007).

A ausência de uma atividade significativa da Sulfa **08** sobre os valores da CIM de norfloxacin pode estar relacionada, ao menos em parte, a sua grande hidrofobicidade (superior aos valores das Sulfas **01**, **02** e **04** que reduziram a CIM em até 16 vezes para a

linhagem AS-1199B (NorA)), visto que esse composto entre os testados, é o que apresenta mais valor de LogP, fator este que pode reduzir o reconhecimento e transporte pela bomba de efluxo (PIDDOCK et al., 2001; GIBBONS et al. 2003).

Resultado semelhante foi observado por Ambrus et al. (2008), que após uma análise teórica COMFA (3D-QSAR), foi sugerido que a substituição do grupo 5-nitro-indol do INF55 (Figura 14) por outros substituintes poderia ser favorável para a inibição da proteína de efluxo NorA. Ambrus et al. (2008) concluiu que a substituição do grupo 5-nitro por um grupo nitrila leva à atividade de inibição de efluxo semelhante ao INF55.

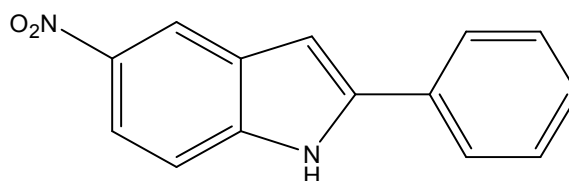


Figura 14. Estrutura química do INF55

O INF55 (Figura 12), apesar de ser uma estrutura muito simples, foi ativa como inibidor de bomba de efluxo em concentrações inferiores a 5 µg/ mL. Além disso, diminuiu significativamente o IC₅₀ da ciprofloxacina contra *Staphylococcus aureus* SA-1199 em concentrações de oito vezes menor que reserpina (CHABERT et al., 2007).

Chabert et al. (2007), sintetizaram uma série de derivados arilbenzo[*b*]tiofenos, tiofenos e benzofuranos (Figura 15) cuja atividade foi observada em concentração duas vezes menor que a reserpina. Compostos foram eficientes com CIM de 10 a 20 µg/ mL.

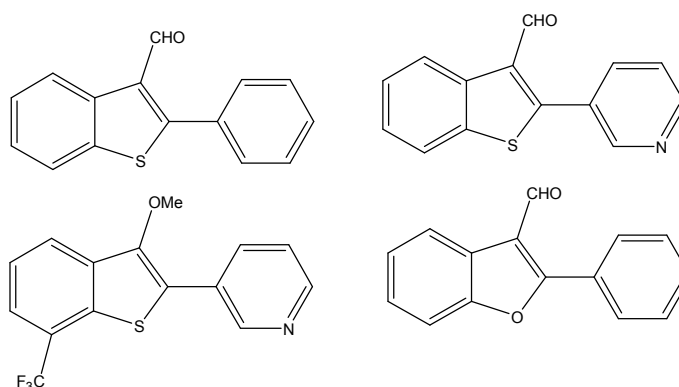


Figura 15. Estrutura química dos compostos sintetizados por Chabert et al. (2007)

A diminuição da atividade moduladora das sulfas **03** e **06**, ambos compostos ciclohexa e cicloheptano com radicais do grupo éster, também foi relatada por Ambrus et al. (2008), onde a substituição do 5-C INF5 por grupos carbonila retiradores de elétrons (CO₂Me e CO₂H) eliminaram todas as atividades, bem como a substituição por grupos ácidos sulfônicos, ésteres e amidas em C-5 (SO₃H, SO₂NH₂ e SO₂OCH₃).

Diante do exposto, fica claro que a porção sulfa acetilada não colabora para atividade bacteriana *in vitro*, como já observado por outros autores (AMBRUS et al., 2008), nos levando a concluir desta forma que a porção tiofênica está sendo responsável pela possível inibição da bomba de efluxo. Sugerindo que os compostos hibridizados podem agir por dois mecanismos de ação quando *in vivo*. A porção que possui a sulfonamida inibindo a enzima diidropteroato sintase e a porção tiofênica contribuindo para a inibição da bomba de efluxo.

A aplicação de combinações de antibióticos de ação sinérgica já vem sendo adotada há anos. Várias sulfonamidas já são comumente combinadas com trimetoprim e utilizadas na terapêutica atual. O Trimetoprim é frequentemente co-administrado com a sulfametoxazol tendo em vista que eles agem sinergicamente no bloqueio da síntese de folato em bactérias (CZEIZELA et al., 2001; LE-MINH; STUETZ; KHAN, 2012; ZHI-GANG et al., 2012).

Outro exemplo é a clássica combinação clavulanato-amoxicilina (Clavulin®), ainda hoje uma arma eficiente contra grande parte das infecções bacterianas adquiridas em comunidade (SILVEIRA et al., 2006).

Neste sentido, relevamos a atenção que deve ser dispensada ao desenvolvimento de substâncias com ações sinérgicas e que possivelmente podem atuar através de dois mecanismos de ações distintos, agindo como moléculas duais. Promovendo uma ação antibacteriana mais eficaz (contribuindo para diminuição da concentração do antibacteriano necessária), ou ainda fazendo com que microorganismos resistentes a um determinado antibiótico voltem a ser sensíveis aumentando o tempo de vida útil dos antibióticos já disponíveis.

6. CONCLUSÕES

Sete compostos híbridos contendo os farmacóforos 2-amino-tiofeno e sulfonamida foram sintetizados em rendimentos satisfatórios (40-99%), mostrando que o emprego da energia do ultrassom, é um método rápido, viável e adequado para obtenção de sulfonamidas.

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 ¹H, que foram aptos a confirmar as estruturas inicialmente propostas.

Observa-se que os compostos hibridizados não apresentam atividade antibacteriana relevante *in vitro*, porém são possuidores de relevante atividade moduladora agindo como potenciais inibidores putativos 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 AS-1199B (NorA)), indicando que esses derivados 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.

Como as sulfonamidas não possuem atividade inibidora de bombas de efluxo, nossos resultados nos levam a acreditar que a porção tiofênica é a parte responsável por essa atividade. Sugerindo assim, que os novos compostos hibridizados, quando *in vivo*, poderão agir por dois mecanismos de ação distintos. A porção sulfonamida inibindo a enzima diidropteroato sintase e a porção tiofênica inibindo a bomba de efluxo atuando, portanto de maneira sinérgica, e caracterizando o sucesso da hibridização.

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) serão conduzidos para comprovação dessas hipóteses e avaliação mais aprofundada do potencial antimicrobiano desses derivados híbridos.

REFERÊNCIAS

ALOMAR, Kusaï et al. Synthesis, crystal structure, characterisation, and antifungal activity of 3-thiophene aldehyde semicarbazone (3STCH), 2,3-thiophene dicarboxaldehyde bis(semicarbazone) (2,3BSTCH₂) 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, n. 46, p.137-141, 2011.

AMBRUS, Joseph I. et al. Structure–activity relationships of 2-aryl-1H-indole inhibitors of the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Boston, n. 18, p.4294-4297, 2008.

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, n. 45, p.5935-5942, 2010.

BARAN, Wojciech et al. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. **Journal Of Hazardous Materials**, Poland, n. 196, p.1-15, 2011.

BOURGUIGNON, J.J.; In *The Practice of Medicinal Chemistry*; WERMUTH, CG. Ed.; Academic Press, NY, 1996; p 281.

CALLIGARO, D.O.; FAIRHURST, J.; HOTTEN, T.M.; MOORE, N.A.; TUPPER, D.E. The Synthesis And Biological Activity Of Some Known And Putative Metabolites Of The Atypical Antipsychotic Agent Olanzapine (Ly170053). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 7, n. 1, pp. 25-30, 1997.

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.

CHABERT, Je're'mie Fournier Dit et al. Synthesis and evaluation of new arylbenzo[b]thiophene and diarylthiophene derivatives as inhibitors of the NorA multidrug

transporter of *Staphylococcus aureus*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, France, n. 15, p.4482-4497, 2007.

CHAKRABARTI, J.K.; HOTTEN, T.M.; TUPPER, D.E. 2-Methyl-thieno-benzodiazepine. **US Patent** n° 5,229,382; 20 de julho de 1993.

CHAN, Laval et al. Discovery of thiophene-2-carboxylic acids as potent inhibitors of HCV NS5B polymerase and HCV subgenomic RNA replication. Part 1: Sulfonamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Canadá, v. 14, p.793-796, 2004.

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

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

CZEIZELA, Andrew et al. The teratogenic risk of trimethoprim-sulfonamides: A population based case-control study. **Reproductive Toxicology**, Dinamarca, v. 15, p.637-646, 2001.

DESAI, N.c. et al. Synthesis and antimicrobial screening of 1,3,4-oxadiazole and clubbed thiophene derivatives. **Journal Of Saudi Chemical Society**, Índia, p.1-7, 2011.

FERREIRA, I. C. F. R.; CALHELHA, R. C.; ESTEVINHO, L. M.; QUEIROZ, M.-J. R. P. Screening of antimicrobial activity of diarylamines in the 2,3,5-trimethylbenzo[*b*]thiophene series: a structure–activity evaluation study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 14, pp.5831–5833, 2004.

FUJITA, M., SHIOTA, S., KURODA, T., HATANO, T., YOSHIDA, T., MIZUSHIMA, T., TSUCHYA, T. Remarkable Synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and β -lactams against methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**, v. 49, p. 391-396, 2005.

GEWALD, K. 2-Amino-thiophene aus α -oxo-mercaptanen und methylenaktiven nitrilen. **Chem. Ber.**, v. 98, p. 3571-7, 1965.

GEWALD, K.; SCHINKE, E.; BOTTCHER, H. 2-Amino-thiophene aus methylenaktiven nitrilen, Carbonylverbindungen und Schwefel. **Chem. Ber.**, v. 99, p. 94-100, 1966.

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.

GIBBONS, S., OLUWATUYI, O., KAAZT, G.W. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 13–17. 2003.

GIBBONS, S., MOSER, E., KAAZT, G. W. Catechin gallates inhibit multidrug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus*. **Plant Letter**, v. 70, p.1-3. 2004.

HIRATA, T. WATANABE, R., NIELSEN, J., SOMEYA, Y., FUJIHIRA, E., KIMURA, T., YAMAGUCHI, A. A novel compound 1,1-dimethyl-5-(1-hydroxypropyl)-4,6,7-trimethylindan, is an effective inhibitor of the tet(K)gene-encoded metal-tetracycline/H antiporter of *Staphylococcus aureus*. **FEBS Letters**, v. 412, p.337-344. 1997.

HIRATA, T., WATANABE, R., NIELSEN, J., SATOH, T., NIHIRA, S., YAMAGUCHI, A. Screening of an inhibitor of the tetracycline efflux pump in a tetracycline-resistant clinical-isolate of *Staphylococcus aureus*743. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, p. 678-681, 1998.

ILIES, Monica et al. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Sulfonamides Incorporating Furan-, Thiophene- and Pyrrole-carboxamido Groups Possess Strong Topical Intraocular Pressure Lowering Properties as Aqueous Suspensions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Itália, v. 8, p.2145-2155, 2000.

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.

INNOCENTI, Alessio et al. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with benzo[b]thiophene 1,1-dioxide sulfonamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Espanha, v. 15, p.4872-4876, 2005.

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

KAATZ, G. W., SEO, S. M., RUBLE, C. A. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 1086-1094. 2003.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment, **Ecol. Indic.** n.8, 1-13, 2008.

KIM, Seoung Jong et al. Synthesis and antibacterial activities of novel oxazolidinones having cyclic sulfonamide moieties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Coréia, v. 18, p.5815-5818, 2008.

K.G. Byrne-Bailey, W.H. Gaze, P. Kay, A.B.A. Boxall, P.M. Hawkey, E.M.H. Wellington, Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom, **Antimicrob. Agents Chemother.** 53 (2009) 696–702.

KRÁTKÝA, Martin et al. Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, República Tcheca, n. 50, p.433-440, 2012.

KÖHLER, T., PECHÈRE, J. C., PLÉSIAT, P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 771-778. 1999.

KOUFAKI, Maria; FOTOPOULOU, Theano; HEROPOULOS, Georgios A.. Synergistic effect of dual-frequency ultrasound irradiation in the one-pot synthesis of 3,5-disubstituted isoxazoles. **Ultrasonics 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.

LEITANS, Janis et al. 5-Substituted-(1,2,3-triazol-4-yl)thiophene-2-sulfonamides strongly inhibit human carbonic anhydrases I, II, IX and XII: Solution and X-ray crystallographic studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Itália, n. 21, p.5130-5138, 2013.

LE-MINH, Nhat; STUETZ, Richard M.; KHAN, Stuart J.. Determination of six sulfonamide antibiotics, two metabolites and trimethoprim in wastewater by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Talanta**, Austrália, v. 89, p.407-416, 2012.

LI, Da-jing et al. Optimization of the ultrasound-assisted synthesis of lutein disuccinate using uniform design. **Ultrasonics Sonochemistry**, China, v. 21, p.98-103, 2013.

LIMA, Lídia M.. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, pp. 1456-1468 2007 .

LIMA-NETO, Reginaldo G. et al. Synthesis of 1,2,3-Triazole Derivatives and in Vitro Antifungal Evaluation on Candida Strains. **Molecules**, Pernambuco, n. 17, p.5882-5892, maio 2012.

LOMOVSKAYA, O., BOSTIAN, K. A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic – a vision for applied use. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 910-918. 2006.

MALMSTRÖM, Jonas et al. Synthesis and structure-activity relationship of 4-(1,3-benzothiazol-2-yl)-thiophene-2-sulfonamides as cyclin-dependent kinase 5 (cdk5)/p25 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, França, v. 22, p.5919-5923, 2012.

MARKHAM, P.N. Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the multidrug efflux inhibitor reserpine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 988-989. 1999.

MARKHAM, P., WESTHAUS, E., KLYACHKO, K., JOHNSON, M. E., NEYFAKH, A. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 2404-2408. 1999.

MASAKI, Hidekazu et al. Structure–Activity Relationship of Benzo[b]thiophene-2-sulfonamide Derivatives as Novel Human Chymase Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Japão, v. 13, p.4085-4088, 2003.

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.

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.

PATRICK, Graham L.. **An introduction to Medicinal Chemistry**. 4. ed. Nova York: Oxford, 2009. 772 p.

PIDDOCK, L.J.V., JIN, Y. F., GRIGGS, D. J. Effect of hydrophobicity and molecular mass on the accumulation of fluoroquinolones by *Staphylococcus aureus*. **Journal Antimicrobrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 261–270. 2001.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. **Clinical Microbiology Review**, v. 19, p. 382-402. 2006.

PUTEROVÁ, Z.; KRUTOŠÍKOVÁ, A.; VÉGH, D. APPLICATIONS SUBSTITUTED 2-AMINOTHIOPHENES IN DRUG DESIGN. **Nova Biotechnologica**. v.9,n.2, p. 167-173, 2009.

RAJUA, B. Rama et al. Ultrasound promoted synthesis of Nile Blue derivatives. **Ultrasonics Sonochemistry**, Portugal, n. 21, p.360-366, 2013.

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-promoted greener synthesis of benzoheterocycle derivatives catalyzed by nanocrystalline copper(II) oxide. **Ultrasonics Sonochemistry**, Irã, v. 17, p.764-767, 2010.

SCOTTI, Luciana et al. Experimental Methodologies and Evaluations of Computer-Aided Drug Design Methodologies Applied to a Series of 2-Aminothiophene Derivatives with Antifungal Activities. **Molecules**, Brasil, v. 3, n. 17, p.2298-2315, 2012.

SILVEIRA, Gustavo Pozza et al. ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NO COMBATE A RESISTÊNCIA BACTERIANA. **Química Nova**, Florianópolis, v. 29, n. 4, p.844-855, 2006.

SILVERSTEIN, Robert M; WEBSTER, Francis X.. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000, 460 p.

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

SIQUEIRA, Geonir M. et al. . Aplicação de α -oxoceteno ditiocetais em síntese orgânica. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, pp. 707-715, 2010.

SMITH, E., WILLIAMSON, E., WAREHAM, N., KAATZ, G.W., GIBBONS, S. Antibacterials and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 210-217. 2007.

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

OZBEK, Neslihan et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of new aliphatic sulfonamide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Turquia, n. 15, p.5105-5109, 2007.

VAN BAMBEKE, F., PLÉSIAT, G. P, PECHÈRE, J. C., TULKENS, P. M. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1055-1065. 2003.

VAN BAMBEKE, F., PAGÈS, J. LEE, V. J. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 1, p. 157-175. 2006.

Wegkamp A, van Oorschot W, de Vos WM, and Smid EJ. **Characterization of the role of para-aminobenzoic acid biosynthesis in folate production by *Lactococcus lactis***. Appl Environ Microbiol 2007 Apr; 73(8) 2673-81.

WELMUTH, Camille Georges. **Welmuth's The Practice of Medicinal Chemistry**: Third Edition. França: Elsevier, 2008.

WANG, Zhong-chang et al. Sulfonamides containing coumarin moieties selectively and potently inhibit carbonic anhydrases II and IX: Design, synthesis, inhibitory activity and 3D-QSAR analysis. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, China, n. 66, p.1-11, 2013.

YAMADA, H., KUROSE-HAMADA, S., FUKUDA, Y., MITSUYAMA, Y., TAKAHATA, M., MINAMI, S., WATANABE, Y., NARITA, H. Quinolone susceptibility of norA-disrupted

Staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 2308-2309. 1997.

ZHI-GANG, Xu et al. Preparation of Trimethoprim Molecularly Imprinted Stir Bar Sorptive Extraction and Its Application for Trace Analysis of Trimethoprim and Sulfonamides in Complex Samples. **Chinese Journal Of Analytical Chemistry**, China, v. 40, n. 7, p.1002-1010, 2012.

ZLOH, M., KAATZ, G. W., GIBBONS, S. Inhibitors of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 881-885. 2004.

Apêndice A – Trabalho publicado na Acta Crystallographica Section E

organic compounds



Acta Crystallographica Section E
Structure Reports

Online

ISSN 1600-5368

Ethyl 2-(3-phenylthioureido)-5,6-dihydro-4H-cyclopenta[b]thiophene-3-carboxylate

Jaismary G. B. de Oliveira,^a Francisco J. B. Mendonça Junior,^a Maria do Carmo A. de Lima,^b Carlos A. de Simone^{a*} and Javier A. Ellena^c

^aLaboratório de Síntese e Verificação de Moléculas Bioativas, Universidade Estadual da Paraíba, 58020-540 João Pessoa, PB, Brazil, ^bLaboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-910 Recife, PE, Brazil, and ^cDepartamento de Física e Informática, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil
Correspondence e-mail: casimono@ibfc.usp.br

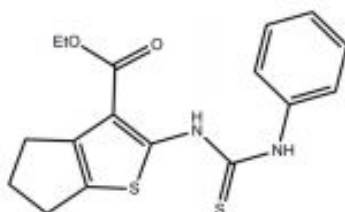
Received 4 June 2012; accepted 30 June 2012

Key indicators: single-crystal X-ray study; T = 295 K; mean $\sigma(\text{C}-\text{C}) = 0.003 \text{ \AA}$; R factor = 0.045; wR factor = 0.129; data-to-parameter ratio = 18.6.

In the title compound, $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$, the angle between the mean plane defined by the atoms of the 5,6-dihydro-4H-cyclopenta[b]thiophene moiety (r.m.s. deviation = 0.19 Å) and the phenyl ring is 72.8°(2). The molecular conformation is stabilized by an intramolecular N—H...O interaction, which generates an *S*(6) ring motif. In the crystal, pairs of N—H...S hydrogen bonds link the molecules to form inversion dimers with an $R_2^2(8)$ ring motif.

Related literature

For background to 2-aminothiophene derivatives, see: Puterová *et al.* (2010). For the biological activity of 2-ureido- and 2-thioureido-thiophene-3-carboxylate derivatives, see: Arhin *et al.* (2006); Saeed *et al.* (2010). For the synthesis of 2-aminothiophenes, see: Gewald *et al.* (1966). For a related structure, see: Larson & Simonsen (1988). For hydrogen-bond motifs, see: Bernstein *et al.* (1995).



Experimental

Crystal data

$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$
 $M_r = 346.43$
Triclinic, *P*1
 $a = 5.0755$ (2) Å
 $b = 12.5088$ (6) Å
 $c = 13.3304$ (5) Å
 $\alpha = 90.582$ (3)°
 $\beta = 95.711$ (3)°
 $\gamma = 94.378$ (2)°
 $V = 839.61$ (6) Å³
 $Z = 2$
Mo *K* α radiation
 $\mu = 0.33 \text{ mm}^{-1}$
 $T = 295 \text{ K}$
 $0.32 \times 0.17 \times 0.11 \text{ mm}$

Data collection

Nonius KappaCCD diffractometer
9172 measured reflections
3876 independent reflections
2727 reflections with $I > 2\sigma(I)$
 $R_{int} = 0.041$

Refinement

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.045$
 $wR(F^2) = 0.129$
 $S = 1.04$
3876 reflections
208 parameters
H-atom parameters constrained
 $\Delta\rho_{max} = 0.28 \text{ e \AA}^{-3}$
 $\Delta\rho_{min} = -0.25 \text{ e \AA}^{-3}$

Table 1
Hydrogen-bond geometry (Å, °).

D—H...A	D—H	H...A	D...A	D—H...A
N2—H2...S1 ⁱ	0.86	2.61	3.415 (2)	157
N1—H1...O1	0.86	2.64	2.719 (2)	136

Symmetry code: (i) $-x + 1, -y, -z + 1$.

Data collection: *COLLECT* (Nonius, 1997); cell refinement: *SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1997); data reduction: *DENZO* (Otwinowski & Minor, 1997) and *SCALEPACK*; program(s) used to solve structure: *SHELXS97* (Sheldrick, 2008); program(s) used to refine structure: *SHELXL97* (Sheldrick, 2008); molecular graphics: *ORTEP-3 for Windows* (Farrugia, 1997); software used to prepare material for publication: *WinGX* (Farrugia, 1999).

This work has received partial support from CNPq, CAPES, FACEPE and FINEP. CADS thanks the Instituto de Física de São Carlos — USP for allowing the use of the KappaCCD diffractometer.

Supplementary data and figures for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: LR2068).

References

- Arhin, F., *et al.* (2006). *Bisorg. Med. Chem.* **14**, 5812–5832.
Bernstein, J., Davis, R. E., Shimoni, L. & Chang, N.-L. (1995). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**, 1555–1573.
Farrugia, L. J. (1997). *J. Appl. Cryst.* **30**, 565.
Farrugia, L. J. (1999). *J. Appl. Cryst.* **32**, 837–838.
Gewald, K., Schinke, E. & Botlicher, H. (1966). *Chem. Ber.* **99**, 99–100.
Larson, S. B. & Simonsen, S. H. (1988). *Acta Cryst.* **C44**, 2035–2037.
Nonius (1997). *COLLECT*. Nonius BV, Delft, The Netherlands.
Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods in Enzymology*, Vol. 278, *Macromolecular Crystallography, Part A*, edited by C. W. Carter Jr & R. M. Sweet, pp. 307–326. New York: Academic Press.
Puterová, Z., Kratoňková, A. & Věgh, D. (2010). *Arkhivoc.* **1**, 209–246.
Saeed, S., Rashid, N., Ak, M., Hussain, R. & Jones, P. (2010). *Eur. J. Chem.* **1**, 221–227.
Sheldrick, G. M. (2008). *Acta Cryst.* **A64**, 112–122.

supplementary materials

Acta Cryst. (2012). E68, o2360 [doi:10.1107/S1600536812029893]

Ethyl 2-(3-phenylthioureido)-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophene-3-carboxylate

Jaismary G. B. de Oliveira, Francisco J. B. Mendonça Junior, Maria do Carmo A. de Lima, Carlos A. de Simone and Javier A. Ellena

Comment

The various uses and applications of 2-amino thiophene derivatives have been well documented (Puterová *et al.*, 2010). Amongst these applications, 2-thioureido-thiophene derivatives presents antifungal (Saeed *et al.*, 2010) and antibacterial activities (Arhin *et al.*, 2006). In this work, we report the structure of the title compound prepared by the condensation of 2-amino-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophene-3-carbonitrile with phenyl isothiocyanate.

The angle between the least-squares plane defined by the atoms of the 5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophene moiety (rms deviation = 0.19 Å) and the phenyl rings is 72.8°(2). There is an intramolecular N—H···O interaction giving an S(6) ring motif. In the crystal N—H···S hydrogen-bond interactions link the molecules into pairs giving an *R*₂²(8) motif which extends parallel to the plane (120). (Table 2, Fig.2).

Experimental

Equimolar amounts of 2-amino-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophene-3-carbonitrile (4.19 mmol) and phenyl isothiocyanate (4.19 mmol) were heated under reflux for 16 h, in the presence of dry toluene (10 ml), and 5 drops of triethylamine. The solid product formed was collected by filtration, washed with ethyl acetate (3 x 10 ml) and crystallized from absolute ethanol, affording the title compound as pale yellow crystals (1.07 g, 74%), *M.p.* 185–187 °C. Crystals suitable for single-crystal X-ray diffraction were grown by slow evaporation at room temperature of a solution of the pure title compound in absolute ethanol. NMR ¹H (400 MHz, CDCl₃): 1.25 (t, 3H, *J* = 6.4 Hz), 2.28 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz), 2.76–2.81 (m, 4H), 4.20 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz), 7.24 (s, 1H), 7.39 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz), 7.48 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz), 11.00 (bs, 1H); 11.58 (bs, 1H).

Refinement

All H atoms attached to C atoms and N atom were fixed geometrically and treated as riding with C—H = 0.93 Å (aromatic) or 0.97 Å (methylene) and N—H = 0.86 Å with *U*_{iso}(H) = 1.2*U*_{eq}(C or N). The maximum and minimum residual electron density peaks were located 0.60 and 0.82 Å, from the C2 and S2 atoms respectively.

Computing details

Data collection: *COLLECT* (Nonius, 1997); cell refinement: *SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1997); data reduction: *DENZO* and *SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1997); program(s) used to solve structure: *SHELXS97* (Sheldrick, 2008); program(s) used to refine structure: *SHELXL97* (Sheldrick, 2008); molecular graphics: *ORTEP-3 for Windows* (Farrugia, 1997); software used to prepare material for publication: *WtoGX* (Farrugia, 1999).

supplementary materials

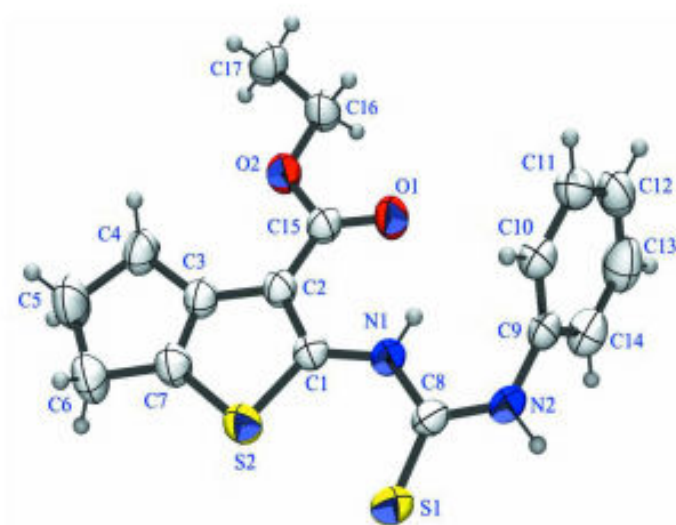


Figure 1
Projection of $C_{11}H_{16}N_2O_2S_2$ with 50% probability displacement ellipsoids.

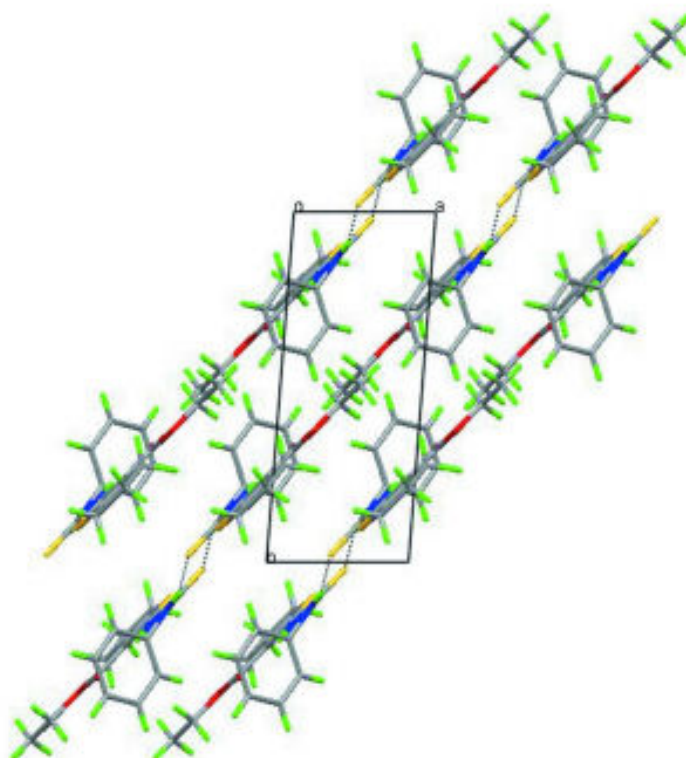


Figure 2
View of the packing along *c* axis.

Ethyl 2-(3-phenylthioureido)-5,6-dihydro-4*H*-cyclopenta[*b*]thiophene-3-carboxylate

Crystal data

$C_{17}H_{18}N_2O_2S_2$

$M_r = 346.45$

Triclinic, $P\bar{1}$

Hall symbol: $-P\ 1$

$a = 5.0755$ (2) Å

$b = 12.5088$ (6) Å

$c = 13.3304$ (5) Å

$\alpha = 90.562$ (3) $^\circ$

$\beta = 95.711$ (3) $^\circ$

$\gamma = 94.378$ (2) $^\circ$

$V = 839.61$ (6) Å³

$Z = 2$

$F(000) = 364$

$D_x = 1.370$ Mg m⁻³

Mo $K\alpha$ radiation, $\lambda = 0.71073$ Å

Cell parameters from 5829 reflections

$\theta = 2.6\text{--}27.5^\circ$

$\mu = 0.33$ mm⁻¹

$T = 295$ K

Prism, yellow

$0.32 \times 0.17 \times 0.11$ mm

 supplementary materials

Data collection

Nonius KappaCCD
diffractometer
Radiation source: Enraf Nonius FR590
Horizontally mounted graphite crystal
monochromator
Detector resolution: 9 pixels mm⁻¹
CCD rotation images, thick slices scans
9172 measured reflections

3876 independent reflections
2727 reflections with $I > 2\sigma(I)$
 $R_{int} = 0.041$
 $\theta_{min} = 27.5^\circ$, $\theta_{max} = 3.1^\circ$
 $h = -5 \rightarrow 6$
 $k = -16 \rightarrow 16$
 $l = -17 \rightarrow 17$

Refinement

Refinement on F^2
Least-squares matrix: full
 $R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.045$
 $wR(F^2) = 0.129$
 $S = 1.04$
3876 reflections
208 parameters
0 restraints
Primary atom site location: structure-invariant
direct methods

Secondary atom site location: difference Fourier
map
Hydrogen site location: inferred from
neighbouring sites
H-atom parameters constrained
 $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0607P)^2 + 0.2145P]$
where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
 $(\Delta\sigma)_{max} = 0.001$
 $\Delta\rho_{max} = 0.28 \text{ e \AA}^{-3}$
 $\Delta\rho_{min} = -0.25 \text{ e \AA}^{-3}$

Special details

Geometry. All e.s.d.'s (except the e.s.d. in the dihedral angle between two l.s. planes) are estimated using the full covariance matrix. The cell e.s.d.'s are taken into account individually in the estimation of e.s.d.'s in distances, angles and torsion angles; correlations between e.s.d.'s in cell parameters are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic) treatment of cell e.s.d.'s is used for estimating e.s.d.'s involving l.s. planes.

Refinement. Refinement of F^2 against ALL reflections. The weighted R -factor wR and goodness of fit S are based on F^2 , conventional R -factors R are based on F , with F set to zero for negative F^2 . The threshold expression of $F^2 > \sigma(F^2)$ is used only for calculating R -factors(gt) etc. and is not relevant to the choice of reflections for refinement. R -factors based on F^2 are statistically about twice as large as those based on F , and R -factors based on ALL data will be even larger.

Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent isotropic displacement parameters (P)

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	U_{eq}^*/U_{eq}
S1	0.55314 (12)	0.02072 (4)	0.67471 (4)	0.05884 (19)
S2	0.35795 (11)	0.09492 (4)	0.87171 (4)	0.05360 (17)
O2	-0.2636 (3)	0.37540 (12)	0.83065 (10)	0.0528 (4)
O1	-0.1299 (3)	0.33086 (13)	0.68141 (10)	0.0607 (4)
N1	0.2196 (3)	0.17647 (13)	0.68280 (11)	0.0469 (4)
H1	0.1318	0.2229	0.6494	0.056*
N2	0.3310 (4)	0.13297 (14)	0.52705 (13)	0.0582 (5)
H2	0.3999	0.0896	0.4885	0.070*
C1	0.1968 (4)	0.17638 (15)	0.78532 (14)	0.0423 (4)
C9	0.1970 (4)	0.21777 (16)	0.47921 (14)	0.0487 (5)
C10	0.3005 (4)	0.32279 (17)	0.49491 (15)	0.0536 (5)
H10	0.4551	0.3384	0.5377	0.064*
C2	0.0363 (4)	0.24425 (15)	0.83011 (13)	0.0425 (4)
C4	-0.0737 (4)	0.2761 (2)	1.02319 (15)	0.0566 (5)
H4A	-0.2659	0.2660	1.0134	0.068*
H4B	-0.0208	0.3521	1.0313	0.068*
C8	0.3604 (4)	0.11405 (15)	0.62679 (15)	0.0466 (4)

supplementary materials

C6	0.2245 (5)	0.1327 (2)	1.07959 (16)	0.0670 (6)
H6A	0.4038	0.1475	1.1117	0.080*
H6B	0.1620	0.0597	1.0934	0.080*
C11	0.1727 (5)	0.40396 (19)	0.44669 (17)	0.0635 (6)
H11	0.2408	0.4748	0.4573	0.076*
C15	-0.1225 (4)	0.31881 (16)	0.77266 (14)	0.0459 (4)
C3	0.0489 (4)	0.22821 (16)	0.93666 (14)	0.0468 (4)
C16	-0.4291 (5)	0.45183 (19)	0.77988 (16)	0.0573 (5)
H16A	-0.5613	0.4152	0.7313	0.069*
H16B	-0.3218	0.5036	0.7446	0.069*
C7	0.2103 (4)	0.15241 (18)	0.96808 (15)	0.0533 (5)
C13	-0.1550 (5)	0.2766 (3)	0.36669 (18)	0.0747 (7)
H13	-0.3081	0.2614	0.3229	0.090*
C14	-0.0298 (5)	0.1938 (2)	0.41490 (17)	0.0635 (6)
H14	-0.0979	0.1230	0.4040	0.076*
C12	-0.0536 (5)	0.3809 (2)	0.38337 (18)	0.0704 (7)
H12	-0.1395	0.4362	0.3514	0.084*
C17	-0.5609 (5)	0.5069 (2)	0.85914 (18)	0.0677 (6)
H17A	-0.6727	0.5584	0.8282	0.102*
H17B	-0.4280	0.5428	0.9067	0.102*
H17C	-0.6665	0.4548	0.8934	0.102*
C5	0.0370 (7)	0.2135 (3)	1.11409 (18)	0.0839 (8)
H5A	-0.1079	0.1758	1.1448	0.101*
H5B	0.1328	0.2628	1.1640	0.101*

Atomic displacement parameters (\AA^2)

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{12}	U^{13}	U^{23}
S1	0.0707 (4)	0.0530 (3)	0.0557 (3)	0.0257 (3)	0.0055 (3)	-0.0062 (2)
S2	0.0602 (3)	0.0550 (3)	0.0490 (3)	0.0214 (2)	0.0087 (2)	0.0070 (2)
O2	0.0585 (8)	0.0617 (9)	0.0428 (7)	0.0272 (7)	0.0098 (6)	0.0028 (6)
O1	0.0755 (10)	0.0716 (10)	0.0404 (7)	0.0340 (8)	0.0104 (7)	0.0052 (7)
N1	0.0571 (10)	0.0472 (9)	0.0395 (8)	0.0183 (7)	0.0090 (7)	-0.0002 (7)
N2	0.0839 (13)	0.0522 (10)	0.0443 (9)	0.0294 (9)	0.0165 (9)	-0.0042 (7)
C1	0.0445 (10)	0.0414 (9)	0.0419 (9)	0.0075 (8)	0.0061 (8)	0.0001 (7)
C9	0.0612 (12)	0.0511 (11)	0.0376 (9)	0.0169 (9)	0.0151 (9)	-0.0015 (8)
C10	0.0628 (12)	0.0535 (12)	0.0462 (11)	0.0113 (10)	0.0092 (9)	-0.0018 (9)
C2	0.0430 (9)	0.0469 (10)	0.0388 (9)	0.0080 (8)	0.0062 (7)	0.0016 (7)
C4	0.0593 (12)	0.0712 (14)	0.0419 (10)	0.0127 (11)	0.0123 (9)	-0.0014 (9)
C8	0.0542 (11)	0.0401 (10)	0.0469 (10)	0.0080 (8)	0.0100 (9)	-0.0062 (8)
C6	0.0708 (14)	0.0866 (17)	0.0461 (11)	0.0164 (13)	0.0095 (11)	0.0156 (11)
C11	0.0840 (16)	0.0557 (13)	0.0551 (12)	0.0173 (12)	0.0192 (12)	0.0064 (10)
C15	0.0472 (10)	0.0495 (11)	0.0431 (10)	0.0119 (8)	0.0094 (8)	-0.0015 (8)
C3	0.0480 (10)	0.0530 (11)	0.0401 (10)	0.0066 (9)	0.0062 (8)	0.0001 (8)
C16	0.0640 (13)	0.0641 (13)	0.0481 (11)	0.0295 (11)	0.0071 (10)	0.0053 (9)
C7	0.0558 (12)	0.0611 (13)	0.0453 (10)	0.0139 (10)	0.0089 (9)	0.0065 (9)
C13	0.0649 (15)	0.108 (2)	0.0526 (13)	0.0221 (15)	0.0002 (11)	-0.0051 (13)
C14	0.0652 (14)	0.0703 (15)	0.0556 (13)	0.0062 (12)	0.0090 (11)	-0.0085 (11)
C12	0.0844 (17)	0.0814 (18)	0.0520 (13)	0.0384 (14)	0.0141 (12)	0.0134 (12)
C17	0.0762 (15)	0.0731 (15)	0.0578 (13)	0.0338 (13)	0.0067 (11)	-0.0080 (11)

supplementary materials

 C5 0.109 (2) 0.103 (2) 0.0471 (13) 0.0402 (18) 0.0182 (14) 0.0121 (13)

Geometric parameters (Å, °)

S1—C8	1.671 (2)	C4—H4B	0.9700
S2—C7	1.728 (2)	C6—C7	1.505 (3)
S2—C1	1.7310 (19)	C6—C5	1.537 (4)
O2—C15	1.337 (2)	C6—H6A	0.9700
O2—C16	1.449 (2)	C6—H6B	0.9700
O1—C15	1.224 (2)	C11—C12	1.366 (4)
N1—C8	1.363 (2)	C11—H11	0.9300
N1—C1	1.383 (2)	C3—C7	1.343 (3)
N1—H1	0.8600	C16—C17	1.495 (3)
N2—C8	1.348 (3)	C16—H16A	0.9700
N2—C9	1.425 (3)	C16—H16B	0.9700
N2—H2	0.8600	C13—C12	1.374 (4)
C1—C2	1.391 (3)	C13—C14	1.386 (4)
C9—C14	1.377 (3)	C13—H13	0.9300
C9—C10	1.383 (3)	C14—H14	0.9300
C10—C11	1.377 (3)	C12—H12	0.9300
C10—H10	0.9300	C17—H17A	0.9600
C2—C3	1.432 (3)	C17—H17B	0.9600
C2—C15	1.453 (3)	C17—H17C	0.9600
C4—C3	1.504 (3)	C5—H5A	0.9700
C4—C5	1.532 (3)	C5—H5B	0.9700
C4—H4A	0.9700		
C7—S2—C1	90.32 (9)	C10—C11—H11	119.9
C15—O2—C16	116.57 (15)	O1—C15—O2	122.23 (17)
C8—N1—C1	129.72 (17)	O1—C15—C2	125.21 (17)
C8—N1—H1	115.1	O2—C15—C2	112.56 (16)
C1—N1—H1	115.1	C7—C3—C2	112.96 (18)
C8—N2—C9	126.40 (16)	C7—C3—C4	111.40 (18)
C8—N2—H2	116.8	C2—C3—C4	135.63 (18)
C9—N2—H2	116.8	O2—C16—C17	107.08 (17)
N1—C1—C2	122.14 (17)	O2—C16—H16A	110.3
N1—C1—S2	125.40 (14)	C17—C16—H16A	110.3
C2—C1—S2	112.45 (14)	O2—C16—H16B	110.3
C14—C9—C10	120.6 (2)	C17—C16—H16B	110.3
C14—C9—N2	119.4 (2)	H16A—C16—H16B	108.6
C10—C9—N2	119.87 (19)	C3—C7—C6	114.13 (19)
C11—C10—C9	119.5 (2)	C3—C7—S2	113.40 (16)
C11—C10—H10	120.3	C6—C7—S2	132.46 (17)
C9—C10—H10	120.3	C12—C13—C14	120.2 (2)
C1—C2—C3	110.87 (17)	C12—C13—H13	119.9
C1—C2—C15	122.59 (16)	C14—C13—H13	119.9
C3—C2—C15	126.54 (17)	C9—C14—C13	119.1 (2)
C3—C4—C5	103.25 (18)	C9—C14—H14	120.5
C3—C4—H4A	111.1	C13—C14—H14	120.5
C5—C4—H4A	111.1	C11—C12—C13	120.4 (2)

 supplementary materials

C3—C4—H4B	111.1	C11—C12—H12	119.8
C5—C4—H4B	111.1	C13—C12—H12	119.8
H4A—C4—H4B	109.1	C16—C17—H17A	109.5
N2—C8—N1	114.24 (17)	C16—C17—H17B	109.5
N2—C8—S1	121.58 (14)	H17A—C17—H17B	109.5
N1—C8—S1	124.18 (15)	C16—C17—H17C	109.5
C7—C6—C5	101.64 (19)	H17A—C17—H17C	109.5
C7—C6—H6A	111.4	H17B—C17—H17C	109.5
C5—C6—H6A	111.4	C4—C5—C6	109.55 (19)
C7—C6—H6B	111.4	C4—C5—H5A	109.8
C5—C6—H6B	111.4	C6—C5—H5A	109.8
H6A—C6—H6B	109.3	C4—C5—H5B	109.8
C12—C11—C10	120.3 (2)	C6—C5—H5B	109.8
C12—C11—H11	119.9	H5A—C5—H5B	108.2

 Hydrogen-bond geometry (Å, °)

<i>D</i> —H... <i>A</i>	<i>D</i> —H	H... <i>A</i>	<i>D</i> ... <i>A</i>	<i>D</i> —H... <i>A</i>
N2—H2...S1 ⁱ	0.86	2.61	3.415 (2)	157
N1—H1...O1	0.86	2.04	2.719 (2)	136

 Symmetry code: (i) $-x+1, -y, -z+1$.

Apêndice B– Resumo apresentado ao 6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry

Brazilian Chemical Society (SBQ). Division of Medicinal Chemistry. 6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry

Preliminary Antimicrobial Evaluation of some Thiophene Derivatives

Oliveira, J. G. B.^{1*}; Lima, E. O.²; Diniz, I. O.¹; Mendonça Junior, F. J. B.^{1*}; *franciscojaime@pq.cnpq.br

¹Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, UEPB, João Pessoa/PB 58.020-540, Brasil; ²Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacéuticas, UFPB, João Pessoa/PB 50670-910, Brasil.

Keywords: Thiophene derivatives; Gewald reaction, Antifungal activity; Antibacterial activity

Introduction

Infections caused by opportunistic fungi species are common in immunocompromised patients and carry significant treatment costs and mortality¹. Standard systemic antibiotic therapy is frequently unsatisfactory due their toxicity, and other drawbacks regarding their spectrum, tissue distribution, central nervous system penetration, and high cost. Also, more attention is being focused on addressing the problem of multi drug resistant bacteria caused by the indiscriminate use of antibiotics. The emerging resistance of microorganisms to some synthetic antimicrobial agents makes it necessary to continue the search for new antimicrobial substances. Some thiophene derivatives have been reported as antimicrobial and antifungal agents²⁻³. In this work we report the synthesis, and the antifungal and antibacterial activities of some thiophene derivatives.

Results and Discussion

Ten thiophene derivatives were synthesized by condensation of different 2-amino-thiophene derivatives obtained through de Gewald reaction with aryl-isothiocyanate affording 2-(3-aryl-thioureido)-cycloalkyl[b]thiophene-3-substituted. Cyclization of these thioureido-thiophene derivatives with ethyl-chloroacetate affording new 2-(4-oxo-3-aryl-thiazolidin-2-ylidene-amine)-cycloalkyl[b]thiophene-3-substituted. After purification and structural comprovation by IR and NMR, the compounds were screened against some fungi and bacteria. The microorganisms used were represented by yeasts: *Candida albicans* (ATCC-76485 and LM-V42), *Candida tropicalis* (ATCC-13803 and LM-14), *Cryptococcus neoformans* (ICB-59 and LM-0310), and bacteria: *Staphylococcus aureus* (ATCC - 25923 and 12228), *Escherichia coli* (ATCC-10536 and ATCC-8733) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-25853 and P-03). These strains were supplied by the URM Culture Collection of the Laboratory of Mycology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, Brazil. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values were determined in duplicate, by the microdilution broth method using microdilution plates according to the guidelines of the National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS)⁴. Miconazole (50µg/mL) and chloramphenicol (50µg/mL) were

used as positive control for yeast and bacteria respectively. All tested compounds showed antifungal activity against all fungi species tested. The MIC values observed were between 256 and 2,048µg/mL. Among these compounds, three Acid 2-(4-oxo-3-aryl-thiazolidin-2-ylidene-amine)-cycloalkyl[b]thiophene-3-ethyl ester derivatives showed the best inhibitory activity, with lowest MIC value (256 µg/mL), against all fungi species tested, Others two derivatives possessed great inhibitory effect with MIC values ranged from 256 to 512 µg/mL. In the antibacterial evaluation three compounds inhibited the growth of all bacteria strains and two compounds presented no activity. Eight compounds inhibited the growth of the *S. aureus* strains; Four and six compounds were efficient against *E. coli* ATCC-10536 and *E. coli* ATCC-8733, respectively. Against *Pseudomonas aeruginosa* six and three compounds were active against the strains ATCC-25853 and P-03, respectively. The MIC values for the antibacterial activity ranged from 512 to 2,048µg/mL.

Conclusions

In short, ten thiophene derivatives were synthesized in good yields (56-90%), characterized on the basis of their physical, analytical and spectral data, and were preliminary evaluated for their *in vitro* antimicrobial properties. Antimicrobial sensibility tests against 12 different strains including yeast and bacteria were done, and the results showed that the compounds had moderate to poor activity against the microorganisms tested. Acid 2-(4-oxo-3-aryl-thiazolidin-2-ylidene-amine)-cycloalkyl[b]thiophene-3-ethyl ester derivatives were the most promising compounds in this series.

Acknowledgements

CNPQ, PRPGP/UEPB, PPGCF/UEPB,

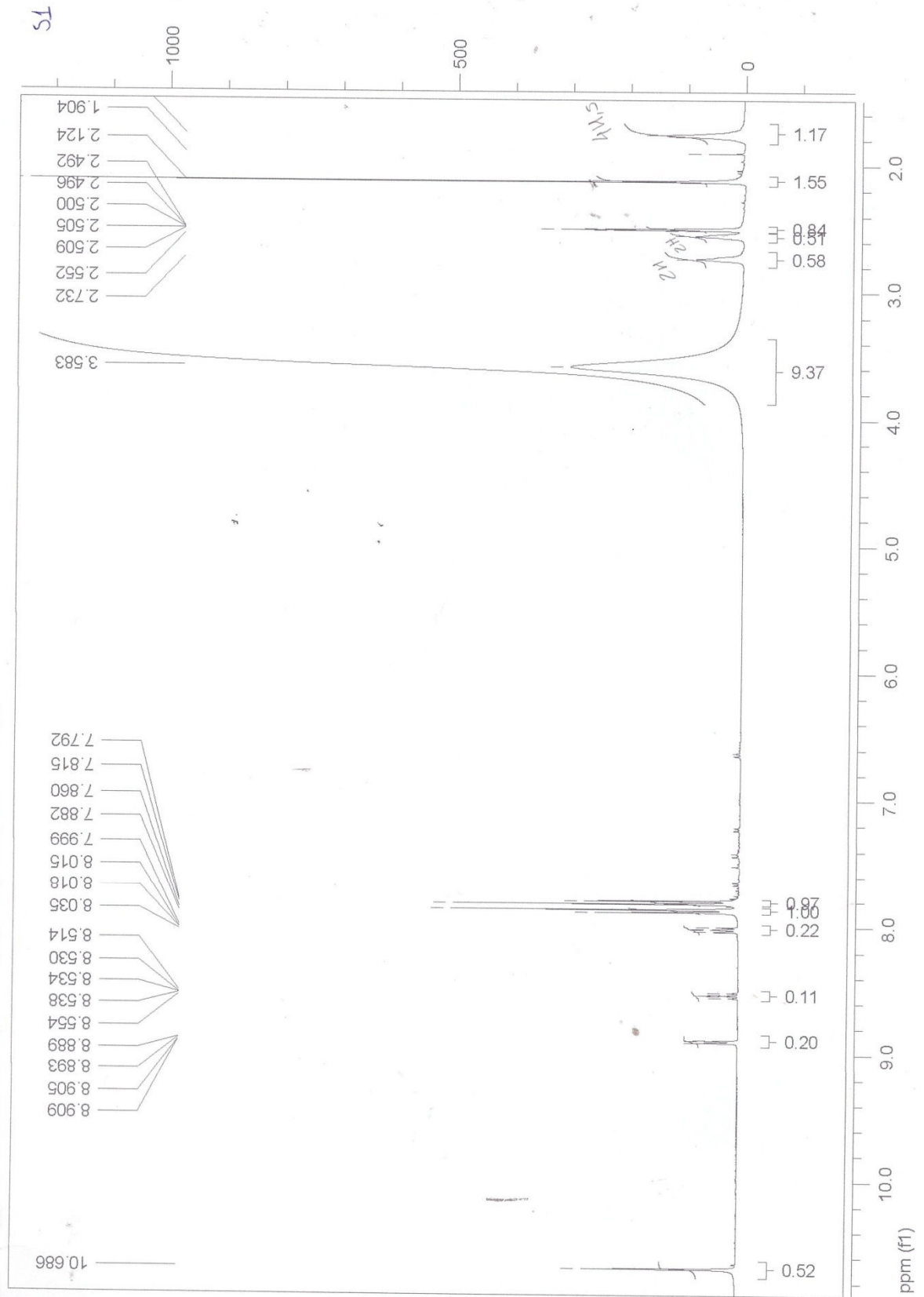
¹ Erzhadi, I. R.; Carneiro, C.; Zampoumbakis, P.; Genzikali, A.; Sokovic, M.; Glasocilja, J.; Cinc, A. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 1150.

² Iltis, A.M.; Kallazaya, B.; Pai, K.S. *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, 45, 825-830.

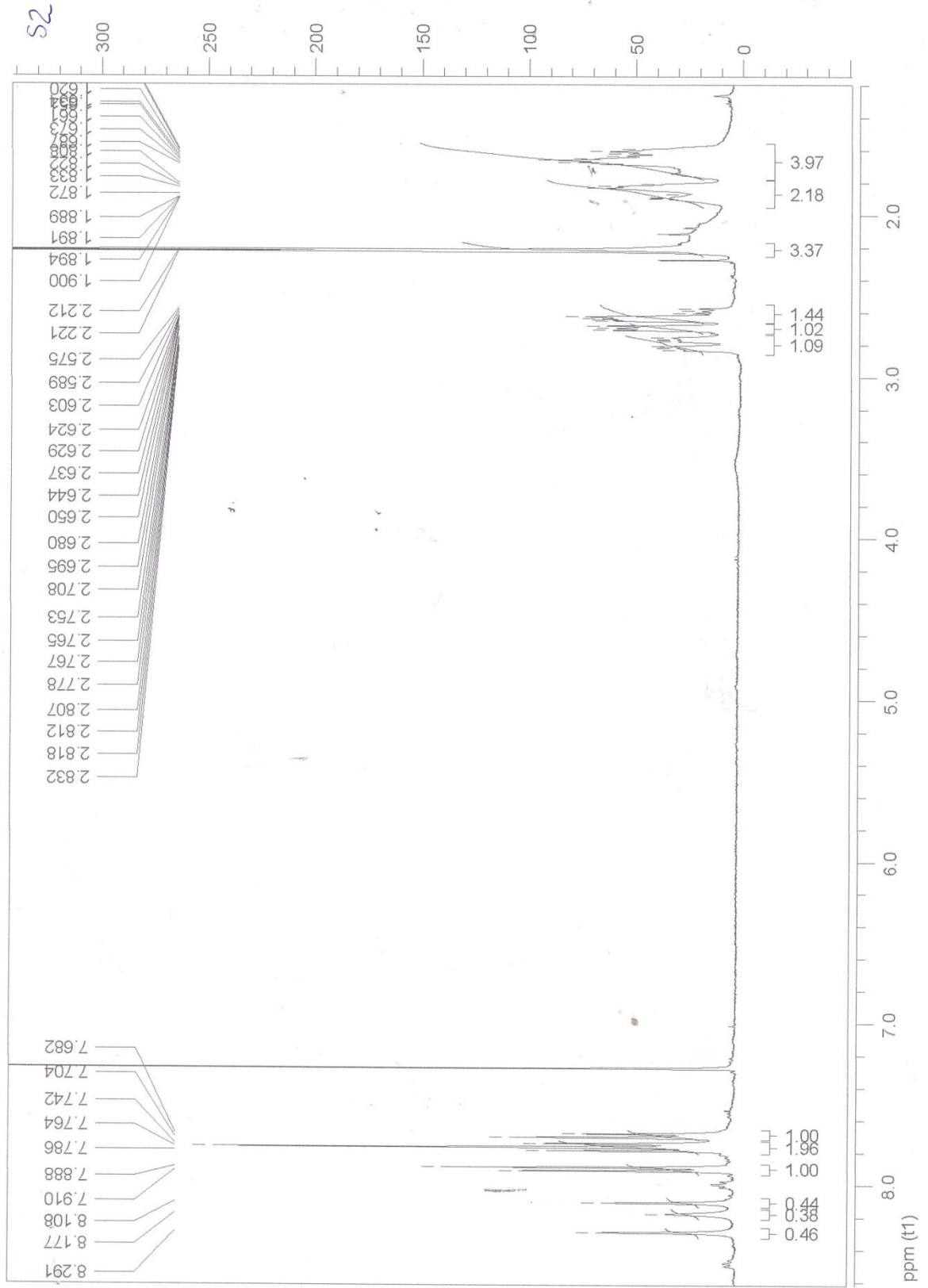
³ Scotti, L.; Scotti, M. T.; Lima, E. O.; Silva, M. S.; Lima, M. C. A.; Pitta, I. R.; Mesza, R. O.; Oliveira, J. G. B.; Cruz, R. M. D.; Mendonça Junior, F. J. B. *Molecules*, 2012, 17, 2298-2315.

⁴ CLSI, CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. "Reference method for broth dilution testing of yeasts: Approved standard-second edition M27-A2", Wayne, PA, 2002.

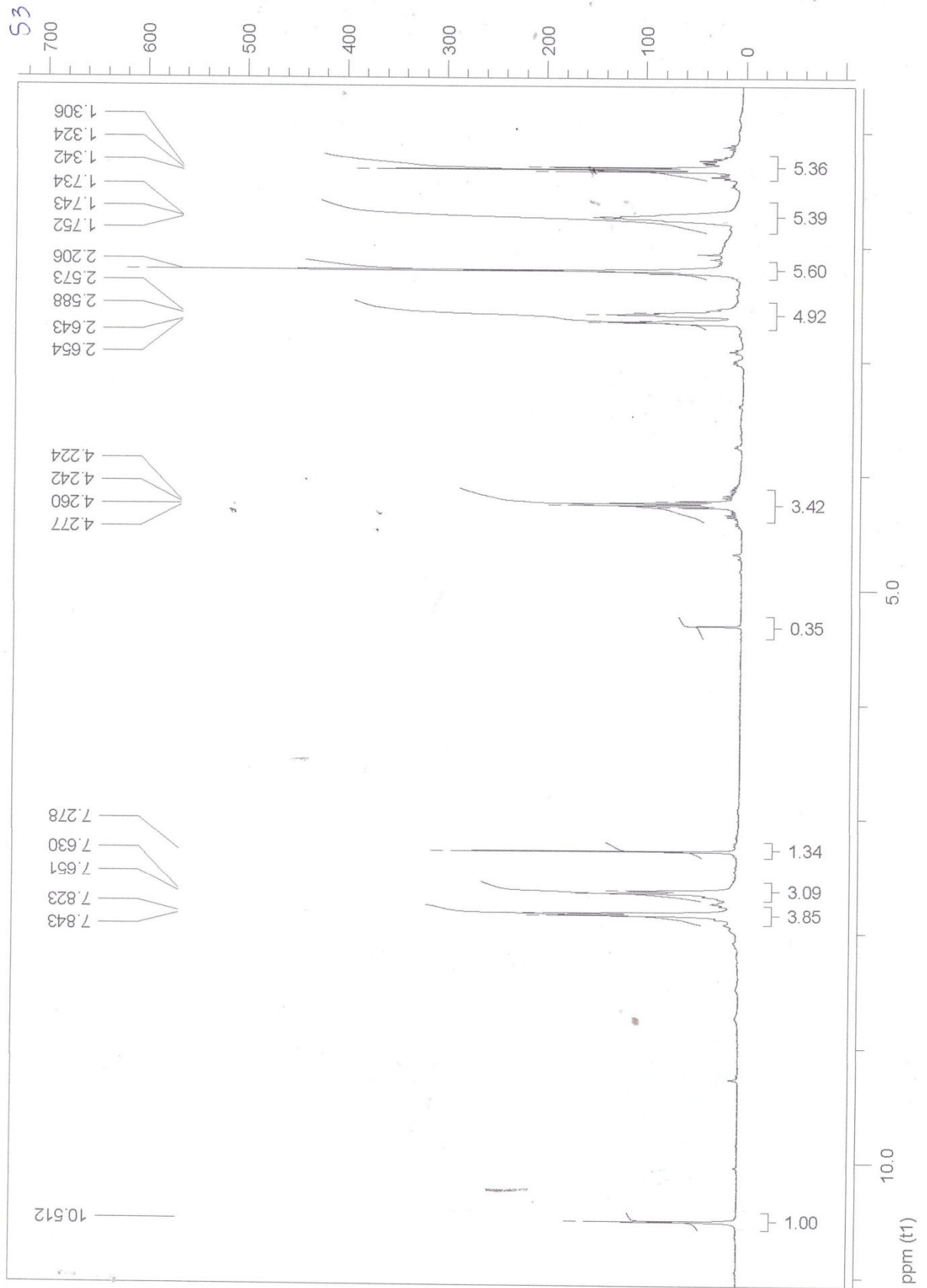
ANEXO 01 – RMN 1H DO COMPOSTO SULFA 01



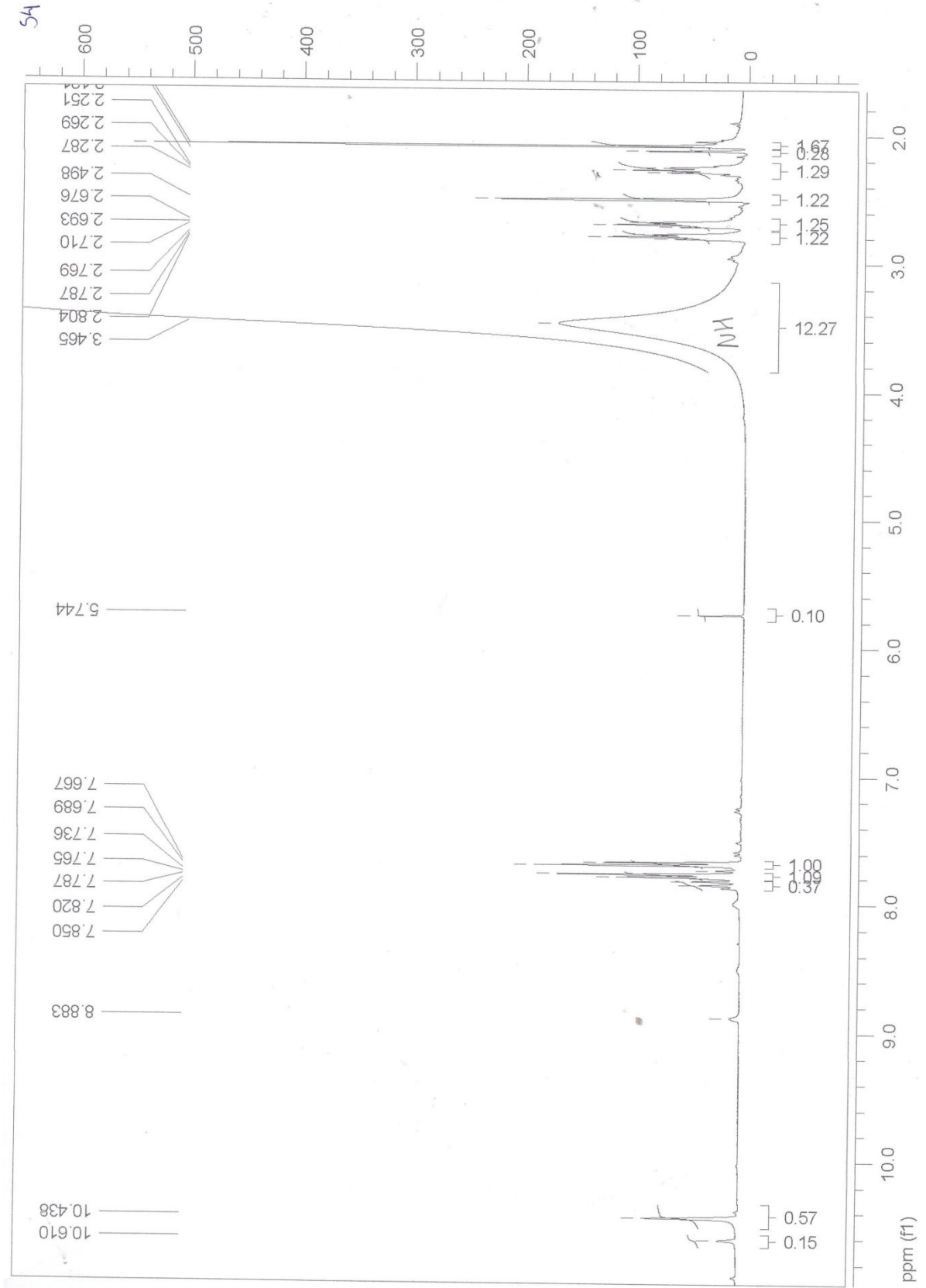
ANEXO 02 – RMN 1H DO COMPOSTO SULFA 02



ANEXO 03 – RMN 1H DO COMPOSTO SULFA 03



ANEXO 04 – RMN 1H DO COMPOSTO SULFA 04



ANEXO 05 – RMN 1H DO COMPOSTO SULFA 08

