



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS E SUAS TECNOLOGIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



AGNIS PÂMELA SIMÕES DO NASCIMENTO

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE COMPOSTOS α ,
 β - INSATURADOS ATUAREM COMO POSSÍVEIS ANTIBACTERIANO E
INIBIDORES DE β -LACTAMASES**

CAMPINA GRANDE

2020

AGNIS PÂMELA SIMÕES DO NASCIMENTO

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE COMPOSTOS α , β -
INSATURADOS ATUAREM COMO POSSÍVEIS ANTIBACTERIANO E INIBIDORES
DE β -LACTAMASES

Trabalho de Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura.

CAMPINA GRANDE

2020

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

N244p Nascimento, Agnis Pâmela Simões do.
Planejamento, síntese e avaliação *in silico* de compostos A, B- insaturados atuarem como possíveis antibacterianos e inibidores de B-lactamases [manuscrito] / Agnis Pâmela Simões do Nascimento. - 2020.
232 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Química - Mestrado) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2020.
"Orientação : Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, Departamento de Farmácia - CCBS."
1. Biomacromolécula. 2. Modulação. 3. Bioinformática. 4. Química medicinal. I. Título
21. ed. CDD 615.19

AGNIS PÂMELA SIMÕES DO NASCIMENTO

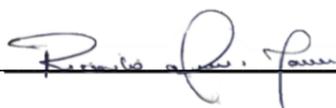
PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE COMPOSTOS α , β - INSATURADOS ATUAREM COMO POSSÍVEIS ANTIBACTERIANOS E INIBIDORES DE β -LACTAMASES

Trabalho de Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Medicinal.

Aprovada em: 29/10/2020.

BANCA EXAMINADORA



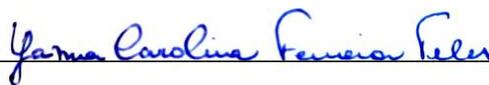
Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Orientador)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Túlio Ricardo Couto de Lima Souza

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)



Profa. Dra. Yanna Carolina Ferreira Teles

Universidade Federal da Paraíba (UFPB / PPGQP-UEPB)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Aurino Antonio e Maria José, pelo apoio e dedicação. Aos meus tios Kleber e Claudineide que torceram, apoiaram e comemoraram cada pequena vitória. Ao professor Ricardo Olímpio que com paciência, zelo e dedicação apoia e orienta seus alunos. Aos professores, em especial, João Oshiro (UEPB), Yanna Teles, Túlio Couto (UFRPE) e Frederico Pontes (UFPE), que contribuíram de forma enriquecedora para o desenvolvimento da pesquisa. Aos meus amigos Alluska, Hosana, Palloma, Franklin e Nathália que até aqui me acompanharam. Meus colegas Glayton, Lucas, Jamire, Malu, Mirelly, Sonaly e Yvnni. E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Carl Sagan – “Em algum lugar, alguma
coisa incrível está esperando para ser
descoberta.”

RESUMO

A inibição enzimática acarreta na ineficácia de alguns mecanismos de resistência bacteriana, por conseguinte os compostos relatados no presente estudo foram planejados com o intuito de agir como potenciais inibidores, devendo interagir com os sítios ativos das β -lactamases e por meio de uma reação de adição de Michael ligar-se covalentemente a mesma, evitando a hidrólise do anel β -lactâmico; avaliou-se adicionalmente a capacidade de atuar como possível antibacteriano. Com este intuito foram realizados inicialmente estudos de *docking* com o programa AutoDockTools versão 1.5.6 para as principais β -lactamases: a ESBL (β -lactamase de Espectro Estendido) e Oxacilinase; além deste foi testado também a inibição da *Protein Binding Penicillin* (PBP) e 16S rRNA para verificar outros mecanismos de ação antibacteriana de doze compostos. As reações ocorreram por condensação de Knoevenagel em meio básico e foram comprovadas as estruturas de cinco compostos, por meio da espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C . O potencial hemolítico pode ser avaliado a partir de eritrócitos humanos para soluções com concentração de 5%. A avaliação presuntiva antibacteriana foi realizada por sucessivas diluições para a *E. Coli* ATCC25922. Majoritariamente as doze moléculas planejadas apresentaram promissores resultados em relação aos ligantes co-cristalizados e as constantes de inibição para as séries de compostos, sendo a APB mais promissora para todos os alvos principalmente para a oxacilinase quando relacionados ambos os aspectos energéticos e constante de inibição tendo estes variado de -7,59 a -7,76 Kcal.mol⁻¹ e 2,75 a 2,06 nM para o APB-03 e APB-02 respectivamente. As predições farmacocinéticas *in silico* concluíram que todos os compostos foram condizentes com critérios de *druglikeness* estabelecido por Lipinski, Ghose e Egan, farmacocinética, toxicidade e eco-toxicidade. Estudos posteriores serão necessários a fim de realizar novas caracterizações e avaliar as atividades antibacterianas e moduladoras *in vitro*. Foram sintetizados todos os compostos planejados, obtendo rendimentos variando entre 33,06 e 99,04%. Sua pureza pode ser presumida pela técnica faixa de fusão, variando de 1 a 3 °C; nas espectroscopias de RMN apresentaram sinais diagnósticos indicando o sucesso da reação, como os deslocamentos químicos para hidrogênio (8,19 ppm, s, 1H) e carbonos vinílicos (151 e 107 ppm) característicos. Os potenciais hemolíticos puderam ser avaliados que, com exceção do APB-02, apresentaram valores inferiores a 10%.

Palavras-Chave: Biomacromolécula. Modulação. Bioinformática. Orgânica.

ABSTRACT

Enzymatic inhibition results in the ineffectiveness of some mechanisms of bacterial resistance, therefore the compounds reported in the present study were designed with the intention of acting as potential inhibitors, and must interact with the active sites of β -lactamases and through an addition reaction Michael's covalently bonding to it, preventing hydrolysis of the β -lactam ring; the ability to act as a possible antibacterial was further evaluated. For this purpose, docking studies were initially carried out with the AutoDockTools version 1.5.6 program for the main β -lactamases: ESBL (Extended Spectrum β -lactamase) and Oxacillinase; in addition to this, the inhibition of Protein Binding Penicillin (PBP) and 16S rRNA was also tested to verify other mechanisms of antibacterial action of twelve compounds. The reactions took place by Knoevenagel condensation in a basic medium and the structures of five compounds were proven, using ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. Hemolytic potential can be assessed from human erythrocytes to solutions with a concentration of 5%. The presumptive antibacterial evaluation was carried out by successive dilutions for E. Coli ATCC25922. Mostly the twelve planned molecules showed promising results in relation to the co-crystallized ligands and the inhibition constants for the series of compounds, with APB being the most promising for all targets, mainly for oxacillinase when related both energetic aspects and inhibition constant having these ranged from -7.59 to -7.76 Kcal.mol $^{-1}$ and 2.75 to 2.06 nM for APB-03 and APB-02 respectively. The *in silico* pharmacokinetic predictions concluded that all compounds were consistent with the criteria of druglikeness established by Lipinski, Ghose and Egan, pharmacokinetics, toxicity and eco-toxicity. Further studies will be necessary in order to carry out new characterizations and to evaluate antibacterial and modulating activities *in vitro*. All the planned compounds were synthesized, with yields varying between 33.04 and 99.04%. Its purity can be assumed by the melting range technique, varying from 1 to 3 °C; in NMR spectroscopies they showed diagnostic signs indicating the success of the reaction, such as chemical shifts to hydrogen (8.19 ppm, s, 1H) and characteristic vinyl carbons (151 and 107 ppm). Hemolytic potentials could be assessed, which, with the exception of APB-02, showed values below 10%.

Keywords: Biomacromolecule. Modulation. Bioinformatics. Organic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do peptidoglicano, demonstradas os filamentos (a) N-acetilglicosamina e (b) ácido N-acetilmurâmico.....	17
Figura 2: Estrutura da parede celular bacteriana (a) Gram Positiva e (b) Gram Negativa.....	18
Figura 3: Formas de resistência bacteriana (a) alteração da permeabilidade, (b) Alteração do sítio de ação do antimicrobiano, (c) Mecanismo enzimático e (d) Bomba de efluxo.	20
Figura 4: Principais grupos de β -lactâmicos (a) Penicilinas, (b) cefalosporinas, (c) carbapenemos, (d) monobactamos.	23
Figura 5: Mecanismo de hidrólise do anel β -lactâmico pela enzima ESBL (β -lactamase de espectro estendido).	24
Figura 6: Representação estrutural dos antibióticos (a) cloxacilina, (b) amoxicilina e (c) ácido clavulânico.....	25
Figura 7: Estrutura base dos (a) cefalosporina, (b) monobactâmico, (c) cefamicinas e cefalosporinas, (d) carbapenemos e (e) tazobactamicos.....	26
Figura 8: (a) Estrutura do aztreonam, único antibiótico pertencente a classe dos β -lactâmicos que não é inativado pelas MBL e (b) EDTA, inibidor da atividade enzimática	27
Figura 9: (a) O sítio ativo é representado com os resíduos no formato de varas; (b) Sítio ativo da MBL. <i>Klebsiella pneumoniae</i> bi-Zn (II) -NDM-1 (B1, PDB 3spu); (c) meningoseptica mono-Zn (II) -GOB-18; (d) <i>Serratia fonticola</i> mono-Zn (II) -Sfh-I (B2, PDB 3sd9).....	28
Figura 10: Reação da serina com uma penicilina genérica formando um complexo acil-enzima que sofre uma hidrólise para a recuperação do sítio ativo.....	29
Figura 11: Estrutura do sulbactam, uma das substâncias capazes de inibir um subconjunto das serina- β -lactamases.....	29
Figura 12: Estrutura das moléculas hidrolisáveis pela enzima oxacilinase. (a) Oxacilina e cloxacilina quando o X representa um hidrogênio e um cloro respectivamente e (b) meticilina.	30
Figura 13: Estrutura dos principais antibióticos de diferentes mecanismos de ação.	32
Figura 14: Compostos empregados em estudos recentes relativos à adjuvante antimicrobiano.	34
Figura 15: Inibição não covalente e covalente. Em destaque a ligação reversível, ambos os tipos são inibidores.	36
Figura 16: Mecanismo de adição de uma acrilamida iniciado por uma cisteína tiol.	36
Figura 17: Representação dos ângulos Ψ e ϕ	44

Figura 18: Modelo genérico para a apresentação do gráfico Ramachandran com suas principais áreas destacadas.....	45
Figura 19: Estrutura dos compostos sintetizados por Pereira (2016) contendo carbonila α , β -insaturado.	50
Figura 20: Metodologia da diluição e controle para determinação da CIM.....	59
Figura 21: Redocking do 4Y0U	65
Figura 22: Redocking do 1IYO.....	66
Figura 23: Redocking do 3MTE.....	67
Figura 24: Redocking do 3MZE.....	67
Figura 25: Interações das moléculas APB-01, APB-02 e APB-03 com os resíduos de aminoácidos da macromolécula 4Y0U.....	71
Figura 26: Resíduos de aminoácidos e suas respectivas interações com a molécula co-cristalizada, ALP.	72
Figura 27: Resíduos de aminoácido do alvo 1IYO e suas respectivas interações com as moléculas APB-01, APB-02 e APB-03.....	77
Figura 28: Interação da Cefotaxime com a macromolécula 1IYO.....	78
Figura 29: Interações das moléculas APB-01, APB-02 e APB-03.	82
Figura 30: Interação do 1QL com a macromolécula 3MZE.....	83
Figura 31: Interações das moléculas APB-01, APB-02 e APB-03.	87
Figura 32: Interação do SAM com a macromolécula 3MTE.	88
Figura 33: Numeração dos hidrogênios para as estruturas.....	95
Figura 34: RMN ^1H para o composto AL-01	98
Figura 35: Numeração dos carbonos para as estruturas.	99
Figura 36: RMN ^{13}C para o AL-02.....	102
Figura 37: Possíveis locais de epoxidação dos compostos sintetizados, apontando quais possíveis são de ocorrer por meio de padrão de cores em seus devidos locais.	123
Figura 38: Possível reação de epoxidação para os compostos.	124
Figura 39: Locais onde há chances de ocorrer reação de desidrogenação.	125
Figura 40: Oxigenação Estável.....	127
Figura 41: Possíveis reações de oxidação estável.	128
Figura 42: Oxigenação Instável.....	129
Figura 43: Possíveis reações para a oxidação instável dos compostos	130
Figura 44: Locais onde podem ocorrer as reações de redução na Fase I de metabolização..	132
Figura 45: Possíveis reações de metabolização por redução.....	133

Figura 46: Possíveis locais onde podem ocorrer reações de hidrólise.	134
Figura 47: Possíveis reações de metabolização por hidrólise para os compostos AL e APB.	135
Figura 48: Locais onde podem ocorrer a UGT catálise.....	136
Figura 49: Score de reatividade para formação de adutos de Glutathione (GSH).	137
Figura 50: Adutos de proteína.	139
Figura 51: Adutos de DNA.....	142
Figura 52: Estrutura dos compostos com melhores resultados para a CIM da E. coli.	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos sintetizados por Santos (2017) e seus respectivos valores de CIM	49
Tabela 2: Nomenclatura padrão IUPAC para as moléculas sintetizadas.....	56
Tabela 3: Número de resíduos e suas respectivas percentagens para cada tipo de região das macromoléculas apresentadas	62
Tabela 4: Valores de redocking dos ligantes com suas enzimas.	64
Tabela 5: Docking molecular para as estruturas propostas e a enzima Oxacilinase representada pelo código 4Y0U, os melhores resultados estão destacados em negrito.	68
Tabela 6: Docking molecular para as estruturas propostas e a enzima ESBL representada pelo código 1IYO, os melhores resultados estão destacados em negrito.....	73
Tabela 7: Docking molecular para as estruturas propostas e a transpeptidase PBP representada pelo código 3MZE, os melhores resultados estão destacados em negrito.....	79
Tabela 8: Docking molecular para as estruturas propostas e a metiltransferase 16S rRNA representada pelo código 3MTE, os melhores resultados estão destacados em negrito.....	84
Tabela 9: Propriedades físico-químicas dos compostos.	93
Tabela 10: Resultado da análise por RMN de ¹ H dos compostos sintetizados, utilizando como solvente o DMSO deuterado.....	96
Tabela 11: Resultado da análise por RMN de ¹³ C dos compostos sintetizados.....	99
Tabela 12: Valores de Log Kp.....	107
Tabela 13: Classificação de alguns β-lactâmicos de acordo com o percentual de Ligação às Proteínas Plasmáticas	113
Tabela 14: Possibilidade da ocorrência de inibição das isoformas CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP1A2. Os resultados com valores negativos indicam a não inibição; os positivos, possibilidade de inibição.	115
Tabela 15: Estudo in silico da capacidade de atuar como substrato das isoenzimas CYP3A4, CYP2C9 e CYP2D6. Valores negativos indicam a chance de serem não substrato.	118
Tabela 16: Probabilidade in silico dos compostos atuarem como inibidor ou não inibidor dos transportadores OATP2B1, OATP1B1, OATP1B3, MATE1, OCT2 e BSEP.	120
Tabela 17: Carcinogenicidade binária e ternária.	141
Tabela 18: Corrosão e Irritação ocular.	144
Tabela 19: Toxicidade oral aguda.....	146
Tabela 20: Mutagenicidade (teste AMES), inibição do hERG (do inglês, human ether-a-go-go related gene), hepatotoxicidade.	147

Tabela 21: Eco-Toxicidade.....	149
Tabela 22: Potencial hemolítico das moléculas de estudo.....	151
Tabela 23: Concentração Inibitória Mínima dos compostos sintetizados frente à cepa de E. coli.	153

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Classificações do bioisosterismo clássico e não clássico com seus respectivos exemplos.....	43
Quadro 2: Interação dos compostos com os resíduos de aminoácido presente na macromolécula de código 4Y0U e suas devidas interações. A distância indicada em Å.	70
Quadro 3: Interação dos compostos com os resíduos de aminoácido presente na macromolécula de código 1IYO e suas devidas interações. A distância indicada em Å.....	76
Quadro 4: Interação dos compostos com os resíduos de aminoácido presente na macromolécula de código 3MZE. A distância indicada em Å.....	81
Quadro 5: Interação dos compostos com os resíduos de aminoácido presente na macromolécula de código 3MTE e suas devidas interações. A distância indicada em Å.....	86
Quadro 6: Estrutura e código dos compostos sintetizados.....	91
Quadro 7: Solubilidade dos compostos sintetizados.....	94

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1: Ramachandran para as macromoléculas 1IYO, 4Y0U, 3MTE e 3MZE.....	61
Gráfico 2: Comparação das energias livres para os compostos docados.....	69
Gráfico 3: Comparação das energias livres para os compostos docados.....	74
Gráfico 4: Comparação da energia livre de ligação para os compostos docados.....	80
Gráfico 5: Comparação da energia livre de ligação para os compostos docados.....	85
Gráfico 6: Log P dos compostos sintetizados, estudo in silico.....	104
Gráfico 7: Valores de Log S para os compostos estudados.....	105
Gráfico 8: Perfil teórico de absorção das moléculas sintetizadas.....	108
Gráfico 9: Resultados expressos em probabilidade de Absorção Intestinal Humana (AIH), Caco-2 e Biodisponibilidade Oral Humana.....	110
Gráfico 10: Distribuição in silico dos compostos sintetizados através da barreira hematoencefálica (BHE), P-gp Inibidor, P-gp substrato e Ligação às Proteínas Plasmáticas (LPP).....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
ALP	Ácido 2-(1-Carboxi-2-hidroxi-etil)-5,5-dimetil-tiazolidina-4-carboxílico
BHE	Barreira hematoencefálica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratorial Standards Institute
DRX	Difração de Raio-X
ESBL	<i>Extended-Spectrum Beta-Lactamase</i>
FBDD	<i>Fragment-Based Drug Discovery</i>
HAP	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
IBL	Inibidores de β -lactamase
ICD	Inibidor Covalente Direcionado
J	Constante de Acoplamento
K _i	Constante de inibição
LGA	<i>Generic Lamarckian Algorithm</i>
MBL	Metalo- β -lactamase
OXA	Oxacilinase
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Desvio quadrático médio do ligante
SAR	<i>Structure-activity relationship</i>
SBDD	<i>Strutucture-Based Drug Design</i>
SBL	Serina- β -lactamase
SNC	Sistema Nervoso Central
TGI	Trato gastrointestinal

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
ΔG	Energia Livre de Ligação
π	Pi
σ	Sigma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	16
2.1	Geral	16
2.2	Específico	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	Morfologia bacteriana	17
3.2	Resistência bacteriana	19
3.3	β -lactamase	22
3.3.1	Escherichia coli	25
3.3.2	β -lactamase de Espectro Estendido	25
3.3.3	Metallo- β -lactamase	26
3.3.4	Serina- β -lactamase	28
3.3.5	Oxacilina	29
3.4	Agentes antimicrobianos	30
3.5	Antibióticos Adjuvantes	33
3.5.1	Inibidores da β -lactamase	34
3.6	Aceptores de Michael como Inibidores	35
3.7	Química medicinal	38
3.7.1	Planejamento de fármacos	38
3.7.2	Descoberta de Fármacos Baseada no Grupo Farmacofórico (FBDD)	39
3.7.3	Descoberta de Fármacos Baseado na estrutura do alvo (SBDD)	40
3.7.4	Árvore de decisão de Topliss	41
3.7.5	Bioisosterismo	42
3.8	Estudos computacionais	44

3.8.2	Docking molecular.....	46
3.8.2.1	Protein Data Bank	47
3.8.2.2	Autodock.....	47
3.8.3	Predição farmacocinética in silico	48
3.9	Compostos carbonílicos α, β-insaturados	49
4	METODOLOGIA.....	51
4.1	Materiais	51
4.2	Estrutura molecular.....	51
4.3	Gráfico Ramachandran.....	52
4.4	<i>Docking</i> molecular	52
4.4.1	Preparação da enzima	52
4.4.2	Preparação dos ligantes.....	53
4.4.3	Validação do estudo de docking	53
4.5	Predições farmacocinéticas e toxicidade <i>in silico</i>	53
4.6	Síntese.....	54
4.7	Propriedades físico-químicas	56
4.7.1	Aparência.....	56
4.7.2	Solubilidade preliminar aparente.....	56
4.7.3	Fator de retenção.....	56
4.7.4	Faixa de fusão	57
4.7.5	Coefficiente de Partição	57
4.7.6	Espectroscopia de RMN	57
4.8	Teste de hemólise.....	57
4.9	Concentração inibitória mínima.....	58
4.9.1	Cepas testadas	58
4.9.2	Teste por microdiluição	58
4.9.3	Padronização da suspensão bacteriana	58

4.9.4	Teste da avaliação antibacteriana	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	Gráfico Ramachandran	61
5.2	<i>Docking</i> molecular	63
5.2.1	Redocking	63
5.2.1.1	Docking molecular da interação com a macromolécula 4YOU	67
5.2.2	Docking molecular da interação com a macromolécula 1IYO	73
5.2.3	Docking molecular da interação com a macromolécula 3MZE	78
5.2.4	Docking molecular da interação com a macromolécula 3MTE	83
5.3	Síntese e caracterização físico-química	89
5.3.1	Mecanismo reacional	89
5.3.2	Características físico-químicas	92
5.4	Caracterização estrutural.....	94
5.4.1	Ressonância Magnética Nuclear	94
5.4.1.1	RMN ¹ H	95
5.4.1.2	RMN ¹³ C	99
5.5	Predições farmacocinéticas	103
5.6	Teste de hemólise.....	150
5.7	Concentração Inibitória Mínima.....	152
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	156
	APÊNDICE A – DOCKING MOLECULAR.....	185
	APÊNDICE A.25 – <i>Docking</i> molecular: interação AL-01 com 3MZE.....	198
	APÊNDICE A.26 – <i>Docking</i> molecular: interação AL-02 com 3MZE.....	198
	APÊNDICE A.27 – <i>Docking</i> molecular: interação AL-15 com 3MZE.....	199
	APÊNDICE A.28 – <i>Docking</i> molecular: interação APB-01 com 3MZE.	199

APÊNDICE A.29 – <i>Docking</i> molecular: interação APB-02 com 3MZE.	200
APÊNDICE A.30 – <i>Docking</i> molecular: interação APB-03 com 3MZE.	200
APÊNDICE A.31 – <i>Docking</i> molecular: interação APC-01 com 3MZE.	201
APÊNDICE A.32 – <i>Docking</i> molecular: interação APM-01 com 3MZE.	201
APÊNDICE A.33 – <i>Docking</i> molecular: interação APM-02 com 3MZE.	202
APÊNDICE A.34 – <i>Docking</i> molecular: interação APM-03 com 3MZE.	202
APÊNDICE A.35 – <i>Docking</i> molecular: interação EE-03 com 3MZE.	203
APÊNDICE A.36 – <i>Docking</i> molecular: interação EE-06 com 3MZE.	203
APÊNDICE A.37 – <i>Docking</i> molecular: interação AL-01 com 3MTE.	204
APÊNDICE A.38 – <i>Docking</i> molecular: interação AL-02 com 3MTE.	204
APÊNDICE A.39 – <i>Docking</i> molecular: interação AL-15 com 3MTE.	205
APÊNDICE A.40 – <i>Docking</i> molecular: interação APB-01 com 3MTE.	205
APÊNDICE A.41 – <i>Docking</i> molecular: interação APB-02 com 3MTE.	206
APÊNDICE A.42 – <i>Docking</i> molecular: interação APB-03 com 3MTE.	206
APÊNDICE A.43 – <i>Docking</i> molecular: interação APC-01 com 3MTE.	207
APÊNDICE A.44 – <i>Docking</i> molecular: interação APM-01 com 3MTE.	207
APÊNDICE A.45 – <i>Docking</i> molecular: interação APM-02 com 3MTE.	208
APÊNDICE A.46 – <i>Docking</i> molecular: interação APM-03 com 3MTE.	208
APÊNDICE A.47 – <i>Docking</i> molecular: interação EE-03 com 3MTE.	209
APÊNDICE A.48 – <i>Docking</i> molecular: interação EE-06 com 3MTE.	209
 APÊNDICE B – ESPECTROS DE RMN	 210

ANEXO C – MECANISMO REACIONAL PARA MORFOLINA.....223

1 INTRODUÇÃO

Diversas mortes causadas por infecções são contabilizadas em todo mundo acometendo principalmente os neonatais (KEIJ et al., 2019), crianças (SINGH et al., 2019) e idosos (GHARBI et al., 2019). Atualmente, 700 mil pacientes morrem em decorrência da resistência à antimicrobianos (GHOSH et al., 2018).

Se tratando dos neonatos com até 90 dias de nascidos, 53% dos casos de infecções, as culturas possuíam resistência à ampicilina, um dos tipos mais comuns de penicilina de origem semissintética (MAH; VANDERKOOI; JOHNSON, 2019). Nos estudos realizados por Cinar et al. (2019) com 142 pacientes bacteriêmicos adultos de 20 a 65 anos de idade revelou que houve 60% de mortalidade dos pacientes por motivos infecciosos sendo todas causadas por *Enterobacteriaceae* produtora de carbapenemos.

Estas bactérias foram indicadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como sendo o grupo prioritário dos patógenos para os quais a demanda de novos antimicrobianos seria urgente; se destacando entre elas a *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* responsáveis por infecções em pacientes de várias faixas etárias especialmente por apresentarem multirresistência a diversos antibióticos β -lactâmicos como a oximino cefalosporina hidrolase e monobactâmicos (MALANDE et al., 2019).

Atualmente 40% das cepas mais comuns possuem resistência à penicilina, levando a preocupação principalmente na esfera hospitalar pois neste local muitos dos pacientes possuem sistema imunológico deficiente ficando susceptíveis às infecções (JELINKOVA et al., 2019; SIERRA-DIAZ; HERNANDEZ-RIOS; BRAVO-CUELLAR, 2019).

A biossíntese de estruturas ou substâncias celulares essenciais à vida bacteriana. Entretanto, os microorganismos são capazes de sofrer adaptação, alterando processos fisiológicos, gerando resistência. Entre os mecanismos de resistência, a habilidade de produção da enzima β -lactamase que algumas variedades de bactérias exibem é capaz de degradar por hidrólise uma classe específica de fármacos que contém anel β -lactâmico. Este anel faz parte da maioria dos fármacos direcionados ao tratamento de infecções bacterianas, isto inclui a penicilina (NAKADOMARI et al., 2019). Sem a hidrólise promovida pelas β -lactamases, estes antibióticos inibiriam a síntese da parede celular bacteriana e conseqüentemente induziria uma lise osmótica (BAYLAY; PIDDOCK; WEBBER, 2019).

Com o propósito de impedir a hidrólise do anel β -lactâmico a utilização de um composto, conhecido como antibióticos adjuvantes, se torna uma estratégia viável para a redução da resistência bacteriana sem ter que idealizar um novo antibiótico para tal. Sua utilização tem importância aumentada quando se considera que este pode ser um caminho mais rápido para a aplicação clínica. Os adjuvantes mais comuns possuem estrutura pequena, que ao adentrar na bactéria a sensibiliza, permitindo que o antimicrobiano aja sem o impedimento total da resistência (WOZNIAK et al., 2019).

A possibilidade de obter a topologia das enzimas em banco de dados virtuais, torna possível o desenho de compostos inéditos capazes de atuar no alvo farmacológico. Utilizando de uma estratégia viável da química medicinal como o desenho de novos fármacos baseados na estrutura do alvo biológico (SBDD) possibilita-se o desenvolvimento dos mais promissores em detrimento aos falhos para determinado alvo (NEVILLE; JIA, 2019).

Por intermédio de estudos *in silico* como o *docking* molecular, possibilita-se observar as interações através das energias livre de Gibbs com o alvo bem como pode ser previsto os valores teóricos para constante de inibição. Sabendo os resíduos de aminoácidos com os quais os compostos interagem, é possível sugerir possíveis mecanismos onde haja a inativação enzimática (SKARIYACHAN; MANJUNATH; BACHAPPANAVAR, 2019). No presente estudo, as moléculas avaliadas funcionariam como inativadores irreversíveis, atuando com base no mecanismo (*mechanism-based inactivators*) que leva a modificações covalentes na estrutura, impedindo a ação da enzima sobre o seu substrato comum. Além do mecanismo de resistência também foram direcionadas para o efeito antibacteriano. No caso das β -lactamases, os substratos são os fármacos β -lactâmicos como a penicilina, amoxicilina, cefalosporina, entre outros (CUI et al., 2020).

A inativação das β -lactamases pode ocorrer através de reações de adição do tipo Michael, os compostos planejados teriam a função de aceptores vistos que possuem carbonos α , β -insaturados em relação a carbonila. Os compostos provenientes da reação de Knoevenagel derivados da malonitrila, apesar de não possuírem a carbonila podem, de maneira semelhante atuar como aceptores de Michael frente à reação de adição na enzima (HAYASHI et al., 2019). Logo, ao formarem ligação covalente com a β -lactamase atuando como antibiótico adjuvante impede a hidrólise dos anéis β -lactâmicos, deixando-os livres para agir na inibição da síntese da parede celular (BRADDOCK; THEODORAKIS, 2019).

Os derivados de compostos α , β - insaturados podem também ser utilizado em outras diretrizes como o acceptor de Michael CRA-3316 que demonstrou promissores resultados como inibidor para o tratamento da doença de Chagas em ensaios clínicos. Outro acceptor de Michael, o AG7088 (Ruprintrivir), pode ser implementado na II fase clínica para estudos em humanos como um agente antiretroviral administrado por via nasal sendo esta estrutura tomada como base para o tratamento de síndrome respiratória aguda grave demonstrando ser um potencial agente antiviral contra o SARS-CoV coronavirus (EKICI et al., 2006).

Com este propósito a idealização de novos fármacos capazes de inativar a β -lactamase constitui uma estratégia que pode ser eficiente para a redução da resistência bacteriana aos β -lactâmicos, otimizando a ação de antimicrobianos. A interação com outras enzimas bacterianas também fora avaliada como a metiltransferase 16S rRNA e a transpeptidase (PBP) para melhor adequar os compostos como possíveis adjuvantes e antimicrobianos. Além disso, aspectos farmacocinéticos e toxicológicos puderam ser avaliados para identificar prováveis compostos seguros e eficazes.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Planejar, sintetizar e avaliar compostos α , β -insaturados e sua capacidade de atuar como possíveis antimicrobianos e inibidores de β -lactamase.

2.2 Específico

- Idealizar as moléculas por meio de ferramentas computacionais;
- Sintetizar as moléculas de estudo;
- Elucidar as estruturas por métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono,
- Determinar as propriedades físico-químicas dos compostos sintetizados;
- Avaliar a toxicidade preliminar por meio de hemólise.
- Utilizar o teste de concentração inibitória mínima como meio presuntivo de identificação da atividade antibacteriana.
- Realizar estudos farmacocinéticos e toxicológicos *in silico*.

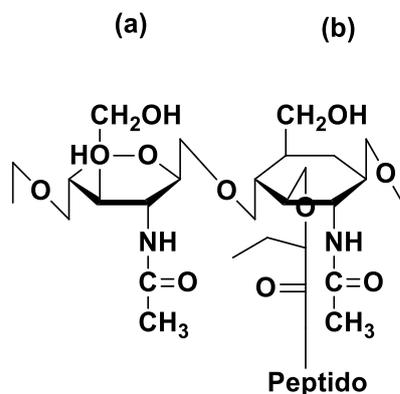
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Morfologia bacteriana

A primeira barreira que um fármaco deve enfrentar assim que chega nas periferias da célula microbiana é a parede celular. Sua morfologia classifica as bactérias de acordo com a capacidade em aderir ou não a coloração de Gram sendo elas Gram positiva ou Gram negativa, relacionando-as diretamente com a resistência bacteriana. Infecções do trato urinário, reconhecidas como uma das enfermidades mais comuns relacionada às bactérias, são causadas prioritariamente por microrganismos Gram negativos sendo a *Escherichia coli* a mais relevante, podendo ainda ser ocasionada por outros microrganismos de mesma morfologia como *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.*, prevalecendo em detrimento a ocorrência dos Gram positivos como *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus agalactiae* e o *Enterococcus spp.* (COUTINHO et al., 2019).

A estrutura da parede celular é composta por peptidoglicanos - filamentos unidimensionais de *N*-acetilglicosamina e ácido *N*-acetilmurâmico (Figura 1) - que ao ser ligado transversalmente pelas transpeptidases através de aminoácidos (peptido) forma o peptidoglicano maduro (SERAFIN; RUIZ, 2018). Dependendo da forma que os peptidoglicanos se encontram distribuídos na parede celular pode-se atribuir uma morfologia para aquela determinada bactéria, classificando-a como Gram positiva ou Gram negativa (GARCIA; SANTOS; QUEIROZ, 2018).

Figura 1: Estrutura do peptidoglicano, demonstradas os filamentos (a) *N*-acetilglicosamina e (b) ácido *N*-acetilmurâmico.



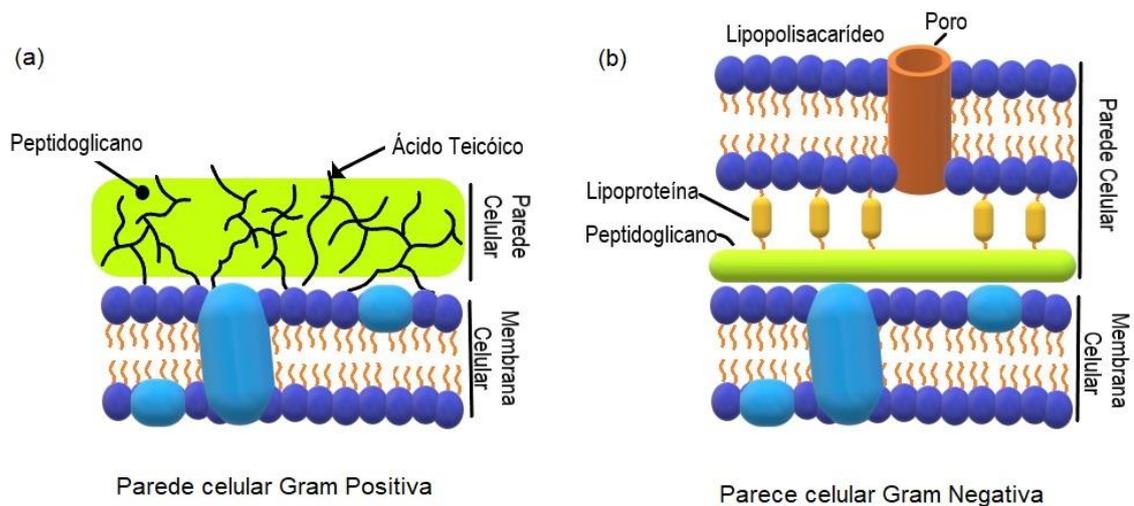
Fonte: Autoria (2020).

Como característica geral para as Gram positivas há uma camada espessa de peptidoglicano e também presença de ácido teóico, um polissacarídeo responsável pela

regulação das autolisinas, aderência a célula do hospedeiro e como antígeno para a sorotipificação (LIMA et al., 2019).

Como mostra a Figura 2, as bactérias Gram negativas são mais complexas em relação a positiva, possuindo uma fração menor de peptidoglicano na parede celular, porém acaba sendo mais complexa pela quantidade de aminoácidos e lipídios presentes. Uma camada de lipopolissacarídeo juntamente com uma de lipoproteína confere a bactéria Gram negativa uma resistência maior em relação a Gram positiva (OGAWA et al., 2019). A parede celular Gram negativa possui ainda um espaço periplasmático que é situado entre a membrana externa e a citoplasmática (ESLAHI et al., 2020). A entrada facilitada de moléculas ionizadas depende de porinas, pois moléculas polares e carregadas não passam pela membrana (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2019).

Figura 2: Estrutura da parede celular bacteriana (a) Gram Positiva e (b) Gram Negativa.



Fonte: Autoria (2020).

A parede celular é responsável por fornecer à bactéria uma estabilidade mecânica de suma importância para o desenvolvimento, crescimento e manutenção da célula, promovendo uma resistência à possíveis agentes deteriorantes de sua estrutura. De um modo geral, as bactérias Gram negativas são mais resistentes a penetração de fármacos em relação às positivas, isto ocorre devido à sua complexidade estrutural que impedem antibióticos de cruzar efetivamente a membrana externa. Os fármacos que possuem melhor atividade frente as Gram negativas são aqueles que apresentam grupos ionizáveis em sua estrutura química de forma a serem capazes de atravessar o interior hidrofílico das porinas (SWIMBERGHE et al., 2019).

Além da influência relativa à morfologia celular para a resistência bacteriana, o mecanismo enzimático contribui eficientemente pois influencia na capacidade das bactérias de degradar determinados agentes antimicrobianos, impedindo a sua ação. Uma das primeiras enzimas oriundas do processo de adaptação dos microrganismos frente aos antibióticos é a β -lactamase, a qual pode ser produzida por bactérias tanto Gram positivas quanto negativas sendo capazes de hidrolisar anéis β -lactâmicos, tornando-os fármacos inativos (TOOK et al., 2019).

3.2 Resistência bacteriana

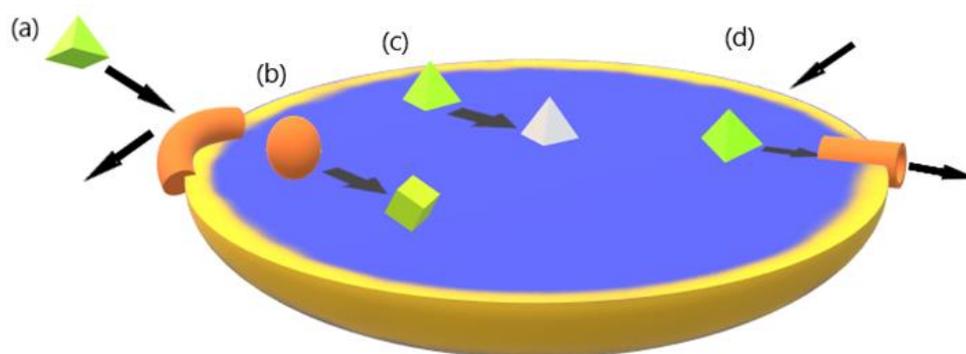
O desenvolvimento de antimicrobianos prevalece como uma solução simples e eficaz para o tratamento de infecções (MACLEAN; MILLAN, 2019). No entanto a resistência bacteriana surge como um problema, que pode ocorrer devido a utilização inadequada de antibióticos, implicando na multirresistência destes microrganismos (LIU et al., 2019).

Se o atual cenário se mantiver, os modelos matemáticos preveem que em 2050 cerca de 10 milhões de pessoas morrerão em todo mundo decorrentes de infecções (MARTINEZ; GOMEZ, 2019). A resistência a antibióticos é gerada principalmente por uma adaptação acelerada das bactérias, visto que seu tempo de replicação possui um curto intervalo (ABDI; MIRKALANTARI; AMIRMOZAFARI, 2019). As bactérias podem ainda obter genes de resistência por meio da introdução de DNA estranho transferido a ela por outras bactérias, podendo estas serem de gênero ou espécie diferentes (XAVIER et al., 2019).

Deste modo, para que as bactérias consigam sobreviver ao meio é necessário que percebam o ambiente e haja uma adaptação, sendo realizado um processo denominado *Quorum Sensing* caracterizado pela liberação de sinais químicos secretados a partir de células, induzindo diversas alterações (OKAMOTO et al, 2019).

O desenvolvimento de mecanismos de resistência como a alteração da permeabilidade e do sítio de ação, bomba de efluxo e mecanismo enzimático gera adaptação que promove ineficiência dos antibióticos frente às cepas resistentes, ocasionando mais mortes por infecções (FREITAS et al, 2019). O Esquema geral das formas de resistência bacteriana pode ser observado na Figura 3.

Figura 3: Formas de resistência bacteriana (a) alteração da permeabilidade, (b) Alteração do sítio de ação do antimicrobiano, (c) Mecanismo enzimático e (d) Bomba de efluxo.



Fonte: Aatoria (2020).

3.2.1 Alteração da Permeabilidade

Para que determinado fármaco atue é necessário que alcance o alvo no meio intracelular de forma que possa se ligar com o seu alvo, porém se a célula não permitir que este o faça, de forma que o fármaco continue no meio periplasmático, então não ocorrerá a ligação com o alvo e a bactéria irá resistir a este antibiótico (MARTINS et al., 2020).

A parede celular das Gram negativas possui uma membrana externa que resulta em uma maior impermeabilidade em relação as Gram positivas que não as possui, sendo assim a ação da permeabilidade é um mecanismo de resistência exclusivo das bactérias Gram negativas (ANDRADE; DARINI, 2017). A presença de algumas proteínas especiais, os poros ou porinas, formam um canal seletivo que comunica o meio periplasmático com o exterior da célula. É esta seletividade que torna a permeabilidade limitada, sendo assim o antimicrobiano não consegue atingir o seu sítio alvo (SERAFIM; RUIZ, 2018).

Para o caso de a bactéria enfrentar novos fármacos, há a possibilidade de ocorrer uma mutação no seu genoma que conferirá uma alteração na permeabilidade da membrana por modificações na estrutura das porinas ou mesmo sua perda gerando respectivamente uma permeabilidade mais seletiva ou impermeabilidade frente às drogas, promovendo assim a resistência ao novo fármaco (OLIVEIRA et al, 2018).

Algumas bactérias são mais susceptíveis a estas alterações da permeabilidade, podendo ser citadas as *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* e *P. aeruginosas* que podem proporcionar uma redução de 4 a 8 vezes a sensibilidade à antibióticos como cefotaxima e ao cefepime,

podendo também pouco afetar aos carbapenêmicos como o meropenem e ertapenem (AKBAR et al., 2020).

3.2.2 Alteração do Sítio de Ação de Antimicrobianos

Boa parte dos fármacos são direcionados a um ou mais alvos da célula, assim com as mutações decorrentes da adaptação geradas a partir do *Quorum Sensing*, as bactérias alteram a estrutura do alvo do antibiótico impedindo sua eficiente ligação, ou podem ainda diminuir a afinidade desta interação sem interferir na função que a macromolécula desenvolve. Deste modo, não há o reconhecimento do alvo na célula bacteriana e esta mantém seu funcionamento íntegro (DUARTE et al., 2019).

O mecanismo pode ocorrer de diferentes maneiras, porém o objetivo principal é o mesmo, de que o antimicrobiano não reconheça o alvo. O exemplo mais conhecido é a alteração do PBP (*Penicillin-Binding-Protein*) no qual há a modificação da proteína de ligação à penicilina. Sendo assim as bactérias após sofrerem mutações desenvolvem uma resistência aos fármacos que possuem anel β -lactâmico em sua estrutura (MIRYALA; ANBARASU; RAMAIAH, 2020). Tal resistência é adquirida por meio da inserção de um elemento genético, o SCCmec (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*), que carrega o gene *mecA* produzindo uma PBP alterada, a PBP 2A. Pode ocorrer também a alteração da estrutura do peptidoglicano em que ocorre a inibição das enzimas que participam de sua construção (ROLO et al., 2017).

As mutações do PBP podem ter origem de genes cromossômicos em *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. mitis* e *N. gonorrhoeae* conferindo-os variada resistência aos β -lactâmicos. Quando há ocorrência da resistência induzida pela alteração de uma PBP e sendo detectada a resistência à oxacilina, esta também será válida para os demais antibióticos β -lactâmicos disponíveis e o tratamento deverá ser realizado com fármacos glicopeptídicos como a vancomicina e teicoplanina ou com os que demonstrarem sensibilidade no antibiograma (KÄRPÄNOJA et al., 2017).

3.2.3 Bomba de Efluxo

Como qualquer ser vivo as bactérias possuem um mecanismo natural de excreção de substâncias tóxicas, sendo assim, elas podem considerar como sendo tóxico algum fármaco específico ou, de forma inespecífica, a excreção de diversos fármacos. Para as bactérias Gram negativas a expulsão destas substâncias indesejáveis é realizada através de um sistema composto pelas proteínas transmembrana interna (bomba de efluxo) (BOLLA et al., 2020).

O sistema de efluxo para as bactérias Gram negativas é composto por uma proteína transmembrana interna e uma externa conectadas por uma proteína que faz a ligação, o chamado sistema tripartido ou multicomponentes. Para as Gram positivas que não possuem membrana externa o sistema de efluxo é a própria bomba de efluxo (PAL; TRIPATHI, 2020).

Pode-se classificar o sistema de bomba de efluxo de acordo com a fonte de energia utilizada, a relação filogenética com outros sistemas de efluxo e a especificidade do substrato. (BOGOMOLNAYA et al., 2020). Entretanto, por se tratar de um sistema inespecífico pode excretar diferentes tipos de antibióticos que se diferem em classes ou subclasses ou ocorrer ainda atividade específica para um fármaco (REZA; SUTTON; RAHMAN, 2019).

3.2.4 Mecanismo Enzimático

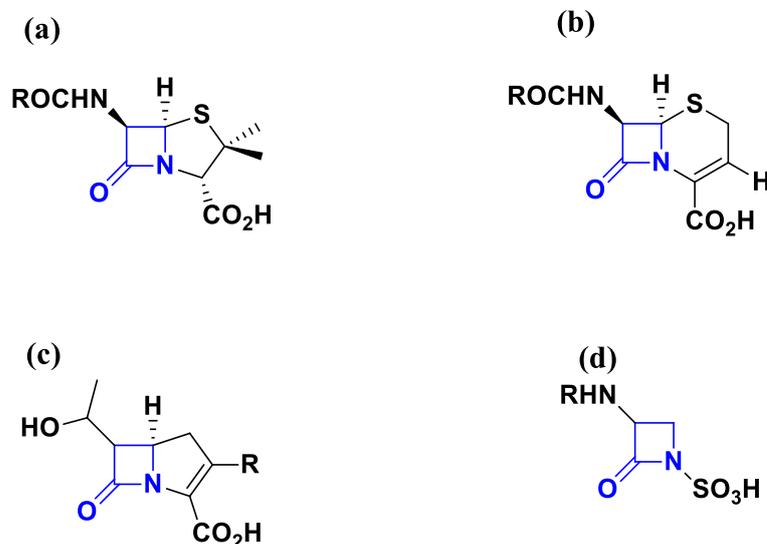
Se nenhum dos obstáculos anteriores conseguir intervir na ação do fármaco, as bactérias podem produzir ou adquirir enzimas capazes de degradar ou modificar o antibiótico por catálise hidrolítica destas moléculas. Uma das principais enzimas que degradam o anel β -lactâmico é a β -lactamase, levando a perda da ação do antimicrobiano sobre a bactéria, a qual continua fazendo a síntese da parede celular normalmente (REDDY et al., 2020).

3.3 β -lactamase

Sendo um dos principais mecanismos de resistência bacteriana, a β -lactamase é capaz de inativar os β -lactâmicos, compreendendo cerca de 50 a 70% dos medicamentos antibacterianos existentes (CHEN et al., 2019). Por possuir uma alta capacidade bactericida e baixa toxicidade, esta classe de antibióticos se torna largamente utilizadas. Como consequência do consumo exacerbado da população a estes medicamentos as bactérias desenvolveram uma enzima que pode ser transferida às outras de mesma ou diferentes espécies, capaz de degradar estes fármacos (BURNS et al, 2018).

Os antimicrobianos β -lactâmicos podem ser caracterizados pela presença do anel β -lactâmico que dá nome a classe. Como se observa na Figura 4, possui em sua estrutura uma parte principal (indicada em azul), fundido a um ciclo de cinco ou seis membros. Seu principal modo de ação é por inibição da síntese da parede celular, evitando a formação de peptidoglicanos (principal componente da parede celular) por meio do impedimento da reação de transpeptidação, o que implica na lise celular (BEZZERA et al., 2017). Entre os β -lactâmicos há quatro grupos principais: as penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactamos; os quais suas estruturas químicas estão também representadas na Figura 4 (PICARD et al., 2019).

Figura 4: Principais grupos de β -lactâmicos (a) Penicilinas, (b) cefalosporinas, (c) carbapenemos, (d) monobactamos.

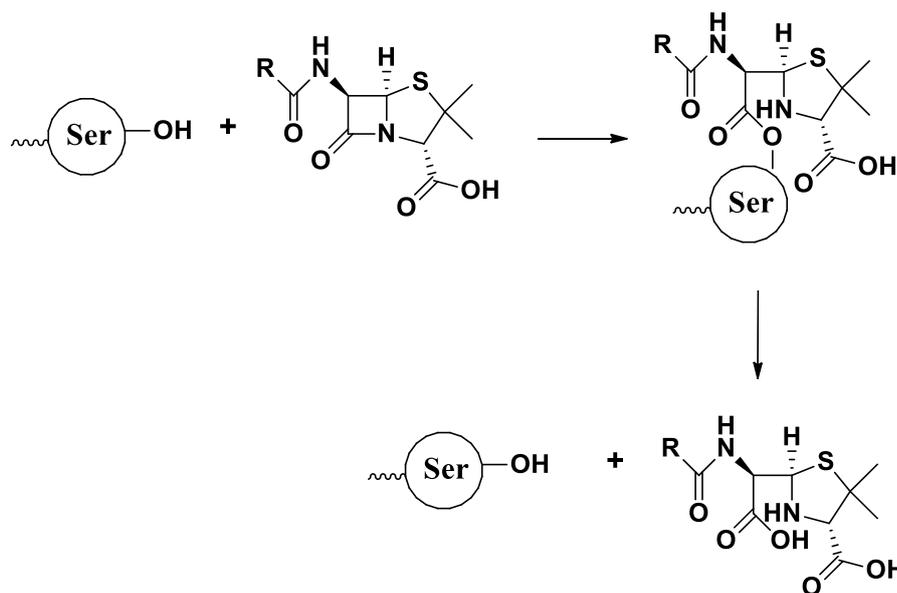


Fonte: Aatoria (2020).

Durante estudos relativos ao uso da Penicilina na prática médica a descoberta da β -lactamase pôde ser inicialmente identificada na *Escherichia coli*. A capacidade de resistência, via produção enzimática que estas bactérias adquiriram está relacionada com a quantidade de enzima produzida, habilidade de hidrolisar e com a velocidade em que o antibiótico penetra a membrana externa (WANG et al., 2019).

As β -lactamases detêm grande capacidade hidrolítica, principalmente quando se trata das bactérias Gram negativas resistente a múltiplas drogas (NAAS et al., 2017). A hidrolise do anel β -lactâmico leva a formação do ácido penicilóico que pode ser observado na Figura 5 (STEFANIAK et al, 2017).

Figura 5: Mecanismo de hidrólise do anel β -lactâmico pela enzima ESBL (β -lactamase de espectro estendido).



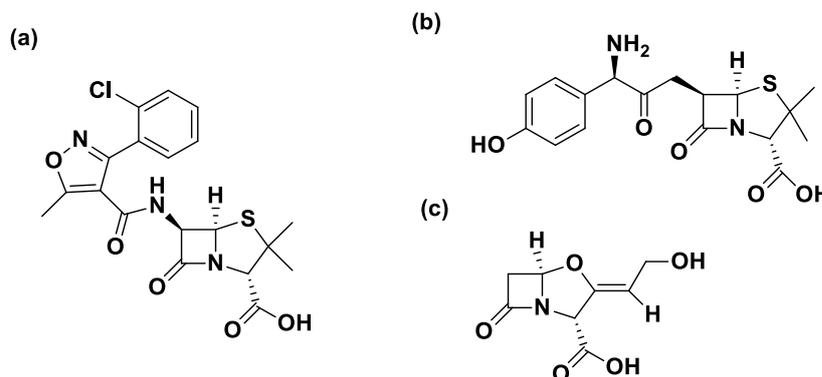
Fonte: Autoria (2020).

A abertura dos anéis pode ser causada pela instabilidade química proveniente do sistema bicíclico tensionado, ficando susceptível ao ataque nucleofílico, o que proporciona a hidrólise do grupo farmacofórico. O grupo alcóxi livre oriundo do resíduo de serina, pertencente ao sítio ativo das PBPs (*Penicillin Binding Protein*), ataca o anel β -lactâmico originando um grupo acil-éster covalente, sequencialmente o antibiótico degradado sofre hidrólise de forma a liberar o sítio ativo para novas catálises (URBINA-DAZA et al., 2019).

As β -lactamases estão presentes nos microrganismos mais comuns. Como visto em estudos relativos a infecções do trato urinário no período de 2012 a 2017, cerca de 88,2 % das amostras colhidas, os uropatógenos que prevaleciam eram de 52,2 % de *Escherichia coli* e 16,4 % de *Streptococcus sp.* Destas amostras 52,9% eram resistentes em maiores índices para a Ampicilina (COUTINHO et al., 2019).

Quando analisados os fenótipos da *E. coli* provenientes de infecções entéricas, todas as cepas eram resistentes a pelo menos um antimicrobiano, sendo 89% resistentes ao ácido nalidíxico, 83% à cloxacilina e 69% à amoxicilina-ácido clavulânico, estes dois últimos pertencem a classe dos antibióticos β -lactâmicos, suas estruturas podem ser visualizadas na Figura 6 (MONTERROSO et al., 2019).

Figura 6: Representação estrutural dos antibióticos (a) cloxacilina, (b) amoxicilina e (c) ácido clavulânico.



Fonte: Autoria (2020).

3.3.1 *Escherichia coli*

Componente da família das *Enterobacteriales*, a *E. coli* é uma bactéria Gram negativa que causa diversas infecções graves compreendendo as que acometem ao trato urinário, feridas operatórias, corrente sanguínea até sepse. As cepas pertencentes desta espécie são destacadas por sua capacidade de aderência aos tecidos, favorecendo sua multiplicação (DINIZ; SANTOS, 2019).

Apesar de existirem na microbiota natural de vários animais de sangue quente a *Escherichia coli* pode ser transportada pelas fezes e encontrada em diversos locais, causando infecções extra intestinais. Estas cepas são largamente associadas à aquisição de novos genes responsáveis pela resistência a antibióticos, gerando impactos clínicos e econômicos, seu aumento acarreta desafios para a química medicinal (MANGES et al., 2019). Estes são devido, principalmente aos diversos tipos de β -lactamase que podem ser produzidos ou incorporados por estas bactérias, no qual os principais relatos são as de β -lactamase de espectro estendido (VAN HOEK et al., 2019), metalo- β -lactamases (PARK et al., 2019), serina- β -lactamase (BIAGI et al., 2019) e oxacilinas (TOMIĆ PARADŽIK et al., 2019).

3.3.2 β -lactamase de Espectro Estendido

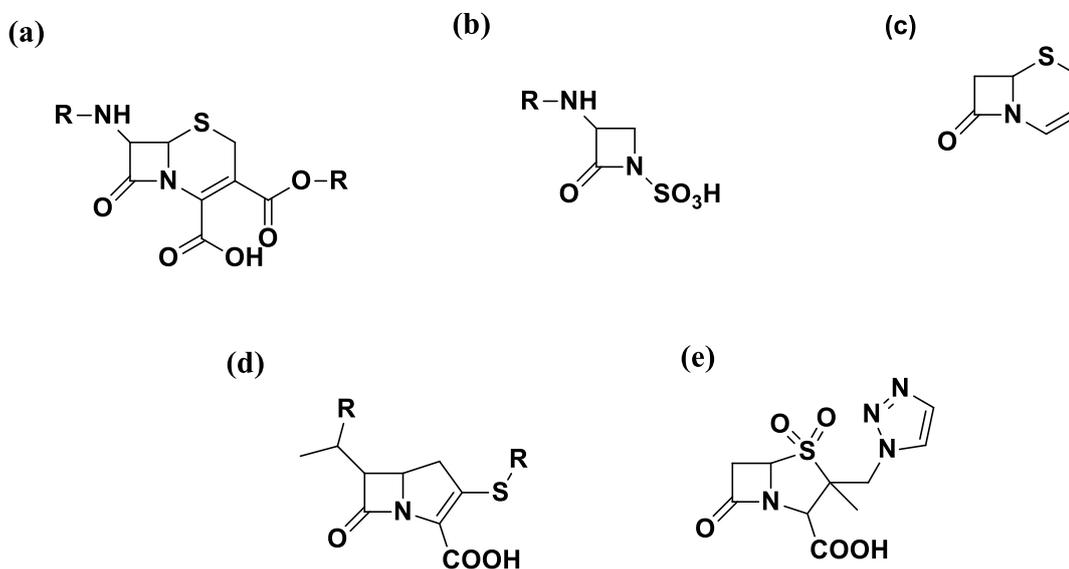
Um dos mecanismos mais importantes para a resistência as cefalosporinas de terceira geração das *Enterobacteriales*, as β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL, do inglês *Extended-Spectrum Beta-Lactamase*) podem ser encontradas especialmente na *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (GONZALES et al., 2019). Por se tratar de um sério problema em escala mundial a inibição das ESBL é de suma importância visto que as bactérias que as produzem são resistentes a maior parte dos β -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas podendo

ser co-resistentes a outros compostos como as fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e trimetopim (FAGERSTROM et al., 2019).

Muitas das epidemias hospitalares decorrentes desta enzima estão associadas ao profissional de saúde que atua como veículo de transmissão entre os pacientes. A habilidade de produzir as ESBL pode ser adquirida por genes responsáveis pela formação do mecanismo desta lactamase, localizada no plasmídeo. Estes genes se propagam rapidamente, não sendo exclusivo de determinada espécie (WOLNY-KOŁADKA; LENART-BOROŃ, 2016).

Esta multirresistência às drogas é possibilitada pela ocorrência da hidrólise de oximino cefalosporinas (representada pela Figura 7.a e sua cadeia lateral representa por R uma oximina) resistentes à β -lactamases comuns e monobactâmicos (Figura 7.b). Além disso, esta enzima não é capaz de ser inativada pelas cefamicinas (Figura 7.c) e carbapenemos (Figura 7.d). A solução para a inibição da ESBL fica a critério do ácido clavulânico (Figura 4.c) e tazobactâmicos (Figura 7.e) (MALANDE et al., 2019).

Figura 7: Estrutura base dos (a) cefalosporina, (b) monobactâmico, (c) cefamicinas e cefalosporinas, (d) carbapenemos e (e) tazobactâmicos.



Fonte: Autoria (2020).

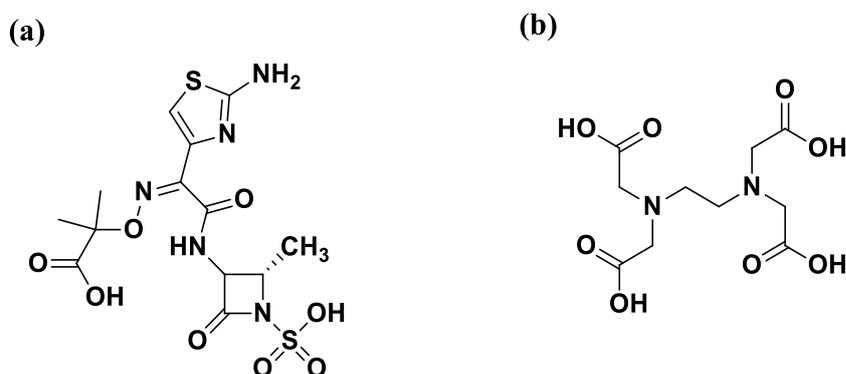
3.3.3 Metallo- β -lactamase

Outro tipo de β -lactamase que causa preocupação em todo o mundo são as metallo- β -lactamase (MBL). Estas enzimas são do tipo pletrópicas, podendo hidrolisar uma ampla variedade de substratos que incluem os β -lactâmicos e DNA ou RNA. Isto é possível pela gama de reações químicas que podem ser realizadas, nas quais várias atividades catalíticas,

regulatórias e estruturais são baseadas. Sendo possibilitadas pelas variações na composição e no tamanho dos loops localizados próximo ao sítio ativo (COLSON et al., 2019). As MBLs são facilmente integradas em diferentes famílias de bactérias como as da *Enterobacteriaceae* por meio da inserção no plasmídeo ou cromossomo (AMINI; NAMVAR, 2019).

As MBLs possuem atividade contra os carbapenemos, terceira e quarta geração de cefalosporinas e todos os outros antibióticos β -lactâmicos com exceção do aztreonam (Figura 8.a), tornando a descoberta de novos inibidores uma urgência (MOMBINI et al., 2019). Esta atividade enzimática pode ser inibida por agentes quelantes como o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (Figura 8.b) (CHANG et al., 2019).

Figura 8: (a) Estrutura do aztreonam, único antibiótico pertencente a classe dos β -lactâmicos que não é inativado pelas MBL e (b) EDTA, inibidor da atividade enzimática



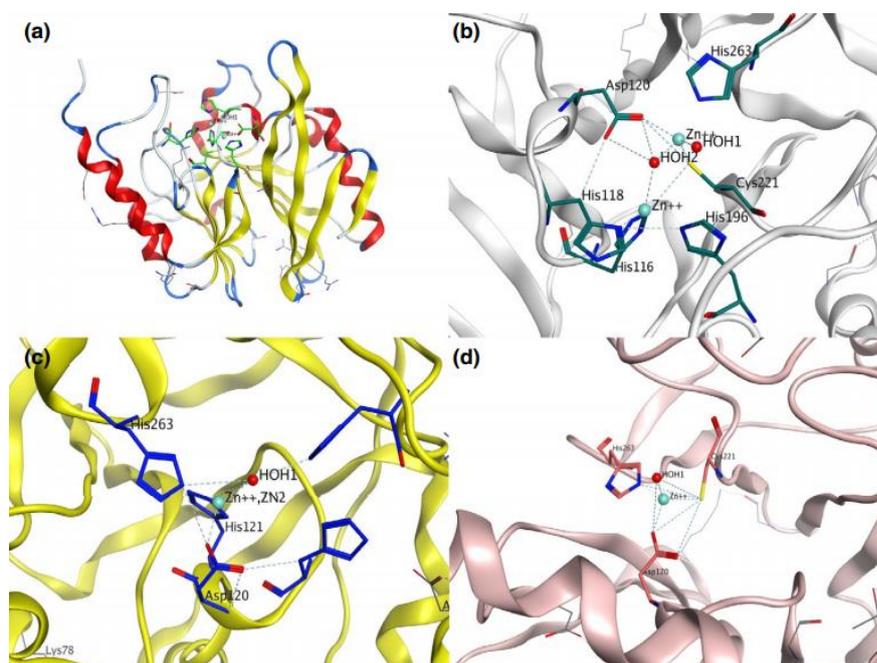
Fonte: Própria

Baseando-se na classificação de Ambler as MBLs requerem um ou dois íons de zinco como reagente nucleófilo (Figura 9) (SHI et al., 2019). As enzimas podem possuir dois íons metálicos nos seus sítios de ligação que consiste em três resíduos de histidina coordenados com o primeiro íon e a cisteína; histidina e ácido aspártico se ligando ao segundo íon. Ou ainda podem possuir o sítio ativo formado por uma asparagina ou glutamina e dois resíduos de histidina para o primeiro íon; e cisteína, histidina e ácido aspártico para o segundo íon metálico (KIM et al., 2019).

Algumas substâncias puderam ser sintetizadas ou obtidas na natureza e avaliadas como possíveis inibidores das MBLs como os derivados tioéster (KAUSHIK et al., 2019), álcool trifluormetil e cetonas (MCGEARY; TAN; SCHENK, 2017), tióis (MALEKI et al., 2019), sulfonil hidrazonas (ARJOMANDI; KAVOOSI; ADIBI, 2019), produtos naturais tricíclicos (KALEKO; CONNELLY, 2020), derivados do ácido succínico (SHI et al., 2019), derivados do

1- β -metilcarbapenem (AGHAMALI et al., 2017), inibidores do peptido cistenil (SOMBORO et al., 2018) e tiazol (YUAN et al., 2020). Estes compostos puderam ser efetivos apenas para as bactérias que codificavam MBLs a partir de mutações cromossômicas ou produtoras da enzima IMP-1 não incluindo outros tipos, assim a busca por novos inibidores é necessária (JAHN et al., 2016).

Figura 9: (a) O sítio ativo é representado com os resíduos no formato de varas; (b) Sítio ativo da MBL. *Klebsiella pneumoniae* bi-Zn (II) -NDM-1 (B1, PDB 3spu); (c) meningoseptica mono-Zn (II) -GOB-18; (d) *Serratia fonticola* mono-Zn (II) -Sfh-I (B2, PDB 3sd9).



Fonte: SHI et al., 2019.

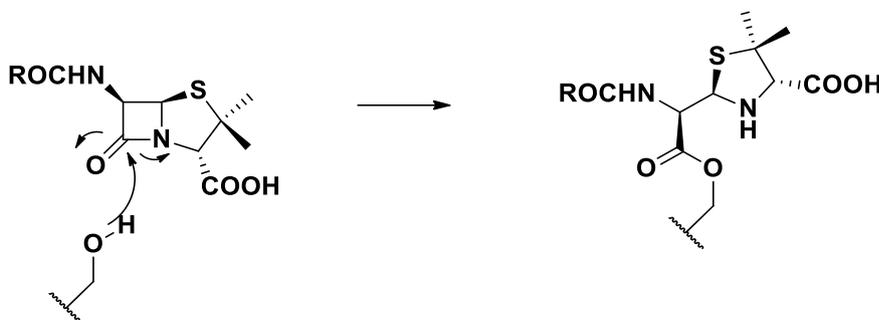
3.3.4 Serina- β -lactamase

Apesar de não possuir inibidores clinicamente tão usuais quanto as MBLs e serem mecanisticamente e estruturalmente diferentes as serina- β -lactamase (SBL) podem ser encontradas concomitantemente às MBLs, o que torna importante a busca por drogas capazes de inibir ambas as enzimas (CAHILL et al., 2019). O mecanismo de resistência das SBLs envolve a reação de um anel β -lactâmico com uma serina nucleofílica para que haja a formação de um complexo acil-enzima, acarretando uma eficiente hidrólise (LOHANS et al., 2019).

Nas SBLs predominam dois tipos de reações consecutivas: a já mencionada acilação (que resulta na formação de uma ligação covalente acil-enzima) e a desacilação. Na fase da acilação um nucleófilo ataca pela ativação do sítio catalítico da serina, enquanto o carbono da carbonila presente no antibiótico surge para formar o complexo através de um intermediário tetraédrico.

A desacilação ocorre de forma análoga, o mecanismo para a reação das SBLs com o anel β -lactâmico pode ser observado na Figura 10 (HIRVONEN et al., 2019).

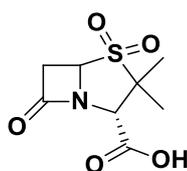
Figura 10: Reação da serina com uma penicilina genérica formando um complexo acil-enzima que sofre uma hidrólise para a recuperação do sítio ativo.



Fonte: Própria

Os inibidores ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam sendo co-administrados com a penicilina podem inibir um subconjunto das SBLs. Porém o uso inadequado gera o desenvolvimento de uma serina- β -lactamase de espectro estendido resistente (KRAJNC et al., 2019; PHILIPPON et al., 2019). Estas combinações do inibidor com o antibiótico ocorrem pela formação de adutos que ativam o sítio das SBLs de forma a prevenir a hidrólise do antibiótico. Porém as bactérias acabam desenvolvendo rapidamente resistência a primeira geração de inibidores que sejam estruturalmente similares a estes compostos (LIU et al., 2019).

Figura 11: Estrutura do sulbactam, uma das substâncias capazes de inibir um subconjunto das serina- β -lactamases.



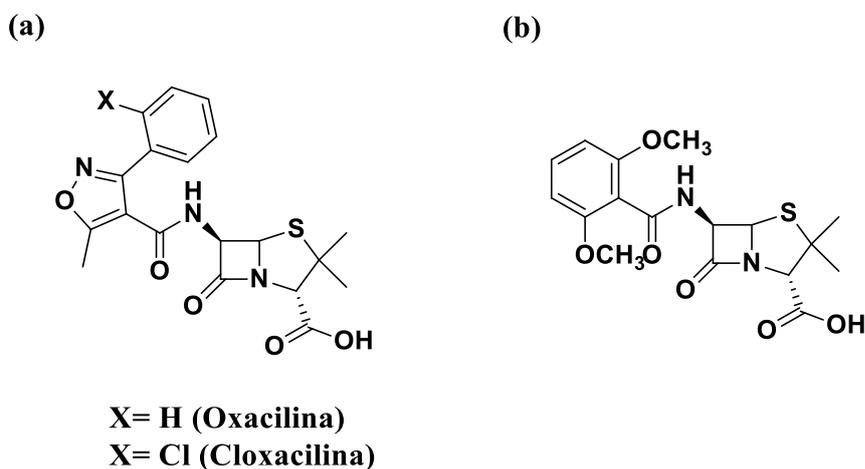
Fonte: Própria

3.3.5 Oxacilinase

Estas enzimas são a maior causa de preocupação, devido principalmente a resistência adquirida no qual há o surgimento de surtos associados à produção das oxacilinases (OXAs) (CATÃO et al., 2019). Isto se deve a sua capacidade de hidrolisar antibióticos como as cefalosporinas e mais fracamente aos carbapenemos, os quais são frequentemente utilizados como última opção de tratamento para bactérias multirresistentes. As OXAs hidrolisam preferencialmente penicilinas do tipo isoxazolil como as oxacilinas (Figura 12.a), sua atividade

hidrolítica também inclui as cloxacilinas (Figura 12.a) e meticilina (Figura 12.b) (LIZANA et al., 2019).

Figura 12: Estrutura das moléculas hidrolisáveis pela enzima oxacilina. (a) Oxacilina e cloxacilina quando o X representa um hidrogênio e um cloro respectivamente e (b) meticilina.



Fonte: Própria

Alguns tratamentos antimicrobianos visam tratar ou reduzir a resistência das bactérias. As β -lactamases fazem parte das enzimas que atuam como alvo dos medicamentos direcionados para a sua inativação. Os diferentes tipos de BL apresentados influenciam na forma como os antibióticos β -lactâmicos são hidrolisados, sabendo-se disso, novas estratégias visando o tratamento de doenças causadas por bactérias resistentes permitem o direcionamento para cada tipo de enzima podendo ser utilizados programas de predição da interação fármaco-receptor como o caso do *docking* molecular (MOHAMMED; SINGH, 2019).

3.4 Agentes antimicrobianos

Os antibióticos utilizados para o tratamento de determinadas infecções podem ser obtidos por meio do isolamento de metabólitos secundários produzido por microrganismos, plantas e alguns animais superiores. Além destes, há a modificação química de antibióticos preexistentes ou de metabólitos microbianos, podendo ser também de origem sintética como o cloranfenicol (SANTOS et al, 2018).

O grau efetividade de cada antimicrobiano depende do mecanismo de ação destes, podendo atuar de maneiras diferentes sendo seu desempenho melhorado através de efeito direto sobre o metabolismo, atuando na síntese de vitaminas e aminoácidos e inibindo o crescimento de bactérias indesejáveis (REHMAN; KAMRAN; AKASH, 2020). De maneira geral os antibióticos ou antimicrobianos podem atuar na inibindo a parede celular, a síntese proteica e

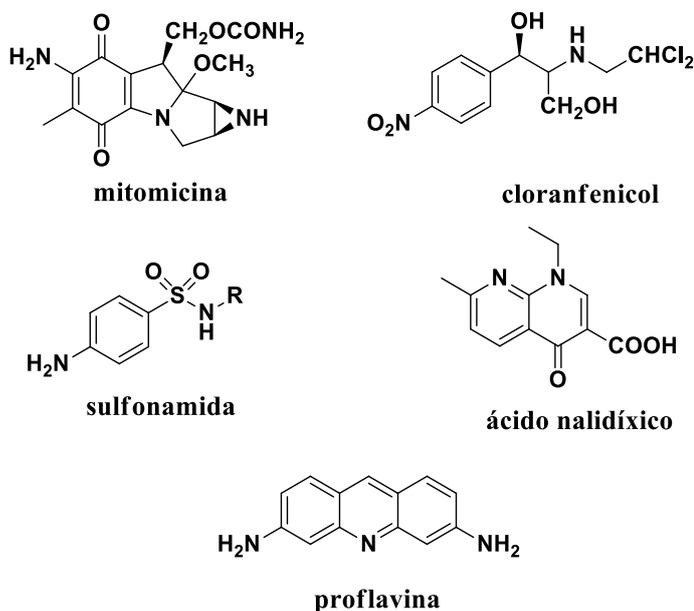
metabólica, replicação de ácidos nucleicos e da transcrição e dano a membrana plasmática (FRANCO et al., 2015).

Os antibióticos que podem interferir no metabolismo celular das bactérias são chamados de antimetabolito, apesar de sua forma de ação estes não são capazes de modificar o metabolismo do hospedeiro. Um exemplo de compostos que podem ter este efeito é a mitomicina C, um agente quimioterápico de uso tópico (MERCIECA et al., 2018) e as sulfonamidas (ZHAO et al., 2020).

Outro mecanismo de ação para os antibióticos está relacionado com a inibição da síntese da parede celular bacteriana, como principal exemplo tem-se os pertencentes à classe dos β -lactâmicos como as penicilinas, cefalosporinas e vancomicina já citados anteriormente (IMAI et al., 2020). Interação com a membrana plasmática é outro tipo de agente antimicrobiano que resultam em lise celular sendo responsáveis por estas moléculas como as Polimixinas (MOFFATT; HARPER; BOYCE, 2019) e tirotricina (FELIU; PLANAS, 2018).

O rompimento da síntese proteica pode ser causada pela rifampicina, que inibe a iniciação da síntese de RNA (CARO et al., 2019); aminoglicosídeos, interfere na síntese proteica (TAKAHASHI; IGARASHI, 2018); tetraciclinas (XIONG et al., 2018); clorafenicol, inibi a ação da peptidil transferases (EMYINUMARU et al., 2019). A inibição da transcrição e replicação de ácidos nucleicos pode ocorrer pela utilização de antimicrobianos que incluem o ácido nalidíxico (AMARANTE et al., 2018) e a proflavina (HRIDYA; HYNES; MUKHERJEE, 2019) as estruturas destes compostos citados podem ser visualizadas na Figura 13.

Figura 13: Estrutura dos principais antibióticos de diferentes mecanismos de ação.



Fonte: Própria

O rRNA é essencial para a síntese proteica, conseguindo-se acessar os sítios ativos do RNA ribossomal de maneira eficiente, podem inibir a tradução em um sistema transcrição/tradução (ALMEIDA et al., 2019; CHILINGARYAN et al, 2018). O gene 16S rRNA que compõe a subunidade ribossômica do 30S é responsável pela síntese de polipeptídeos assim, com o seu decodificação e tendo-se a estrutura cristalográfica em bancos de dados virtuais é possível planejar fármacos que o inativem para que ocorra posterior morte celular bacteriana (KONDO; KOGANEI, 2020).

A síntese de novos antibióticos acaba sendo uma necessidade constante, visto que há certos fatores que tornam as substâncias utilizadas anteriormente ineficientes como o aparecimento de novos patógenos, a seleção de microrganismos resistentes, efeitos colaterais ao paciente e a resistência de patógenos aos antibióticos existentes. Por esta razão houve a necessidade de driblar estes mecanismos de forma a manter a capacidade de ação dos antibióticos (CLEMENTINO et al., 2015).

A terapia combinatória é uma das formas mais conhecidas de resolver esta situação que pode ser desenvolvida pela comunidade científica e médica. As clínicas antes prescreviam dois ou mais antibióticos para o tratamento do mesmo paciente, resultando em mais perfis resistentes. Compostos adjuvantes que continham estrutura diferenciada do antibiótico puderam

ser utilizados em conjunto com a terapia convencional com o intuito de melhorá-la (DOMALAON et al., 2018).

3.5 Antibióticos Adjuvantes

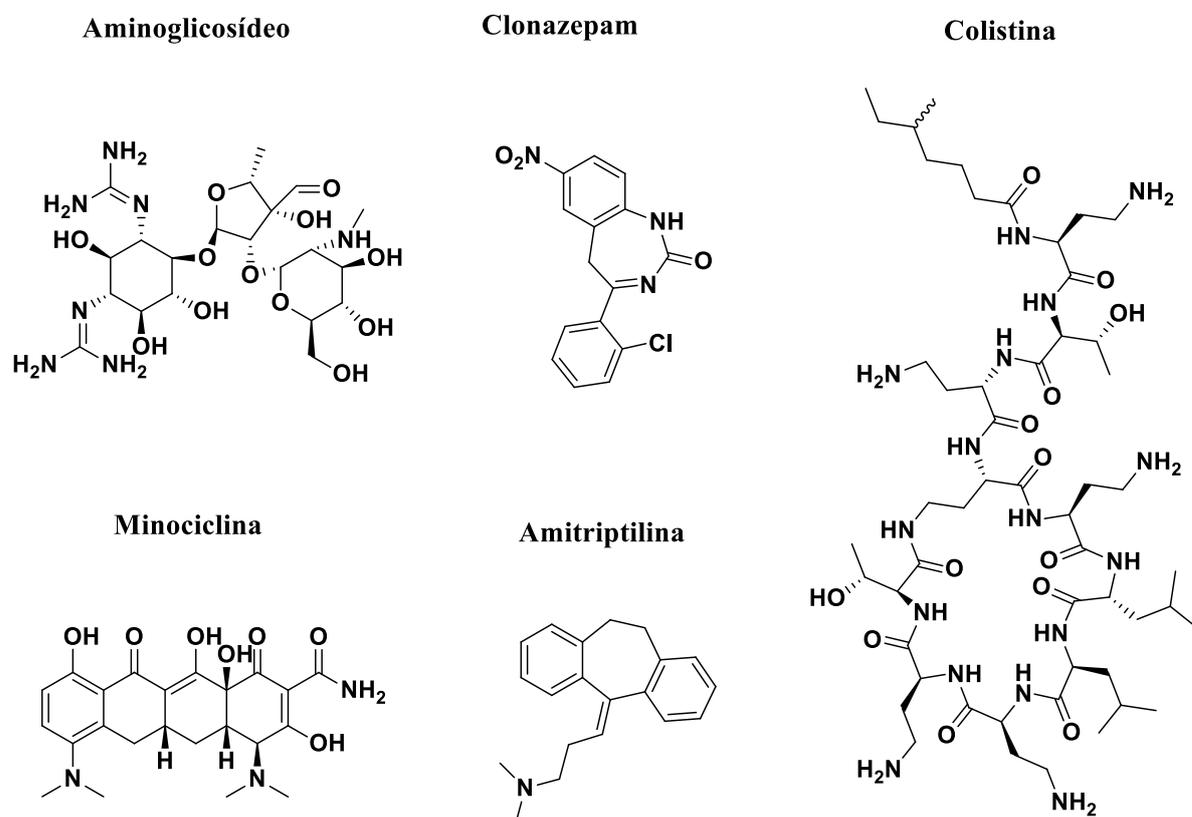
Para auxiliar no tratamento de doenças infecciosas nas quais as bactérias se tornaram resistentes sem que haja a necessidade de extensas pesquisas para a produção de novos antibióticos se utiliza os compostos adjuvantes que visam aumentar a eficiência ou agir sinergicamente com o antimicrobiano (CARVALHO et al., 2015).

Como potenciadores da ação microbiana, estes compostos mesmo possuindo pouca ou nenhuma capacidade antimicrobiana podem agir (quando coadministrados) de duas formas: a primeira seria o bloqueio do mecanismo de resistência bacteriana e a segunda, a incrementação da ação antimicrobiana à droga. A pesquisa relacionada com a combinação de agentes como terapia medicamentosa tem a vantagem de não ser necessário a identificação desafiadora e cara de novos alvos essenciais para a sobrevivência bacteriana (PAREEK et al., 2018).

Estudos realizados com mais de mil drogas aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) indicaram que cerca de 96 destes que não necessariamente possuíam atividade antimicrobiana exibiram efeito sinérgico com a minociclina (antibiótico do grupo das tetraciclinas) para algumas cepas, inclusive para *E. coli* (GRIMSAY; PIDDOCK, 2019). Dentre os compostos que podem atuar auxiliando os antibióticos tem-se os corticosteroides que quando administrados em conjunto melhoram o curso clínico de pacientes hospitalizados com pneumonia, independente da gravidade da doença (BLUM et al., 2015). Em trabalhos realizados, este mesmo adjuvante pôde ser utilizado no tratamento de doenças infecciosas bacterianas em coelhos, demonstrando bons resultados (HO et al., 2018).

Dentre os compostos que apresentam alguma ação adjuvante os aminoglicosídeos podem atuar no tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram-positivas, atuando também como metodologia alternativa para o tratamento das acometidas por micobactérias (MAIDEN et al., 2018). Além desta, testes realizados *in vitro* com a droga clonazepam (um inibidor leve das funções do sistema nervoso central, de efeito anticonvulsivante) associado com a colistina (antibacteriano) apresentaram atividade sinérgica frente a microrganismos Gram-negativos (ROSA et al., 2019). Utilizando deste mesmo antibiótico em conjunto com a amitriptilina (fármaco prescrito para tratar depressão e ansiedade) em isolados clínicos de pacientes com *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase apresentaram sinergismo. As estruturas destes compostos podem ser encontradas na Figura 14 (MACHADO et al., 2019).

Figura 14: Compostos empregados em estudos recentes relativos à adjuvante antimicrobiano.



Fonte: Própria

Visto que a combinação de antimicrobianos com compostos que não possuem esta ação pode ser utilizado com efeito sinérgico, preservando o antibiótico e mantendo sua ação, podendo inclusive promover o efeito inibitório. Os adjuvantes podem ser classificados de acordo com o mecanismo de resistência ao qual se opõe, de maneira a diferenciar os inibidores de β -lactamases como moléculas que podem inibir a enzima preventivamente para que não ocorra a degradação do anel β -lactâmico (DOUAFER et al., 2019).

3.5.1 Inibidores da β -lactamase

Os inibidores de β -lactamase (IBLs) assemelham-se aos antibióticos desta classe, porém exibem muito pouca ou nenhuma atividade e podem agir de acordo com diversos tipos de reação envolvendo a formação de ligação covalente entre a enzima e o composto. A semelhança estrutural confere a estas moléculas a capacidade de proteger as penicilinas da inativação enzimática. Alguns destes reversores da resistência como o ácido clavulânico, sulbactam e

tazobactam são introduzidos na prática clínica atuando como bloqueadores da atividade enzimática (VIEIRA et al., 2019).

Mesmo entre os melhores adjuvantes existe a problemática da capacidade das moléculas atravessarem a membrana externa das células bacterianas de forma a afetar não apenas os antibióticos β -lactâmicos como também o inibidor. Para facilitar a difusão existem pesquisas para lidar com a impermeabilidade destas membranas resultando nas polimixinas, surfactantes e peptídeos antimicrobianos que obtiveram bons resultados por serem capazes de permeabilizar a membrana, porém poucos compostos podem potencializar o efeito de alguns antibióticos β -lactâmicos (AMMETER et al., 2019).

Os IBLs têm sido bastante significativos para o tratamento de infecções causadas por microrganismos detentores das β -lactamases, principalmente se tratando das Gram negativas. Porém seu efeito tem se reduzindo de maneira expressiva acometidos pela propagação mundial destes compostos e variedade de β -lactamases existentes (VENA; CASTALDO; BASSETTI, 2019).

Novas pesquisas têm sido feitas de forma a se obter combinações de inibidores das β -lactamases. Estas se baseiam na atividade de agente antimicrobiano com um par de inibidores como ceftolozane/tazobactam, ceftazidima/avibactam e meropenem/vaborbactam. As combinações mostraram-se eficientes para bactérias Gram negativas (HO et al., 2019).

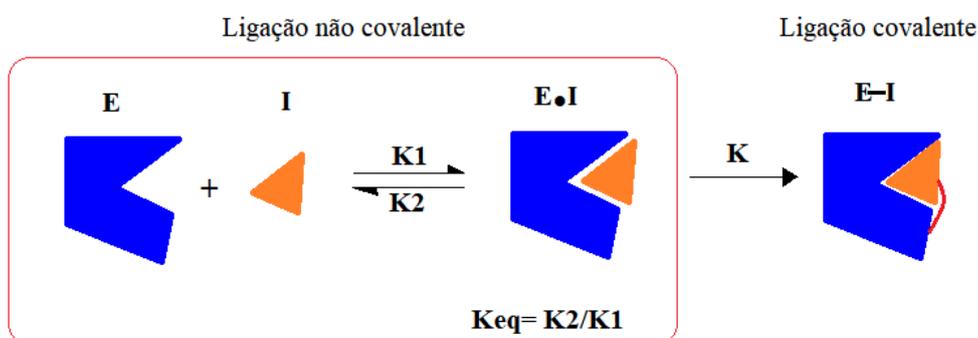
Como uma nova alternativa para a inibição das β -lactamases, moléculas que contêm um grupo carbonila α , β - insaturados que podem realizar reações de adição do tipo Michael, por atuarem como aceptores neste mecanismo, têm a capacidade de formar ligação covalente com o sítio ativo da molécula se ligando irreversivelmente à enzima. O termo para este tipo de inibição pode ser chamado de Inibidor Covalente Direcionado (ICD) (JACKSON et al., 2017).

3.6 Aceptores de Michael como Inibidores

As principais características para uma droga eficiente e segura são sua potência e que seja suficientemente exposta ao sítio de ação de forma haja resposta tendo o mínimo de toxicidade possível. Drogas mais potentes necessitam de uma baixa concentração para agir sem efeitos adversos, de forma que a descoberta de novos fármacos que inibem covalentemente não pode se tornar uma competição de maior concentração de substrato. Como observado na Figura 15, a diferença entre as drogas que formam ligações reversíveis em contraste com a irreversíveis, na qual há a formação de um aduto covalente enzima-inibidor, pode ser entendida como uma diferença de constante de equilíbrio (K_{eq}). Para as reações que ocorrem irreversivelmente esta

constante é apenas lentamente reversível, apresentando um desequilíbrio cinético (RAY; MURKIN, 2019).

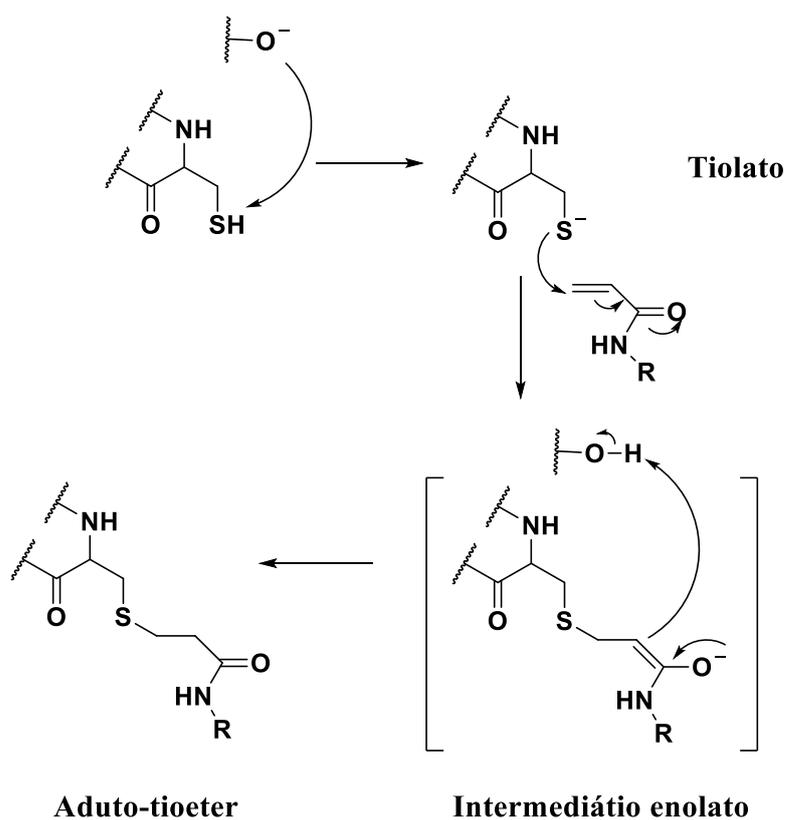
Figura 15: Inibição não covalente e covalente. Em destaque a ligação reversível, ambos os tipos são inibidores.



Fonte: Própria

Um exemplo de mecanismo de modificação covalente é a formação de um complexo com uma cisteína por adição de Michael observável na Figura 16 envolvendo a desprotonação de um tiol para a formação de um tiolato, seguido de um intermediário enolato e a protonação do enolato para formar o produto, tioéter (AWOONOR; WALSH; ROWLEY, 2017).

Figura 16: Mecanismo de adição de uma acrilamida iniciado por uma cisteína tiol.



Fonte: Própria

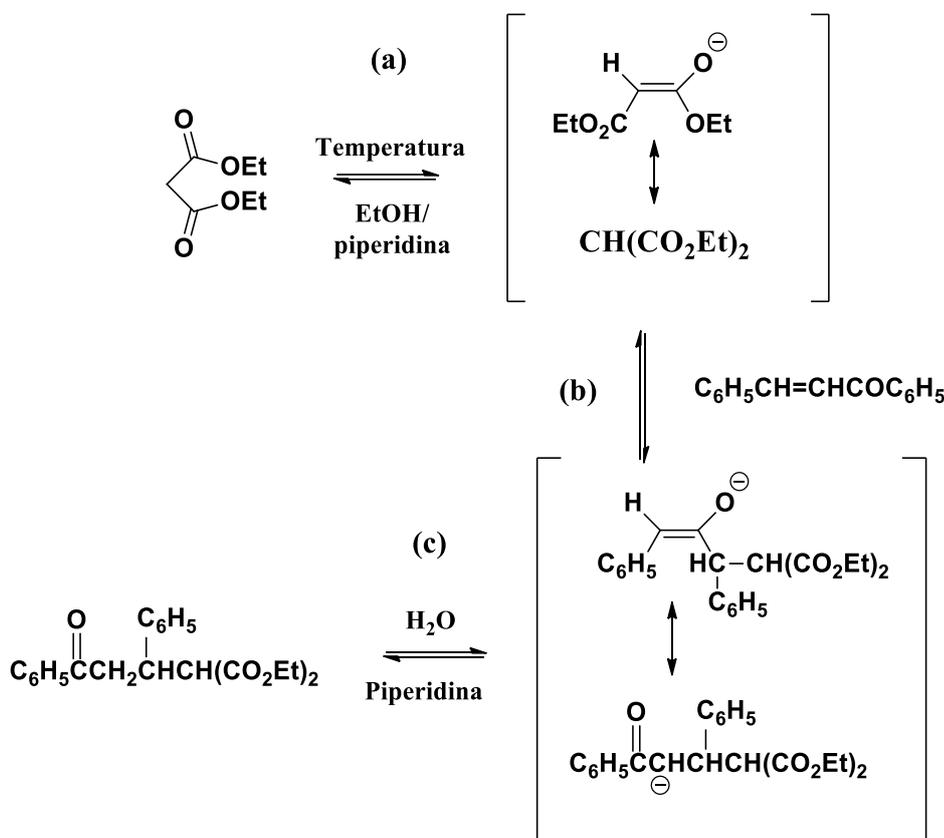
Mecanicamente a adição de Michael ocorre quando há a presença de um nucleófilo (doador) e um alceno (acceptor) para que haja a produção de uma ligação covalente entre o doador e o acceptor de Michael (PARAMARTA; WEBSTER, 2017). Na descoberta desta reação, em 1887, originalmente ocorria a adição de um enolato de uma cetona ou aldeído em um grupo carbonila α , β -insaturado atacando o carbono- β . Assim a reação de Michael pertence a grande classe de reações orgânicas de adição conjugada (FOTOUHI et al., 2017).

Adições de Michael necessitam de um catalisador, geralmente de caráter básico, porém há casos em que este tipo de reação se efetua por catálise ácida em que são empregados ácidos de Lewis como o SnCl_4 , FeCl_3 , ZnCl_2 , AlCl_3 , BF_3 , entre outros (WOONER et al., 2019). A partir da literatura clássica de Ingold, o mecanismo reacional para as reações de adição de Michael segue três etapas:

- a. A base abstrai um próton, formando um carbânion ou enolato;
- b. Ocorre um ataque nucleofílico ao carbono- β do acceptor de Michael, desta etapa se tem a formação de intermediário aniônico;
- c. O intermediário aniônico abstrai um próton do meio reacional, formando o aduto de Michael.

Estas etapas podem ser melhor entendidas com a observação do Esquema 1. A partir da investigação da cinética de reação da metilvinilcetona com acetato de etila ou com a 2,4-pentanodiona, descobriu-se que a constante de velocidade dependia tanto do doador como do acceptor de Michael além da concentração da base. Entretanto o valor entrópico revelou-se alto e negativo, sugerindo um complexo ativado de estrutura rígida, o qual gera um intermediário aniônico e abstrai um próton do meio reacional, produzindo o aduto de Michael (GUO et al, 2019).

Esquema 1: Mecanismo geral para a reação de adição de Michael proposto por Ingold.



Fonte: Própria.

3.7 Química medicinal

A busca por novas estratégias para a produção de novos fármacos geralmente é efetuada pela química medicinal, podendo inclusive se atentar a descoberta de novos inibidores da β-lactamase por meio de estudos computacionais, otimização baseada na estrutura do ligante endógeno, desenho de moléculas baseada na estrutura alvo farmacológico, modificações estruturais em moléculas que já estão no mercado, estudo da relação estrutura atividade (SAR, *structure-activity relationship*) e ligantes direcionados para múltiplos alvos (JING et al., 2019).

3.7.1 Planejamento de fármacos

Para tratar as enfermidades atuais o processo de desenvolvimento de possíveis fármacos podem ser compreendido como um processo dispendioso, complexo e multidisciplinar, requerendo uma combinação de diversas formas de conhecimento e estratégias. Assim, a química medicinal planeja e descobre novas terapias para as diversas doenças que atingem a humanidade nas diversas situações atuais. Formalmente esta ciência se relaciona a aspectos

como a descoberta, invenção e preparação de substâncias de caráter bioativo de interesse terapêutico, compreensão do modo de ação dos fármacos entendendo o funcionamento da relação estrutura-atividade (AMARAL et al., 2017).

Estratégias relacionadas a esta ciência podem ser empregados para os seus devidos fins, sendo assim há uma evidente necessidade de formular novos protótipos baseados na modificação estrutural para obter novas moléculas com melhores mecanismos de ação e outras propriedades relevantes (BARBOSA et al., 2017). Visando a redução de gastos com moléculas não funcionais, ao se formular estas novas moléculas podem ser utilizadas ferramentas computacionais que auxiliam na investigação para comparar algoritmos de triagem que fornecem conclusões relevantes (HU; STUMPFE; BAJORATH, 2016).

A partir de métodos experimentais e computacionais pode-se planejar a síntese e identificar fármacos que sejam biologicamente ativos. No planejamento de fármacos é necessário um conhecimento interdisciplinar no qual a doença, as vias bioquímicas envolvidas, estudos farmacocinéticos e toxicidade dos compostos devem ser conhecidos (SUN et al., 2019). A otimização e potência do perfil farmacológico de uma substância pode ser alterado de forma que suas formas mais ativas possam ser sintetizadas com uma biodisponibilidade satisfatória, possuindo um metabolismo adequado à sua função e que não possua elevada toxicidade (SHI; KAMER; COLE-HAMILTON, 2019). O planejamento de fármacos pode ser idealizado de acordo com diferentes abordagens incluindo o desenho de análogos, triagem sistemática, explorações de informações biológicas e farmacológicas e desenho sob medida (PEREIRA et al., 2020).

Uma das estratégias da química medicinal, o planejamento de fármacos, utiliza o alvo a ser atingido (enzima ou receptor) para que se possa planejar um ligante que atue de forma agonista ou antagonista dependendo do objetivo. A estratégia para formulação de novos fármacos baseado no grupo farmacofórico (FBDD, do inglês *Fragment-Based Drug Discovery*), usada frequentemente pelas indústrias farmacêuticas e pesquisas universitárias, pode ser usada para obter pequenas moléculas capazes de inibir determinados alvos de forma a poder ser utilizada em pesquisas relativas a antimicrobianos (LIANG et al., 2019).

3.7.2 Descoberta de Fármacos Baseada no Grupo Farmacofórico (FBDD)

Muitas instituições farmacêuticas, biotecnológicas e acadêmicas utilizam de ferramentas para a descoberta de drogas baseado no grupo farmacofórico (FBDD, *Fragment-Based Drug Discovery*). Esta técnica surgiu como uma forma complementar e alternativa para os métodos

mais tradicionais de descoberta de fármacos sendo utilizados também para a geração de compostos *lead*, empregado geralmente para alvos difíceis como os de interação proteína-proteína (MURRAY; REES, 2016). Para realizar o estudo de FBDD a simulação computacional realizada por *docking* molecular é amplamente empregada principalmente quando o objetivo seria utilizar um composto como inibidor de determinada proteína (YOOU; CHO; CHOI, 2019). Desta forma se torna possível estudar a interação com aminoácidos em determinada localização, o ligante é organizado de acordo com sua afinidade formando um conjunto de mais baixa energia possível (PASCOINI et al., 2019).

Uma molécula pode ser detectada como um *hit* em um *screening*, quando esta se ligar ao alvo requerendo uma quantidade complementar entre si e a superfície da proteína alvo. De acordo com o tamanho molecular e a complexidade do ligante pode ocorrer impedimentos para que haja a formação da ligação em determinado sítio catalítico, desta forma quanto menor o tamanho da molécula maior será a possibilidade dela se encaixar (PRICE; HOWARD; CONS, 2017).

O FBDD oferece um meio de busca no qual há a possibilidade de interagir determinados protótipos com o alvo específico para a enfermidade que se deseja tratar (SARAGIH et al., 2019). Porém, para se planejar estas moléculas, deve-se ter além de uma estrutura base os seus substituintes que serão necessários para a interação com o alvo que poderão melhorar ou piorar a atividade do protótipo.

3.7.3 Descoberta de Fármacos Baseado na estrutura do alvo (SBDD)

Além do FBDD, outro método é o planejamento de fármacos baseado na estrutura do alvo, SBDD (do inglês, *Structure-Based Drug Design*). Para que seja obtida novas moléculas a partir desta metodologia necessita-se que haja atributos eletrostáticos e estereoquímicos necessários para a realização da interação fármaco-receptor de alta afinidade. Com esta finalidade a utilização de estruturas cristalográficas tridimensionais possibilita a identificação e análise do sítio ativo enquanto suas propriedades eletrostáticas e topologia, incluindo a presença de fendas, cavidades e bolsões (FERREIRA et al., 2015; KUMAR; JHA, 2017).

Os alvos que estão geralmente envolvidos neste processo são proteínas e ácidos nucleicos e conhecendo-se a estrutura do alvo farmacológico, o planejamento e desenvolvimento de fármacos que possam agir sobre ela é favorecido. Conseqüentemente esse tipo de mecanismo de ação envolvem alterações nas propriedades estruturais da biomolécula, podendo afetar a transcrição, replicação, expressão gênica, impedindo o crescimento celular (JIN et al., 2019).

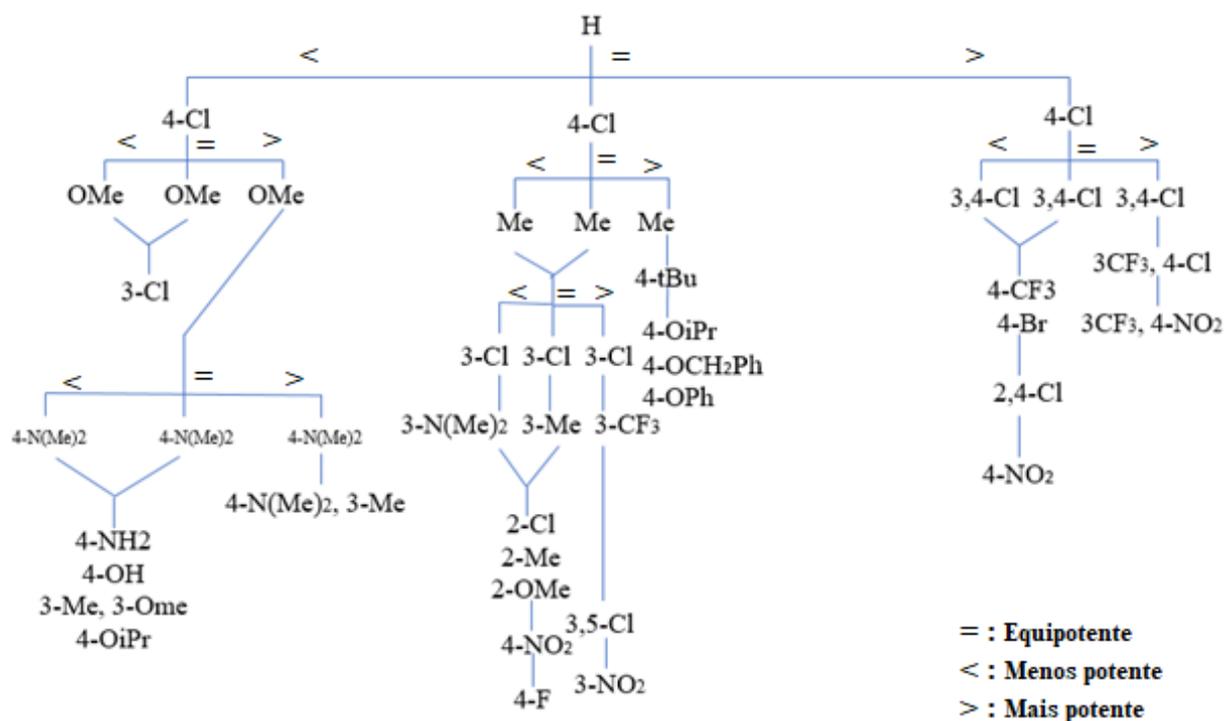
Para maximizar as chances de encontrar uma molécula promissora de forma a reduzir a variedade a ser sintetizada desenvolveu-se a árvore de decisão de *Topliss* como uma forma empírica de planejamento de fármacos (CRUSCO et al., 2019).

3.7.4 *Árvore de decisão de Topliss*

O provimento de novos fármacos envolve três etapas primordiais: a descoberta, otimização e o desenvolvimento. Neste contexto a complexidade está na seleção de substituintes que melhorariam a potência e a relação estrutura-atividade. Uma metodologia prática que *Topliss* desenvolveu baseado nos estudos de Hansch que modificava um sistema arílico os substituintes de forma a alterar parâmetros físico-químicos como a lipofilicidade, efeitos eletrônicos e estérico. Sendo a partir destes desenvolvido um fluxograma que compara a potência da atividade biológica, determinando os congêneres que viriam a ser sintetizados (DELIGIA et al., 2015).

Para que o método manual da decisão de *Topliss* possa ser utilizada é necessário que o composto o qual será realizada as modificações possuam em sua estrutura um anel aromático. Sendo adequados cinco tipos de substituintes que dariam origem a diferentes compostos de mesma estrutura básica, sendo estes o Hidrogênio (H), 4-Cloro (4-Cl), 4-Metila (4-CH₃), 3,4-di-Cloro (3,4-di-Cl) e 4-Metoxila (4-OCH₃), escolhidos por sua acessibilidade sintética. O fluxograma que indica todas as substituições para este método pode ser observado no Esquema 2. Os cinco compostos derivados destas substituições na posição *para* ou *meta* e tem seus parâmetros físico-químicos comparados entre si, podendo ainda serem observados os efeitos causados a estrutura a partir de outros possíveis substituintes para que possa haver a possibilidade de obtenção de fármacos mais potentes (LIM et al., 2019).

Esquema 2: Melhoria das propriedades físico-químicas e biológicas por meio da Árvore de Decisão de Topliss.



Fonte: Própria

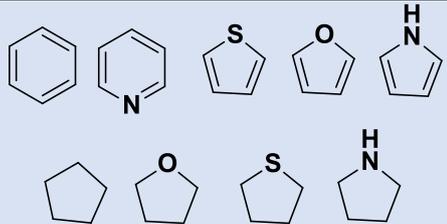
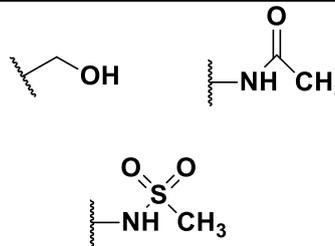
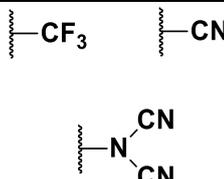
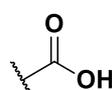
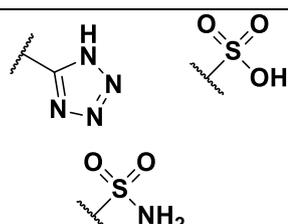
Neste modelo são realizadas etapas que dependem das mudanças que envolvem propriedades físico-químicas dos compostos como a hidrofobicidade (π) e efeitos eletrônicos (σ) que são os principais fatores que influenciam na atividade do fármaco (HAYAKAWA et al., 2019). Neste modelo a relação estrutura-atividade não requer regressões múltiplas. Ao utilizar este fluxograma deve-se analisar a atividade em relação ao composto padrão (substituinte H) se houve uma melhora o rumo da síntese é guiado para o lado indicado com > (mais ativo), para o caso de um decréscimo segue-se < (menos ativo), o mesmo ocorre quando há uma igualdade (=). Este modelo não matemático avalia a atividade biológica em relação aos parâmetros π (constante de hidrofobicidade) e σ (constante de Hammett) e suas relações (π - σ , π - 2σ , π - 3σ , π + σ , etc.) (LI et al., 2019).

3.7.5 Bioisosterismo

Assim como a árvore de decisão de *Topliss* o bioisosterismo funciona como uma estratégia de modificação molecular que visa a melhoria na resposta farmacológica, resultando na identificação de compostos promissores para a descoberta de novos fármacos. Os bioisósteros possuem propriedades físico-químicas semelhantes e afetam o mesmo sítio ativo de forma agonista ou antagonista para produzir efeitos biológicos semelhantes (RAMU et al., 2019).

O bioisosterismo pode ser classificado como clássico ou não clássico, as substituições clássicas são para átomos mono, di, tri e tetravalentes e anéis equivalente devendo apresentar as exigências preconizadas pelas definições de Grimm e Erlenmeyer; por outro lado os do tipo não clássicos são de grupos interconvertíveis e não atende às regras eletrônicas e estéricas que o clássico segue. No Quadro 1 pode-se observar diferentes substituintes que podem ser obtidos por meio das diferentes classificações (NEOCHORITIS; ZHAO; DOMLING, 2019).

Quadro 1: Classificações do bioisosterismo clássico e não clássico com seus respectivos exemplos.

Clássico	Monovalente	$\text{CH}_3, \text{NH}_2, \text{OH}, \text{F}$
	Divalente	$-\text{CH}_2-, -\text{NH}-, -\text{O}-$
	Trivalente	$=\text{CH}-, =\text{N}-, =\text{P}-, =\text{As}-, =\text{Sb}-$
	Tetravalente	$=\text{C}=, =\text{Si}=, =\text{N}^+=, =\text{P}^+=$
	Anéis equivalentes	
Não clássico	OH	
	Halogênio	
		

Fonte: Autoria (2020).

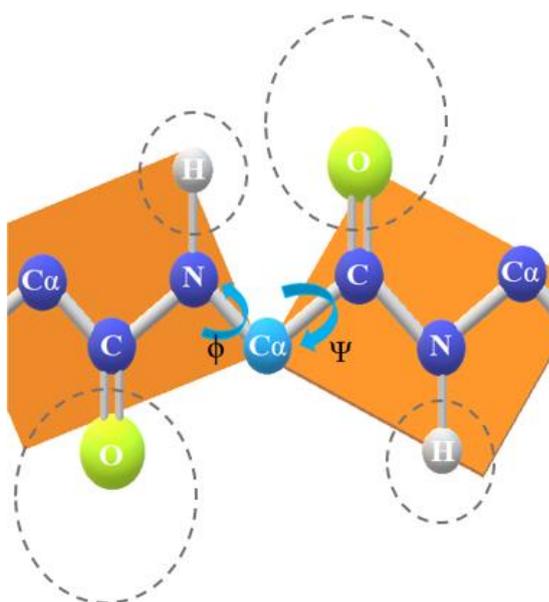
Esta estratégia de modificação molecular quando aliada a estudos computacionais como o *docking* e a modelagem molecular implica em uma ampliação do sucesso da síntese de novos compostos bioativos, sendo desta forma útil para o planejamento de substâncias farmacoterapêuticas (REDDYRAJULA; DALIMBA, 2020).

3.8 Estudos computacionais

3.8.1 Gráfico Ramachandran

A utilização de ferramentas computacionais que necessitam da participação de macromoléculas obtidas a partir de bancos de dado como o *Protein Data Bank* (PDB) precisam ter sua qualidade avaliada a fim de validar os modelos obtidos. Uma das formas é através dos ângulos de dobramento da estrutura da macromolécula (SOBOLEV et al., 2020). Os ângulos Ψ (situa-se entre o carbono α e o carbono do grupamento carboxi) e o ϕ (formado entre o carbono α e o nitrogênio do grupo amino), que podem ser observados na Figura 17, fornecem importantes informações relativas ao arranjo estrutural de cada resíduo de aminoácido, podendo ser plotado no gráfico Ramachandran (ALBERTS et al., 2002).

Figura 17: Representação dos ângulos Ψ e ϕ .



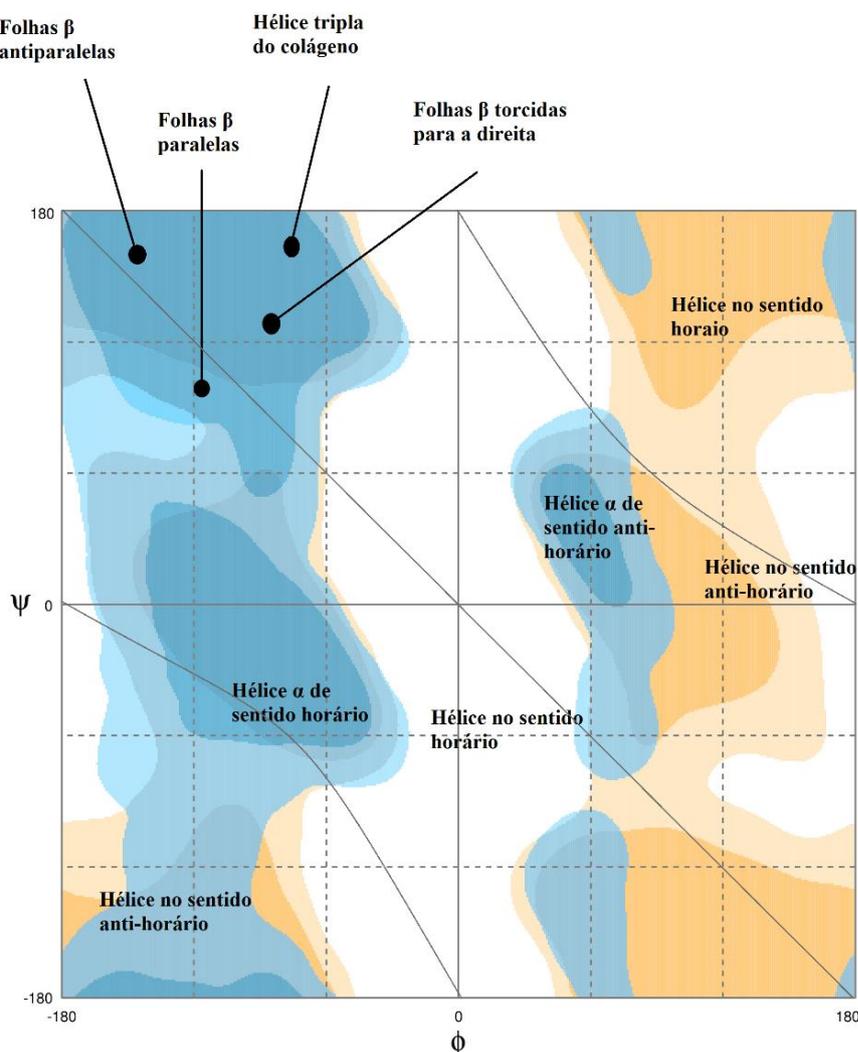
Fonte: Própria.

A viabilidade da energia envolvida na macromolécula depende dos ângulos permitidos, favoráveis e proibidos que estão associados às limitações estéricas de sua estrutura. Este impedimento pode ser gerado pelo tamanho das nuvens eletrônicas dos oxigênios da carbonila e o hidrogênio ligado ao nitrogênio das ligações como demonstra a Figura 17. Outra forma de

limitação ocorre pelo fato de as ligações peptídicas serem relativamente rígidas (MITTAL et al., 2020).

O gráfico Ramachandran genérico apontado pela Figura 18 apresenta as regiões favoráveis dentre as angulações de torção (Ψ e ϕ), sendo observadas as regiões onde os sentidos horário e anti-horário prevalecem, folhas β antiparalelas, folhas β paralelas, hélice tripla do colágeno, folhas β torcidas e hélice α de ambos os sentidos (GUZZI et al., 2020).

Figura 18: Modelo genérico para a apresentação do gráfico Ramachandran com suas principais áreas destacadas.



Fonte: Própria.

Um modelo de predição de excelente qualidade deve ter cerca de 90% dos resíduos de aminoácido localizados nas regiões favoráveis. As demais regiões envolvem partes permitidas, que contemplam os aminoácidos de valores próximos ao favorável da estrutura tridimensional da proteína e as regiões proibidas que apresentam valores desfavoráveis de forma a diminuir a qualidade da predição estrutural (HOSSEINGHOLI et al., 2020). Os resíduos de glicina e

prolina são exceções para a regra de regiões desfavoráveis, pois suas estruturas apresentam variações na cadeia lateral de forma a assumirem angulações não esperadas (DESAI et al., 2020).

Com a validação qualitativa dos PDB das macromoléculas é possível realizar demais análises *in silico* para elucidar propriedades biológicas, interação com outras moléculas e dinâmica metabólica. Sendo muitas vezes utilizado como teste prévio para os ensaios de *docking* molecular (PATEL et al., 2020).

3.8.2 *Docking molecular*

Uma das ferramentas computacionais empregadas para a idealização de possíveis fármacos, o *docking* molecular tem por função prever a orientação de uma molécula inserida em uma segunda na qual há a obtenção de energia livre de interação entre os analisados. Desta forma, pode-se prever a força de associação ou a afinidade entre moléculas (MUKESH; RAKESH, 2011).

Além disso, pode-se antecipar a interação de um candidato a fármaco diretamente com a proteína alvo de forma que sua afinidade e atividade são testadas (CHAUDHARY; MISHRA, 2016). De acordo com Phillips et al. (2018) o auxílio de ferramentas computacionais reduz o custo e tempo de pesquisa para a busca em 50%.

O que ocorre nesta técnica é o reconhecimento de um ligante no sítio receptor por meio da complementariedade química que ocorre entre as estruturas, sendo levado em consideração vários fatores como os entálpicos e entrópicos, flexibilidade das moléculas, efeito do ambiente nas distribuições de cargas do ligante e proteína e possíveis interações com a água do meio podem ser consideradas (AGRAWAL et al., 2019).

Os *softwares* de *docking* são compostos por um algoritmo de busca e uma função de *score*, sendo o primeiro um método de busca para o espaço conformacional disponível combinando ligações, explorando os graus de liberdade conformacional, rotacional e translacional do ligante e da proteína. O *score* avalia em termos energéticos cada modo de ligação, esta avaliação ocorre de acordo com o campo de força de mecânica molecular e parâmetros empíricos de cálculo de energia livre (LEONHART; NARLOCH; DORN, 2019).

Diferentes tipos de algoritmos podem ser utilizados nesta ferramenta podendo ser classificados como sistemáticos, estocásticos e de simulação, sendo todos eles efetivos na busca de interações de ligantes conhecidos. Cada busca por uma forma de encaixe é avaliada de

acordo com a energia de interação através da função de pontuação que pode ser baseada em campo de força, empíricas e baseadas no conhecimento (FU; MEI; ZHAO, 2019).

Alguns problemas puderam ser identificados nos primórdios da utilização desta ferramenta como: o campo de força que descreve as energias de interações intra e intermoleculares não são precisas o suficiente para calcular a afinidade de ligação entre a proteína e a molécula que deveria a ela se ligar; os computadores utilizados não são rápidos o bastante para calcular a energia de interação de todas as formas possíveis; a resolução das estruturas a serem avaliadas não eram boas; e a busca por algoritmos que explorassem as orientações e conformações das ligações não eram eficientes para identificar as posições em tempo hábil. Para isto a modificação de algoritmos, a melhoria da resolução mudanças no hardware e software entre outras modificações que ocorreram tornaram este método mais eficaz e conhecido (TAHA et al., 2018).

Com estas correções efetuadas, um processo que levaria em média 11 anos ou mais para que ocorresse tem seu tempo reduzido, pois a bioinformática juntamente com a química computacional oferecem um direcionamento ao que diz respeito a planejamento de fármacos, sendo inúmeros os casos de sucesso quando se envolve o emprego de simulações computacionais (ZHANG et al., 2019).

3.8.2.1 Protein Data Bank

Em 1971 o *Protein Data Bank* (PDB) pode ser estabelecido como sendo uma biblioteca de arquivos baseado em computador para estruturas biológicas macromoleculares em 3D com o propósito de coletar, padronizar e distribuir as coordenadas atômicas e outras informações sobre o estudo cristalográfico (SAFADEL; WHITE, 2019).

As estruturas inseridas no PDB têm seus modelos de coordenadas e dados experimentais determinados por cristalografia de raio X, ressonância magnética nuclear (RMN), criomicroscopia eletrônica tridimensional (3DEM) e outras técnicas de determinação estrutural (SMART et al., 2018). A utilização do PDB em larga escala é devido a este seguir o princípio FAIR (encontrabilidade, acessibilidade, interoperabilidade e reutilização), sigla proveniente do inglês FAIR (findability, accessibility, interoperability e reusability) desta forma podendo ser utilizado para aplicações de patentes, desenvolvimento e descoberta de drogas, publicação de inovação de pesquisas científicas e na melhoria da qualidade de vida por desenvolvimento de produtos biofarmacêuticos (WESTBROOK; BURLEY, 2019).

3.8.2.2 Autodock

Uma das principais ferramentas utilizadas para o *docking* molecular, o AutoDock, pode ser entendido como um *software* o qual prediz as ligações de conformações de ligantes às proteínas. Este programa teve inicialmente sua aplicação para analisar as formas de ligação e propriedades catalíticas de proteínas e complexos de ácidos nucleicos (KALE; OTTOOR, 2019). Para utilizar o programa AutoDock é necessário que seja utilizado em conjunto o AutoGrid que pré-calcula uma “caixa” em três dimensões de energia de interação em coordenadas da macromolécula estudada (MANAP et al., 2019).

Quando utilizado o *software*, o ligante explora os graus de liberdade espacial (rotação e translação) além de um número arbitrário de torçionamento. Uma perturbação aleatória é conferida a cada etapa e a energia de interação pode ser avaliada para cada localização e conformação (SILVA, 2019).

3.8.3 Predição farmacocinética *in silico*

De modo semelhante às predições farmacodinâmicas representadas pelos estudos de docking molecular, as propriedades farmacocinéticas por meio de ferramentas *in silico* possuem importância. Se tratando de uma alternativa válida para os processos experimentais, a utilização do ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) prediz nos estágios iniciais de planejamento a redução de falhas associadas à farmacocinética durante as fases clínicas finais (ARBITRIO et al., 2018; PATEL et al., 2018).

Antes que novos medicamentos possam ser desenvolvidos é necessário que haja uma redução das falhas clínicas, permitindo a seleção antecipada dos melhores candidatos para o desenvolvimento e a rejeição dos que possuem baixa chance de sucesso (REN; SAI; CHEN, 2019).

A regra de Lipinski pode ser elaborada com o intuito de indicar um candidato a fármaco por suas propriedades a partir da estrutura molecular do protótipo (PONGAKU et al., 2019). A violação de mais que um dos parâmetros associados a regra de Lipinski pode indicar problemas com a biodisponibilidade, para os compostos oralmente ativos devem ser analisadas algumas faixas de valores para as propriedades físico-químicas sendo estas: peso molecular (≤ 500 g/mol⁻¹), Log P (≤ 5), número de doadores de ligação de hidrogênio (≤ 5) e número de aceptores de ligação de hidrogênio (≤ 10) (LONG et al., 2019).

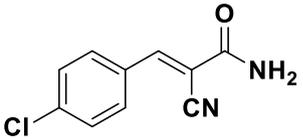
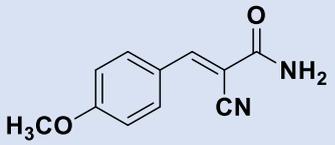
Além dos parâmetros observados na regra de Lipinski o metabolismo do fármaco é um fator determinante nas predições farmacocinéticas, o processo de metabolização dos fármacos pode ser compreendido em duas fases. Na primeira as moléculas passam pelo metabolismo

hepático de forma a serem funcionalizadas por meio de reações de oxirredução e sequencialmente hidrolisadas por catálise enzimática (MAYER et al., 2019). Na segunda fase reações de conjugação com grupos endógenos polares produzem metabólitos solúveis em água para que sejam facilmente excretados pela urina e bile (KARAS et al., 2019).

3.9 Compostos carbonílicos α , β -insaturados

Alguns trabalhos publicados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos da Universidade Estadual da Paraíba indicaram que compostos contendo em sua estrutura carbono carbonílico α,β -insaturados, que tem capacidade de atuar como aceptores de Michael, puderam ser descritos em estudos realizados por Santos (2017) como capazes de inibir o crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA). Neste, foram observados valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) que podem ser encontrados na Tabela 1.

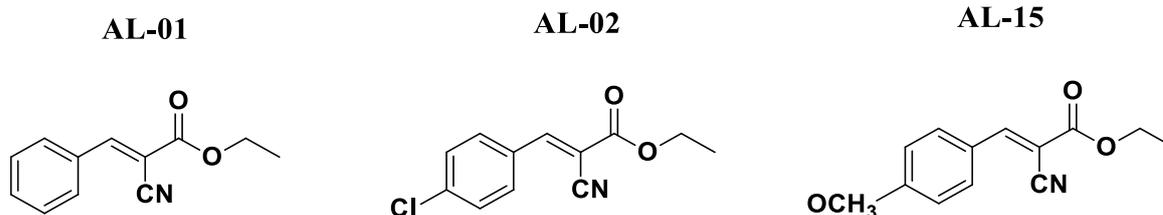
Tabela 1: Compostos sintetizados por Santos (2017) e seus respectivos valores de CIM

Código	Estrutura	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>S. aureus</i> (MRSA) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
EE-03		128	>1024	32
EE-06		512	>1024	>1024

Fonte: Santos (2017).

Os compostos do mesmo grupo de pesquisa exibidos por Pereira (2016) que possuem carbonos α , β - insaturados em relação à carbonila apresentaram-se também como possíveis antimicrobianos, fazendo-se jus à realização de novos testes relativos à atividade antimicrobiana, modulatória e sinérgica. As estruturas destes compostos podem ser observadas na Figura 19.

Figura 19: Estrutura dos compostos sintetizados por Pereira (2016) contendo carbonila α , β -insaturado.



Fonte: Própria

O AL-01 demonstrou, em estudos realizados por Farias (2018) CIM de $512 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *Staphylococcus saprophyticus* e $256 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 sendo respectivamente bactérias Gram positiva e Gram negativa. Os resultados apresentados e a possibilidade de apresentarem capacidade de atuar como aceptores de Michael indicam que os compostos estudados por Santos (2017), Pereira (2016) e Farias (2018) podem ser utilizados tanto para impedir o crescimento de algumas cepas bacterianas quanto para inibição enzimática podendo revelar efeitos modulatórios e/ou sinérgicos.

4 METODOLOGIA

A partir destes conhecimentos pôde-se empregar o uso de ferramentas computacionais e metodologias para a síntese de compostos que possam combater ou reduzir a ação proliferativa bacteriana por meio da inibição enzimática. Os testes realizados a partir de métodos específicos acarretam coleta de dados para o fim de comprovar a síntese e indicar a possibilidade da ação antimicrobiana.

4.1 Materiais

Para a síntese e demais análises foram utilizados os seguintes equipamentos, os métodos, reagentes e solventes empregados estão descritos no tópico seguinte.

- Placa agitadora (IKA RH basic 1);
- Balança analítica (BEL Engineering Mark M214A);
- Fusiômetro (Quimis Q-340M);
- Condensador;
- Barra magnética;
- Balão de fundo redondo (150 mL);
- Placa de Kline;
- Pipeta graduada;
- Funil de vidro;
- Papel de filtro;
- Placa de cromatografia de camada delgada;
- Espectrômetro (Bruker AMX-500 MHz);
- Centrífuga;
- Espectrofotômetro;
- Câmara de radiação ultravioleta.

4.2 Estrutura molecular

De acordo com os trabalhos anteriormente descritos de Santos (2017), Pereira (2016) e Farias (2018) juntamente com o conhecimento da capacidade de compostos carbonílicos α , β -insaturados atuarem como aceptores de Michael frente a enzimas, moléculas de modelos estruturalmente semelhantes puderam ser delineadas.

O desenho básico de todas as estruturas compreende um grupo metileno ativo com diferentes substituintes de acordo com a árvore de decisão de Topliss, condensado com diferentes compostos carbonílicos ou a malonitrila. As moléculas aqui propostas estão

fundamentadas na ação antibacteriana observada por seus semelhantes e na reação de adição que pode proporcionar inibição enzimática de acordo com a literatura.

4.3 Gráfico Ramachandran

O gráfico Ramachandran para os alvos apresentados puderam ser obtidos por meio da plataforma online RAMPAGE (<http://raven.bioc.cam.ac.uk/rampage.php>). Para analisar o gráfico uma tabela com as regiões favoráveis, permitidas e *outlier* fora utilizada para melhor representar a qualidade da macromolécula em que deve ter a partir de 98% de regiões favorável e cerca de 2% de permitidas.

4.4 Docking molecular

As estruturas das enzimas aqui analisadas foram obtidas por meio de pesquisa em banco de dados *Research Collaboratory of Structure Bioinformatics Protein Data Bank* (RCSB PDB). As estruturas cristalográficas selecionadas para este estudo priorizaram-se por sua resolução e classe de β -lactamase, sendo neste caso as encontradas através do código de identificação 4Y0U (representando as oxacilinas) de resolução 2,6 Å e o 1IYO (representando as ESBLs) de resolução 1,8 Å. As estruturas apresentaram-se no sistema de expressão *Escherichia coli*, sendo classificadas como hidrolases e obtidas pelo método de Difração de Raio-X (DRX). Ambas as macromoléculas possuíam ligantes co-cristalizados.

Com o intuito de identificar o sítio ativo e realizar o estudo *in silico*, gerando as energias de interação entre os átomos da molécula a ser testada com os átomos de resíduos aminoácidos, o AutoGrid presente no *software* AutoDockTools versão 1.5.6 (ADT) proporcionou um *grid box* dimensionado para 30 Å nos três eixos cartesianos centralizado com um espaçamento de 0,375 Å. Para a macromolécula 4Y0U o centro utilizado está nas coordenadas -5,676; -8,974; e 62,092 para os eixos x, y e z respectivamente. As mesmas condições puderam ser utilizadas para o 1IYO com o centro localizado em -4,317; -49,213; e 60,309. Para o PBP transpeptidase de código 3MZE foi utilizado o centro 42,866; 6,198; e 30,494 e para o rRNA de código 3MTE um *GridBox* de 36x30x30 e coordenadas 27,877; 16,668; e 23,046 para x, y e z respectivamente. A seguir o algoritmo genérico Lamarckiano (LGA) gerou os cálculos de interação para uma busca geral e específica nas simulações realizadas através do programa ADT, gerando além do escore baseado na energia livre de ligação (ΔG) uma constante de inibição estimada (K_i).

4.4.1 Preparação da enzima

Das estruturas cristalográficas puderam ser removidos resíduos de água e qualquer átomo não ligado e ligantes por meio da alteração do código do PDB pelo software EduPyMOL.

4.4.2 Preparação dos ligantes

As estruturas tridimensionais para os compostos puderam ser transcritas a partir da estrutura bidimensional inserida no programa ChemDraw Ultra versão 12.0. Para determinar a conformação de energia mais favorável de cada molécula o cálculo de MM2 (método de mecânica molecular) realizado pela ferramenta Chem3D Pro versão 12.0 que compara ângulos e distâncias de ligação que compõem a molécula, reconhecendo mudanças que promovem uma melhor estabilidade.

4.4.3 Validação do estudo de docking

As estruturas cristalográficas obtidas por meio do *Protein Data Bank* puderam ser baixadas co-cristalizadas com seus respectivos inibidores, foi realizada a redocagem como parâmetro de validação. Esta metodologia consiste na submissão do mesmo ligante co-cristalizado com o bioreceptor e observadas se as interações com os resíduos de aminoácidos e a orientação espacial do ligante são preservadas. Desta forma o RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*) entre o ligante cristalográfico e a proteína devem ser o menor possível, de modo a comprovar a capacidade de prever os resultados do modelo *in silico*.

Para julgar a capacidade de predição dos resultados da energia livre de ligação, utilizou-se uma tolerância do desvio quadrático médio da raiz posicional (do inglês *Root Mean Square Deviation*, RMSD) como até 2,0 Å; os resultados para ΔG e K_i mais favoráveis foram selecionados como estrutura complexa resultante. A fim de analisar os resultados do estudo o *software* DiscoveryStudio versão 2017 R2 Client foi utilizado as regiões nas quais ocorrem as interações, os seus tipos, energia e resíduo de aminoácidos do sítio ativo da enzima envolvida.

4.5 Predições farmacocinéticas e toxicidade *in silico*

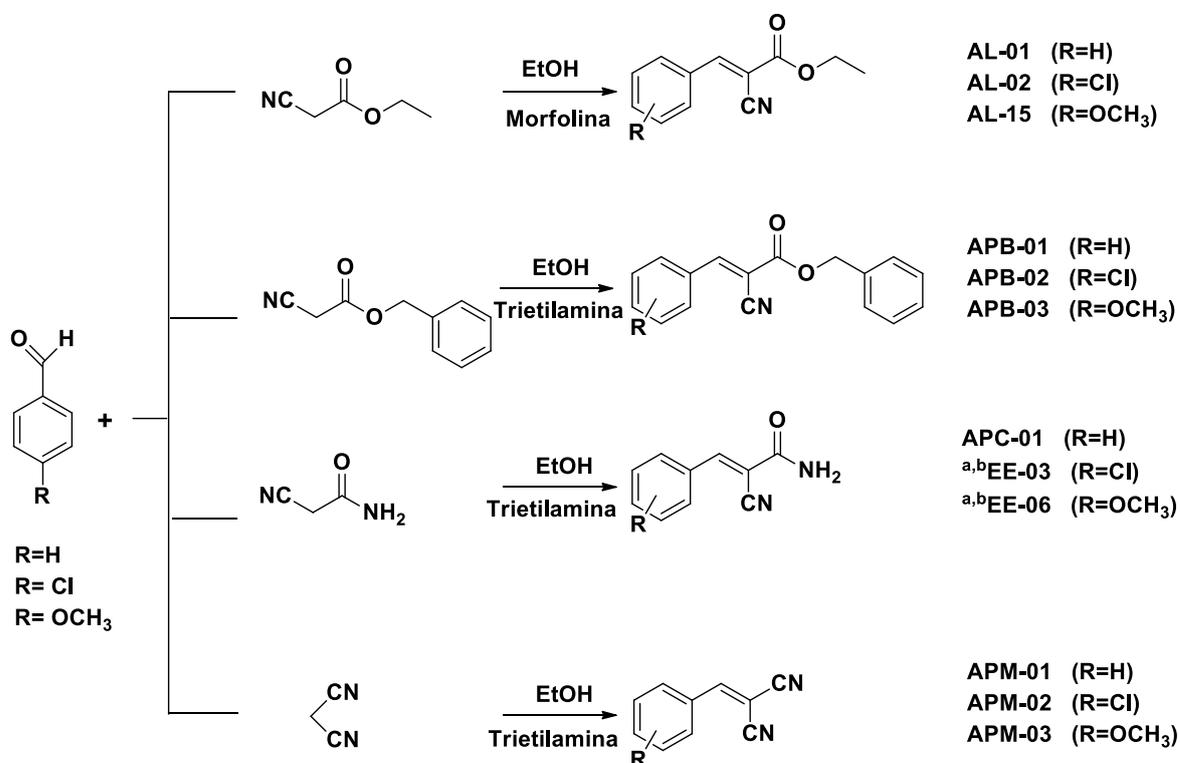
As predições farmacocinéticas podem ser avaliadas por intermédio de plataformas online, disponibilizada de forma gratuita e apresenta resultados relevantes para discussões e correlações. Os programas utilizados permitem prever propriedades de absorção, Log P, Log S, alguns inibidores de CYP450 e comparações de *druglikenees*. Para este fim as plataformas SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>), XenoSite (<https://swami.wustl.edu/xenosite/>) e admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/>) puderam ser usadas, esta última também conferiu resultados de diversas toxicidades.

4.6 Síntese

As sínteses orgânicas foram realizadas na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, no Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos localizado no prédio Três Marias, 1º andar.

Para obter os diferentes produtos sintéticos em estudo, benzaldeídos com diferentes substituintes (Hidrogênio, Cloro e Metoxila) em posição *para* reagiram individualmente com diferentes compostos contendo grupamento metileno ativo na presença de catalisador básico, etanol e conforme o Esquema 3, temperatura pode ser adicionada ao sistema.

Esquema 3: Esquema reacional da síntese dos produtos em estudo.



Legenda: a=Morfolina, b= Temperatura

Fonte: Autoria (2020).

As reações ocorreram em balão de fundo redondo com capacidade de 100 mL, onde 200 mg do composto contendo grupo metileno ativo foi solubilizado sob agitação magnética em 8 mL de etanol grau HPLC a temperatura ambiente, a seguir foram adicionadas 5 gotas do catalisador básico indicado pelo Esquema 4. Aguardados 5 minutos de agitação, acrescentou-se lentamente o aldeído correspondente a cada produto na mesma equivalência molar, mantendo sempre o sistema em agitação e permanecendo a temperatura ambiente até a completa

transformação de reagentes em produtos, sendo esta finalização acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD).

Ao final da reação, verificado por meio da visualização do CCD o produto pode ser precipitado adicionando ao sistema água destilada, os cristais sofreram uma maturação em temperatura reduzida por cerca de 1 hora. A seguir, o sistema passou por um processo de filtração em papel de filtro granulometria 80 g.m⁻², o líquido sobrenadante foi descartado por quando não houve a formação de segundo cristal. O sólido adquirido passou um processo de secagem a temperatura ambiente, em seguida foi cuidadosamente retirado do papel de filtro e pesado para a determinação do rendimento da reação.

Este procedimento pôde ser realizado com êxito em todas as reações com exceção da reação do derivado 2-cianoacetamida com o benzaldeído (APC-01) na qual as condições reacionais mantiveram-se e sua finalização efetuou-se com a adição de água, seguida de neutralização com ácido acético e resfriamento.

Os compostos sintetizados têm sua nomenclatura segundo a IUPAC indicados na Tabela 2, bem como seus códigos de identificação para o presente estudo.

Tabela 2: Nomenclatura padrão IUPAC para as moléculas sintetizadas.

Código	Nomenclatura IUPAC	Substituinte
AL-01	(E)-etil 2-ciano-3-fenilacrilato	H
AL-02	(E)-etil 3-(4-clorofenil)-2-cianoacrilato	Cl
AL-15	(E)-etil 2-ciano-3-(4-metoxifenil) acrilato	OCH ₃
APB-01	(E)-benzil 2-ciano-3-fenilacrilato	H
APB-02	(E)-benzil 3-(4-clorofenil)-2-cianoacrilato	Cl
APB-03	(E)-benzil 2-ciano-3-(4-metoxifenil) acrilato	OCH ₃
APC-01	(E)-2-ciano-3-fenilacrilamida	H
APM-01	2-benzilmalononitrila	H
APM-02	2-(4-clorobenzili) malononitrila	Cl
APM-03	2-(4-metoxibenzil) malononitrila	OCH ₃
EE-03	(E)-3-(4-clorofenil) -2-cianoacrilamida	Cl
EE-06	(E)-2-ciano-3-(4-metoxifenil) acrilamida	OCH ₃

Fonte: Autoria (2020).

4.7 Propriedades físico-químicas

4.7.1 Aparência

A aparência dos compostos pode ser analisada por observação e comparação com diversas tabelas de cores e subtons obtidas em mecanismos de busca.

4.7.2 Solubilidade preliminar aparente

A avaliação da solubilidade para as moléculas sintetizadas frente a solventes orgânicos pode ser obtida por meio da adição de 10 mg do composto e 0,5 mL do solvente em questão.

4.7.3 Fator de retenção

O fator de retenção para os compostos sintetizados pode ser determinado a partir da comparação das medidas finais e iniciais obtidas após a eluição em sistema das moléculas (previamente solubilizadas em acetato de etila) em placas de CCD (Sílica Gel) com espessura

de 0,2 mm. A revelação das placas se deu em câmara de radiação ultravioleta, sendo suas manchas características identificadas no(s) comprimento(s) de onda 254 e/ou 366 nm.

4.7.4 Faixa de fusão

A faixa de fusão pode ser determinada por meio de uma pequena quantidade do produto inserido em capilar fechado e analisadas através do aparelho Quimis®, modelo Q-340M. Sendo anotados os valores das temperaturas em que se inicia o processo de fusão e o mesmo é finalizado. O acompanhamento feito exclusivamente de forma visual não foi corrigido.

4.7.5 Coeficiente de Partição

Este importante fator para considerar a capacidade de uma molécula poder ser um possível fármaco pode ser predita através do desenho estrutural na ferramenta ChemDraw Ultra 12.0.

4.7.6 Espectroscopia de RMN

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram realizados em parceria com a Universidade Federal de Alagoas (UFAL) obtidos através do espectrômetro Bruker AMX-500 MHz que forneceu os dados de deslocamento químico (δ) indicados pela unidade ppm, as multiplicidades dadas em s (singletos), d (dubleto), t (tripletos), q (quartetos) e m (multipletos) utilizando o Dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado como solvente para a obtenção dos espectros para as seguintes moléculas: AL-01, AL-02, APC-01, APM-01, APM-03, EE-06. A constante de acoplamento (J) fornecido em Hertz (Hz).

4.8 Teste de hemólise

Para avaliar a capacidade hemolítica dos compostos realizou-se eritrócitos humanos do tipo O fator RH + obtidos a partir de rejeito adquirido no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) em tubos contendo anticoagulante. As células foram imediatamente levadas para que seja feito os testes onde lavagens consecutivas com solução fisiológica (0,9% de cloreto de sódio) foram realizadas. Para tal centrifugou-se o sangue durante 5 minutos a 3000 RPM para a separação de fases e o plasma eliminado sendo adicionado logo em seguida a solução fisiológica e repetida a centrifugação. Este processo de adição da solução repetiu-se por no mínimo 3 vezes, cessando apenas com a observação da completa translucidez do líquido sobrenadante.

As hemácias passaram por um processo de ressuspensão, sendo preparada uma solução de concentração 5%. Preparou-se uma solução de 200 µg.mL⁻¹ dos compostos e 5% de DMSO em balão volumétrico. Para o controle positivo utilizou-se ácido acético à 2% recém preparado. Todas as soluções presentes neste estudo foram realizadas com cloreto de sódio a 0,9%.

O experimento foi realizado em triplicata para se obter resultados fidedignos. Pipetaram-se 2 mL da suspensão de hemácias em cada tubo de ensaio e logo em seguida o mesmo volume da solução contendo os compostos (um para cada tubo) foi adicionado, após cuidadosamente homogeneizados aguardaram-se uma hora à temperatura ambiente para que houvesse a hemólise.

Decorrido o tempo os tubos de ensaio passaram por centrifugação (3000 RPM durante 5 minutos) e em seguida o líquido sobrenadante foi adicionado em uma cubeta de quartzo para posterior leitura da absorbância em espectrofotômetros calibrado em 540 nm. Como branco para esta análise utilizou-se a solução salina.

Após realizada a leitura, com a média entre as triplicatas calculada o potencial de hemólise pode ser indicado pela Equação 1. Em que H seria o potencial hemolisante; Ae, absorbância da molécula; Ab, absorbância do branco; e At, a absorbância do controle positivo (ácido acético).

Equação 1: Potencial de hemólise

$$H = \frac{Ae - Ab}{At} \cdot 100\%$$

4.9 Concentração inibitória mínima

4.9.1 Cepas testadas

No presente estudo a cepa de referência *Escherichia coli* ATCC25922, foi utilizada para o ensaio presuntivo de CIM.

4.9.2 Teste por microdiluição

A realização dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) seguiu-se o método de microdiluição em caldo para os compostos sintetizados, sendo testadas para a *Escherichia coli* através da técnica de microdiluição em caldo Mueller Hinton.

4.9.3 Padronização da suspensão bacteriana

A cepa bacteriana pode ser padronizada a partir de uma cultura cultivada em caldo Mueller Hinton por 24 horas à 36 °C. Em seguida realizou-se leitura do mesmo em

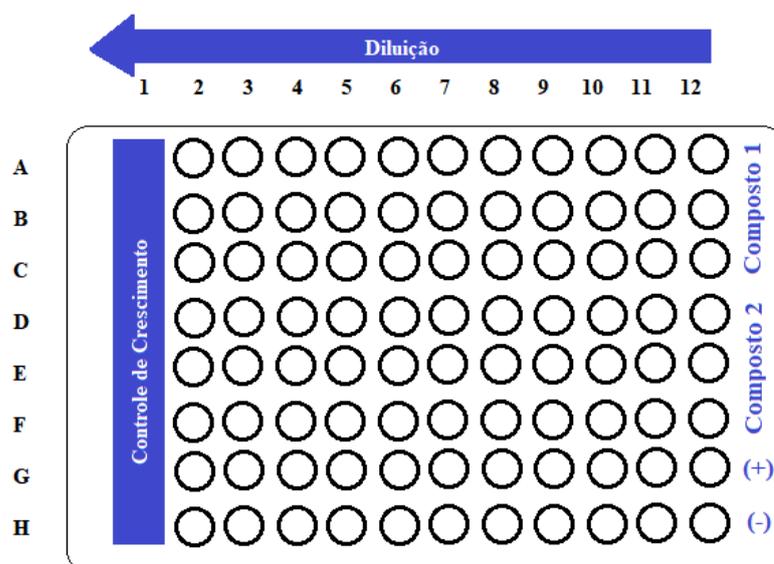
espectrofotômetro em comprimento de onda de 625 nm, sendo feitas correções até que o valor da absorbância atingisse 0,250, resultando em uma faixa de concentração de 1 a 2.10^8 UFC.mL⁻¹. Com a suspensão bacteriana padronizada o inóculo pode ser 100 µL distribuídos em cada poço já contendo as moléculas teste devidamente diluídas em uma placa de Elisa (96 poços).

4.9.4 Teste da avaliação antibacteriana

Na solução teste contida em cada poço continham 10 % de Dimetil sulfóxido (DMSO), Tween 20 a 12 % e concentrações de 2048 µg.mL⁻¹ dos compostos a serem testados individualmente. Para uma maior segurança na veracidade do ensaio realizado o experimento foi realizado em triplicata. O a droga controle utilizada foi a Cefazolina comercial, sendo alguns poços reservados para o controle de esterilidade do meio e crescimento bacteriano.

Todos os poços foram preenchidos com 100 µL do Caldo Müeller Hinton (CMH) e adicionado igual volume da solução teste ao poço 12 da marcação de colunas da microplaca, a partir desta diluição a concentração do composto passa a ser de 1024 µg.mL⁻¹. Sendo este a de maior concentração, iniciando as diluições seriadas e prosseguindo-se até o segundo poço da coluna, no qual a concentração do composto passa a ser de 1 µg.mL⁻¹. As sucessivas diluições seguem o padrão indicado na placa de Elisa representada pela Figura 20.

Figura 20: Metodologia da diluição e controle para determinação da CIM.



Fonte: Própria

Com as diluições devidamente implantadas, 10 µL da suspensão de microrganismo foi adicionada em cada poço. Ao longo da linha G o fármaco Cefazolina (controle positivo) foi

destinado da coluna 2 a 12 e para o controle negativo (linha H) o solvente utilizado na produção da solução-teste pode ser adicionado. Em toda a coluna 1 continha apenas o CMH e o inóculo bacteriano.

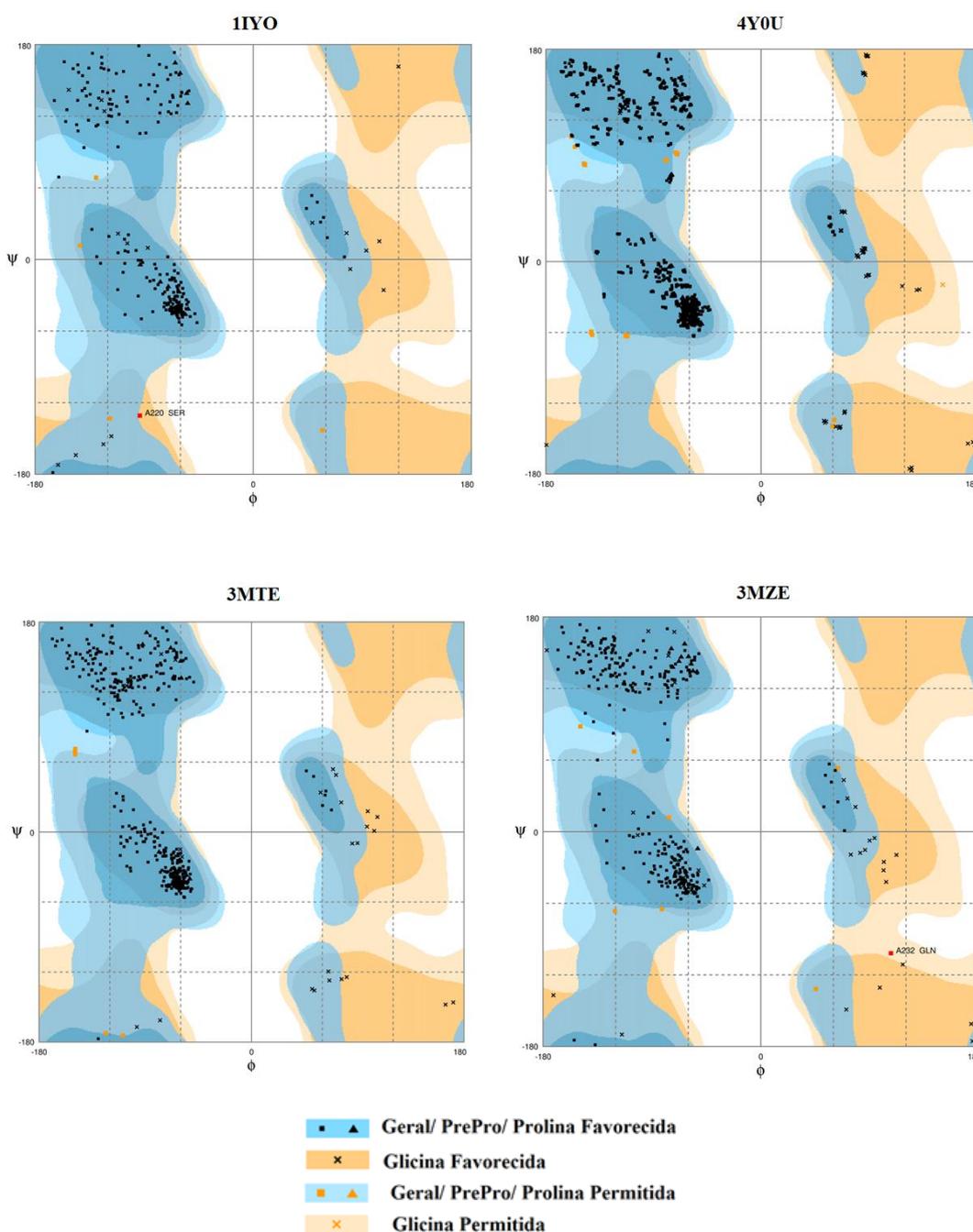
Ao final do procedimento as placas foram encubadas em estufa de 36 °C por 24 horas para que em seguida o revelador resazurina (0,01%) indicasse a presença ou ausência do crescimento bacteriano em cada poço. 20 µL do revelador foi inserido em cada orifício da placa, decorridas 3 horas em incubação verificou-se a presença da cor azul (indicando ausência do crescimento bacteriano) ou rósea (presença).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Gráfico Ramachandran

Os modelos submetidos aos testes de *docking* molecular foram analisados qualitativamente através do gráfico Ramachandran utilizando o *software* da plataforma on-line RAMPAGE. A distribuição dos resíduos para as macromoléculas 1IYO, 4Y0U, 3MTE e 3MZE estão indicadas no Gráfico 1.

Gráfico 1: Ramachandran para as macromoléculas 1IYO, 4Y0U, 3MTE e 3MZE.



Fonte: Autoria (2020).

Para os gráficos Ramachandran obtidos tem-se os quadrados que representam as combinações dos ângulos de torção para os resíduos em geral, os triângulos se referem a plotagem da combinação de ϕ e Ψ para as prolinas e o X para as glicinas. A região azul escura representa a região mais favorável para os resíduos em geral e a prolina, o tom de azul mais claro indica as permitidas. A região alaranjada apresenta apenas a glicina favorecida (escuro) e permitida (claro).

Na Tabela 3 pode ser observada a percentagem de resíduos pertencentes a região favorável, permitida e *outlier* de cada um dos alvos selecionados para o estudo de *docking* molecular em sua devida ordem.

Tabela 3: Número de resíduos e suas respectivas percentagens para cada tipo de região das macromoléculas apresentadas

Código	Região	Número de resíduos	Percentagem de resíduos (%)
1IYO	Favorável	253	98,1
	Permitida	4	1,6
	<i>Outlier</i>	1	0,4
4Y0U	Favorável	924	97,2
	Permitida	27	2,8
	<i>Outlier</i>	0	0,0
3MTE	Favorável	429	98,8
	Permitida	5	1,2
	<i>Outlier</i>	0	0,0
3MZE	Favorável	342	97,7
	Permitida	7	2,0
	<i>Outlier</i>	1	0,3

Fonte: Autoria (2020).

De acordo com o número de resíduos presentes nas regiões favoráveis do gráfico, sendo estes apontados na Tabela 3 e considerando o percentual adequado para os resultados obtidos por meio do RAMPAGE (aproximadamente 98% na região favorável e 2% na permitida) as macromoléculas 1IYO, 3MTE e 3MZE apresentaram valores favoráveis de acordo com os padrões esperados. Como os ângulos de dobramento ϕ e Ψ estão de acordo com o arranjo estrutural dos resíduos de aminoácido de modo a não haver um impedimento estérico considerável das estruturas PDB em relação aos reais esperados, os alvos indicados puderam ser validados para seu emprego no estudo de *docking*.

A macromolécula 4Y0U apesar de possuir apenas 97,2% dos resíduos nas regiões favoráveis, não apresenta resíduos na região *Outlier* que seria desfavorável energeticamente. Desta forma 2,8% destes apresentam-se de forma permitida no gráfico Ramachandran. As de código 1IYO e 3MZE apresentam apenas um resíduo no *Outlier*, sendo estes a serina e a glutamina respectivamente como indica a Tabela 3. Apesar destes, encontram-se dentro dos limites estabelecidos pelo padrão.

5.2 *Docking* molecular

Os valores apresentados possuem caráter teórico calculados *in silico*, podendo apresentar diferentes resultados ao submetê-los a testes experimentais *in vitro*, ou ainda analisando os aspectos farmacocinéticos *in vivo* fornecendo efeito inibitório diferenciado.

Apesar dos resultados do estudo de *docking* poderem prever a energia envolvida na interação enzima-substrato e suas respectivas constantes de inibição, este modelo teórico visa o alvo como sendo fixo e estático não prevendo possíveis reações e encaixes mais maleáveis. Ainda que a previsão não seja exata devido a diversos fatores, a comparação dos resultados de energia do composto com o ligante indica qual possui uma melhor interação, além disso a constante de inibição *in silico* favoráveis a uma boa interação fármaco-alvo.

5.2.1 *Redocking*

A primeira etapa para a realização do estudo de *docking* molecular consiste na validação da metodologia empregada, desta forma o *redocking* determina o quão próximo o ligante fica de sua posição inicial (proveniente do PDB da proteína co-cristalizada com o ligante). Disposto na Tabela 4 o resultado dos ligantes complexados com seus respectivos alvos, sendo indicado os valores de energia livre de ligação (ΔG) (kcal.mol⁻¹), a constante de inibição (Ki) (nM) e o valor de RMSD (Desvio Médio Quadrático do ligante) da entropia do grupamento (*clustering*).

A validação da metodologia ocorre com os valores de RMSD, o qual deve apresentar valores inferiores a 2,0 Å de forma que as funções de pontuação reproduzam adequadamente conformações em valores iguais ou inferiores a este valor (LOHNING et al., 2017).

Tabela 4: Valores de *redocking* dos ligantes com suas enzimas.

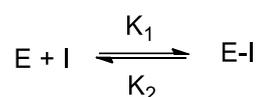
Enzima	Ligante Co-cristalizado	Código	Energia Livre de Ligação (ΔG) (Kcal.mol ⁻¹)	Ki (nM)	RMSD (Å)
Oxacilinase	ALP	4Y0U	-5,11	179,28	1,23
ESBL	CTX	1IYO	-7,02	7,12	1,42
PBP transpeptidase	1QL	3MZE	-5,69	67,79	1,98
16S rRNA	SAM	3MTE	-6,17	29,99	0,81

Fonte: Autoria (2020).

De acordo com os resultados expostos na Tabela 4, os valores de energia livre indicam uma afinidade dos ligantes com seu alvo, uma vez que quanto mais negativo seu valor mais afinidade terá com a enzima. Ademais, a constante de inibição possui valor elevado para o ALP e 1QL sendo este um aspecto ainda mais relevante para o presente estudo pois, este visa a desativação enzimática com o propósito de aumentar a eficácia dos antibióticos β -lactâmicos.

O K_i pode ser definido como a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (E-I), cuja equação é dada pela razão do produto das concentrações da enzima e do inibidor com o complexo E-I assim como demonstrado no conjunto da Equação 2 e 3. Como o K_i é inversamente proporcional a [E-I], quando há um aumento deste último consequentemente a constante de inibição decresce, portanto, uma vez que os compostos estão direcionados para uma maior formação do complexo, quanto menor o valor de K_i melhor o resultado.

Equação 2: Reação enzima inibidor.



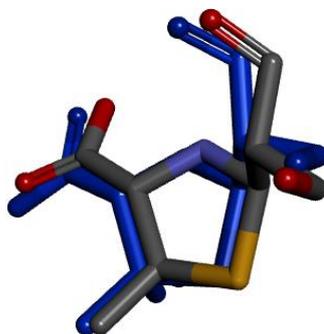
Equação 3: Constante de inibição (K_i) para a reação enzima inibidor.

$$K_i = \frac{[E].[I]}{[E-I]} = \frac{K_2}{K_1}$$

O composto co-cristalizado com o PDB da Oxacilinase, ALP de nomenclatura IUPAC ácido 2-(1-Carboxi-2-hidroxi-etil)-5,5-dimetil-tiazolidina-4-carboxílico, representa um derivado penicilínico o qual passou por um processo de hidrólise na referida enzima de forma a perder sua atividade microbiana. Esta reação envolve a quebra do anel β -lactâmico formando um derivado do ácido penicilóico. Desta maneira, o sítio onde ocorreu este processo deve ser o alvo da inativação enzimática e, portanto, o local ao qual as moléculas com este propósito devem atuar para inibi-la.

Na Figura 21 pode-se observar a posição espacial de cada átomo do ligante co-cristalizado (em azul) e do mesmo ligante redocado (em cinza). Verifica-se a posição espacial dos átomos do ALP co-cristalizado com o 4Y0U é semelhante ao do ALP redocado, estando de acordo com o RMSD indicado na Tabela 4. Na mesma imagem é possível observar ainda uma pequena diferença entre os ligantes em relação a posição do grupamento ácido ligado diretamente ao anel de cinco membros. Isto ocorre devido a pequenas variações na posição espacial, visto que o carbono que liga o grupo ao anel é sp^3 e, portanto, a ligação possui livre rotação.

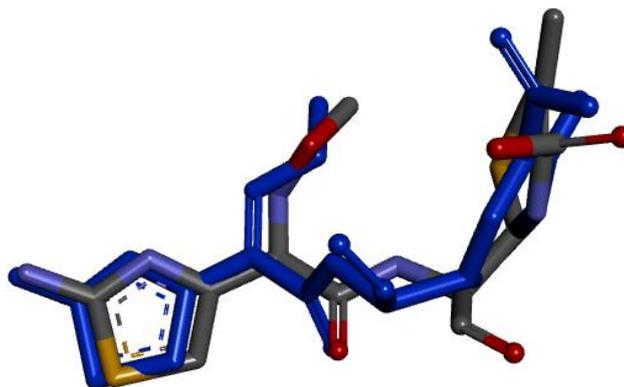
Figura 21: *Redocking* do 4Y0U



Fonte: Aatoria (2020).

Para a β -lactamase de espectro estendido (ESBL) representada pelo código 1IYO, a redocagem pode ser encontrada na Figura 22 para o seu ligante co-cristalizado cefatoxime (CTX). Possuindo, igualmente ao caso anterior RMSD inferior a 2,0 Å como indica a Tabela 4. A cefatoxime (CTX) pode ser compreendida como um antibiótico β -lactâmico de amplo espectro, por possui relativamente baixa toxicidade e seu consumo em larga escala pode produzir bactérias e genes resistentes. (DOU et al., 2020).

Figura 22: *Redocking* do 1IYO.

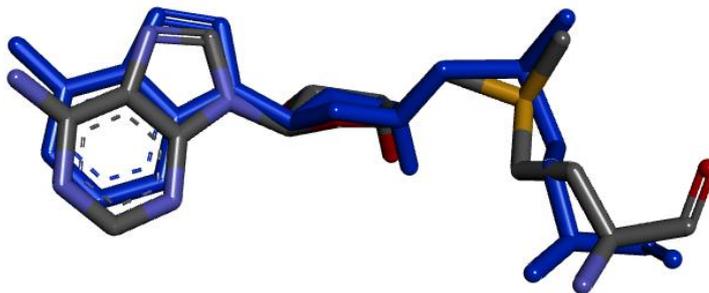


Fonte: Aatoria (2020).

É possível observar uma semelhança espacial entre o ligante co-cristalizado com a estrutura do ESBL (representado em azul) e a estrutura após realizado o procedimento do *redocking* (estrutura cinza). Apesar de semelhantes há algumas variações, isto se deve principalmente a quantidade de ligações rotáveis que implicam em ligeiras mudanças espaciais. O modelo computacional, apesar de eficiente em suas previsões, possui limitações que necessitam ser cuidadosamente avaliadas para cada ligante.

O ligante co-cristalizado com o 3MTE, sob o código SAM, pode ser encontrado pelo nome de S-adenosilmetionina que é um cofator enzimático envolvido na transferência de grupos metila que faz parte das vias metabólicas de transmetilação, transulfuração e aminopropilação (LAURINO; TAWFIK, 2017). Na Figura 23 podem ser observadas a molécula encontrada e isolada originalmente do arquivo PDB (cinza) e o *redocking* (em azul). O valor encontrado para o RMSD foi de 0,81 Å, sendo o menor valor encontrado para a referente molécula, os valores para ΔG e K_i foram de $-6,17 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ e 29,99 nM respectivamente.

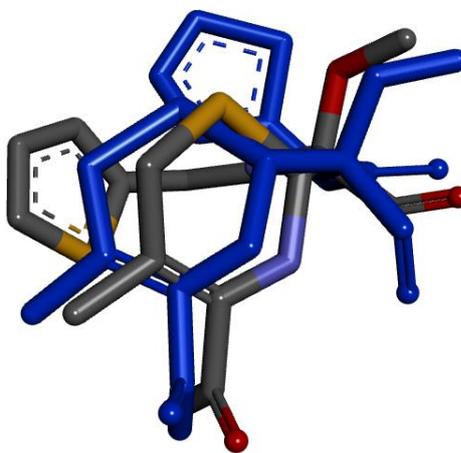
Figura 23: *Redocking* do 3MTE.



Fonte: Aatoria (2020).

Para a macromolécula encontrada sob o código 3MZE no PDB encontrou-se o ligante co-cristalizado 1QL de nomenclatura IUPAC (2R)-5-[(carbamoxyloxy)methyl]-2-[(1S)-1-methoxy-2-oxo-1-[(thiophen-2-ylacetyl)amino]ethyl]-3,6-dihydro-2H-1,3thiazine-4-carboxylic acid. Neste *redocking* obteve-se um RMSD de 1,98 Å de forma a aproximar-se do valor limite de 2,0 Å, isto se deve principalmente a maior liberdade conformacional do ligante.

Figura 24: *Redocking* do 3MZE



Fonte: Aatoria (2020).

5.2.1.1 Docking molecular da interação com a macromolécula 4Y0U

As doze moléculas propostas foram submetidas a docagem molecular, sendo suas interações testadas para a Oxacilinase (encontrada sob o código 4Y0U no PDB) e os resultados para cada uma delas e para o *redocking* do ligante co-cristalizado (ALP) inseridos na Tabela 5, assim como os valores para suas constantes de inibição estimadas. Levou-se em consideração os resultados de Energia Livre de Ligação (Kcal.mol^{-1}), sendo mais favorável a interação entre enzima e ligante quanto mais negativo for este valor. A Constante de Afinidade (K_i) (nM)

também indica uma maior afinidade do ligante a estrutura cristalográfica quando seu valor é diminuto.

Tabela 5: *Docking* molecular para as estruturas propostas e a enzima Oxacilinase representada pelo código 4Y0U, os melhores resultados estão destacados em negrito.

Código	Energia Livre de Ligação (ΔG) (Kcal.mol⁻¹)	Constante de Inibição Estimada (Ki) (nM)
AL-01	-5,96	42,46
AL-02	-6,27	25,23
AL-15	-6,07	35,55
APB-01	-7,69	2,32
APB-02	-7,76	2,06
APB-03	-7,59	2,75
APC-01	-6,43	19,46
APM-01	-5,80	56,22
APM-02	-5,95	43,5
APM-03	-5,72	64,04
EE-03	-6,38	21,11
EE-06	-6,04	37,6
ALP	-5,11	179,28

Fonte: Aatoria (2020).

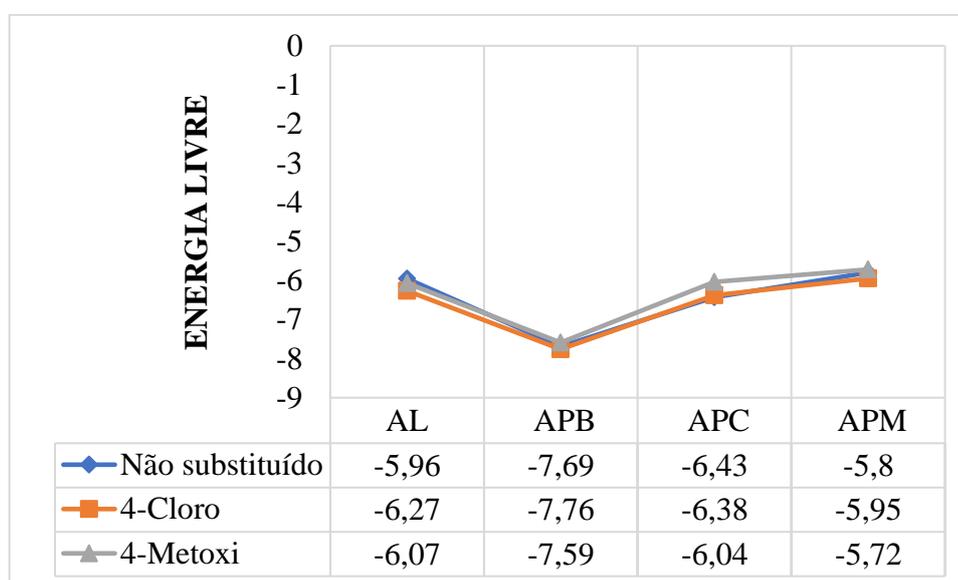
Analisando a Tabela 5, é possível observar que todos os valores obtidos para a energia livre das moléculas propostas apresentaram resultados mais favoráveis em relação ao ligante ALP, sendo os melhores resultados apontados para a série APB. Estes valores para a interação dos compostos com o alvo possuem também constantes de inibição (Ki) inferiores ao do ALP.

As energias livres apontam uma maior influência da função benzilox em relação ao éster, amida e nitrila, ou seja, determina as melhores interações com os alvos visto que a porção benzilideno não tem efetiva influência nas interações. Quando se observa do ponto de vista do

substituinte para cada série individualmente seus valores não divergem entre si, portanto sua influência de acordo com os resultados de *docking* são reduzidos. Esta afirmação pode ser melhor visualizada no Gráfico 2 em que são implantadas as energias livres e comparadas as séries e substituintes concomitantemente.

De acordo com sua semelhança estrutural as moléculas APC-01 (não substituído), EE-03 (substituinte 4-Cl) e EE-06 (substituinte 4-OCH₃) estão aqui discutidos como membro da mesma série ou família de compostos.

Gráfico 2: Comparação das energias livres para os compostos docados.



Fonte: Aatoria (2020).

Apesar dos substituintes não influenciarem significativamente a estrutura das moléculas docadas apresentaram diferenças de energia, as estruturas fornecidas para este estudo e sua interação com o alvo são de grande relevância para entender esta diferença de energia entre eles. Os resultados obtidos estão inseridos no Quadro 2 com os resíduos apresentados para cada uma delas sendo indicada o tipo de sua interação e a distância expressa em Å. Esta importante correlação auxilia no estudo da relação estrutura-atividade por meio da indicação de pontos de interação comuns, norteados os principais pontos que uma molécula deve possuir para ter excelentes resultados.

Os compostos das séries APB e APM situam-se em extremos opostos o que reforça a função benzilox como primordial para a redução energética da interação, ao avaliar os tipos de interações que ocorrem entre estes e os resíduos que são indicados no Quadro 2 pode-se notar prevaletimento de interações do tipo hidrofóbicas para os compostos APB possuindo relação

com sítio de igual característica. Estas são de suma importância para o reconhecimento intermolecular, isto ocorre devido ao envolvimento com as etapas iniciais de ligação a outras moléculas, assim uma superfície hidrofóbica otimiza o processo de interação. As ligações de hidrogênio (hidrofílica) por outro lado são próximas, e devido a sua força melhoram os valores de ΔG . As moléculas da série APM apresentam interações do tipo hidrofóbicas e hidrofílicas sendo a primeira de maior distância entre elas e os resíduos o que gera um desfavorecimento em relação às demais.

Quadro 2: Interação dos compostos com os resíduos de aminoácido presente na macromolécula de código 4Y0U e suas devidas interações. A distância indicada em Å.

	MET 225	LEU 170	SER 83	TRP 223	ALA 82	SER 130	ALA 226	ARG 263	KCX 86	TRP 117	PHE 114	SER 221	VAL 132	LYS 220
AL-01	3,78	3,29		2,84	4,49	3,48								
AL-02			3,77/ 3,39											
AL-15	4,95		3,13					5,92				3,13		
APB-01	3,76	3,24	2,71	2,86	4,35	3,33								
APB-02	3,57	3,30		3,34/ 2,66*	4,46		5,14							
APB-03	3,51	3,42			4,95	4,13	4,75	2,74				2,61		
APC-01	3,83	3,17	2,06	2,93	4,38	2,01			2,86					
APM-01	3,77	3,19		2,98	4,46	3,21	5,44							
APM-02	4,53	3,57/ 4,07		2,86/ 2,82	4,78	3,06	4,36							
APM-03	4,81	2,94					3,37						5,14	
EE-03	5,07	1,85/ 3,06								4,67	5,02		5,35	
EE-06	2,66/ 5,06	1,97/ 3,07											5,27	
ALP	4,51		2,95/ 2,61	3,34/ 4,38				4,00/ 2,88	3,56	5,45	5,51/ 5,28			4,45

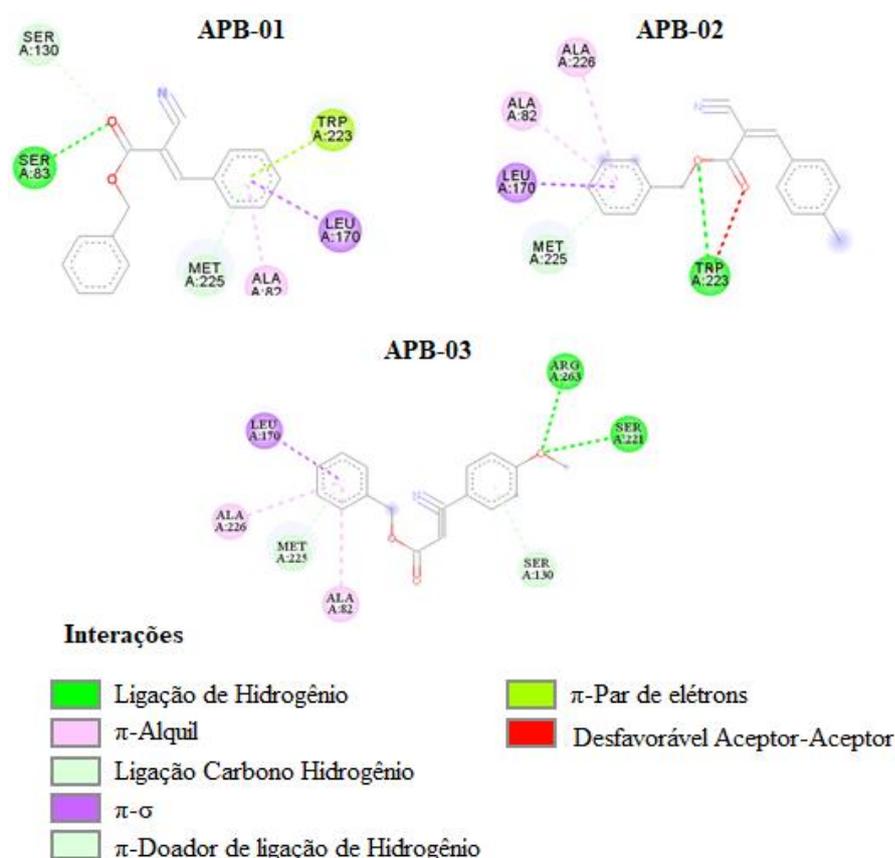
Legenda:

	Carga atrativa
	π - doador de par de elétrons
	Ligação carbono hidrogênio
	π - σ
	π -par de elétrons
	π -Alquil
	Ligação de Hidrogênio
	π -Enxofre
	Alquil
	Desfavorável doador-doador

Fonte: Autoria (2020).

Como se pode observar na Figura 25, as moléculas da série APB apresentam interações com os resíduos dos aminoácidos LEU170 (π - σ), ALA82 (π -Alquil), MET225 (π -doador de ligação de hidrogênio) sendo estas em comum para esta série. Além desta, há relação entre o APB-01 e os resíduos de SER83 (ligação de hidrogênio), SER130 (ligação carbono hidrogênio) e TRP223 (π -par de elétrons). Os resíduos se repetem para o APB-02 que apresentam além destes o TRP223 e ALA226, com interações do tipo ligação de hidrogênio e de forma desfavorável um aceptor-aceptor para o primeiro, e para o segundo π -Alquil. Para finalizar esta série, o APB-03 apresenta os resíduos de SER130 (π -Doador de ligação de hidrogênio), ALA226 (π -Alquil), SER221 (ligação de hidrogênio), ARG263 (ligação de hidrogênio). Na Figura 25 podem ser observadas as interações com os resíduos e seus respectivos tipo, bem como sua relação com a molécula analisada.

Figura 25: Interações das moléculas APB-01, APB-02 e APB-03 com os resíduos de aminoácidos da macromolécula 4Y0U.



Fonte: Autoria (2020).

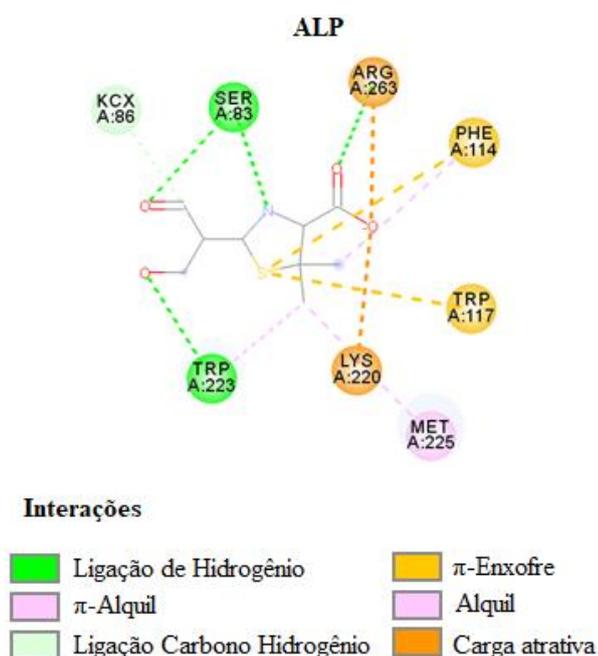
Dentre os substituintes da série APB o único que se observou a presença de interações adicionais foi a metoxila com a ARG263 e SER221 por meio de ligações de hidrogênio, que apesar de serem fortes e estarem a uma distância favorável apresentou o maior valor para a

energia livre entre os compostos promissores. Essa pequena diferença entre os substituintes hidrogênio, cloro e metoxila são decorrentes das posições de encaixe da molécula no alvo podendo ter sido menos favorável para o APB-03 devido ao tipo de interação hidrofílica em detrimento de uma macromolécula de sítio com características hidrofóbicas.

A série APB pode ter obtido melhores resultados por se tratar de moléculas estruturalmente grandes promovendo assim uma maior área de contato com o alvo em detrimento do ALP que se trata de uma estrutura pequena e sem grandes restrições conformacionais. Além disso, os anéis aromáticos presentes em quaisquer estruturas apresentam um maior número de interações com os aminoácidos que outras partes da molécula o que favorece os APBs que possui as funções benzilox e benzilideno.

Para as moléculas apresentadas houve a presença de um a três resíduo em comum com o ligante co-cristalizado sendo encontrados os resíduos: KCX86 interagindo por meio de ligação carbono hidrogênio com o carbono sp^2 ; SER83 com a ligação de hidrogênio sendo efetuada em dois pontos da molécula, o oxigênio e o nitrogênio; ARG263 e LYS220 que se relacionam com a porção ácida ligada ao anel de cinco membros por meio de atração de carga e ligação de hidrogênio; PHE114 e TRP117 interagindo por meio de π -Enxofre; MET225 com a interação hidrofóbica π -Alquil; e TRP223 com ligações de hidrogênio. Na Figura 26 pode-se observar as interações dos resíduos de aminoácido com o ligante co-cristalizado.

Figura 26: Resíduos de aminoácidos e suas respectivas interações com a molécula co-cristalizada, ALP.



As demais representações das interações com os resíduos de aminoácidos referentes ao modelo bidimensional para o estudo de *docking* molecular com a macromolécula 4Y0U podem ser encontrados no Apêndice.

5.2.2 *Docking molecular da interação com a macromolécula 1IYO*

Além dos testes realizados com a Oxacilinase (4Y0U) as moléculas foram submetidas a testes com a ESBL encontrada sob o código 1IYO no *Protein Data Bank*, os valores encontrados para a energia livre de ligação (ΔG) e para a constante de inibição estimada (K_i) estão submetidos na Tabela 6.

Tabela 6: *Docking* molecular para as estruturas propostas e a enzima ESBL representada pelo código 1IYO, os melhores resultados estão destacados em negrito.

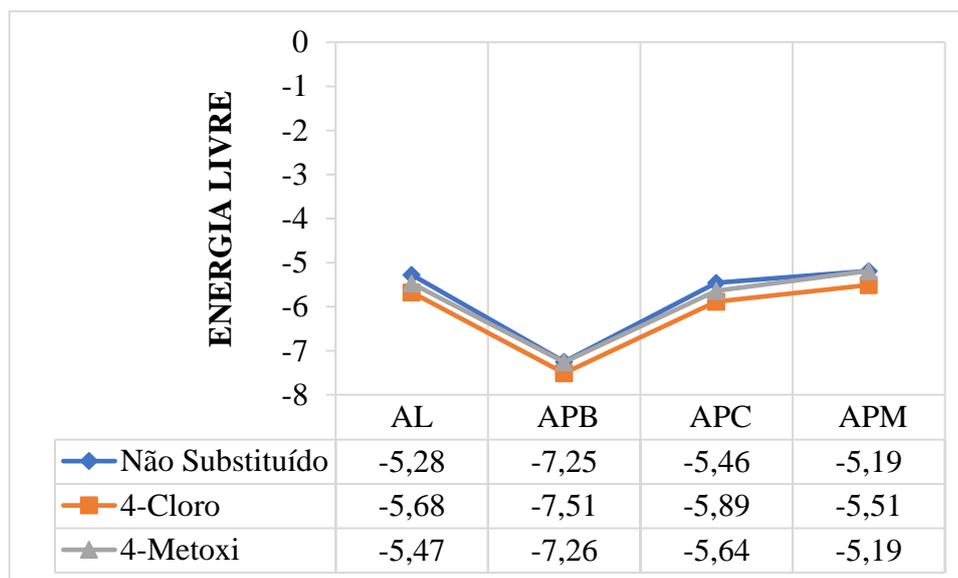
Código	Energia Livre de Ligação (ΔG) (Kcal.mol⁻¹)	Constante de Inibição Estimada (K_i) (nM)
AL-01	-5,28	134,52
AL-02	-5,68	68,42
AL-15	-5,47	97,88
APB-01	-7,25	4,84
APB-02	-7,51	3,12
APB-03	-7,26	4,76
APC-01	-5,46	99,49
APM-01	-5,19	157,26
APM-02	-5,51	92,04
APM-03	-5,19	155,60
EE-03	-5,89	47,85
EE-06	-5,64	73,84
Cefotaxime	-7,02	7,12

Fonte: Aatoria (2020).

No estudo realizado observou-se que apesar da Cefotaxime apresentar melhor afinidade com o alvo em relação a maior parte dos compostos, a série APB se destaca por sua diminuta energia livre além disso, seu K_i possui valor favorável em relação aos compostos planejados. Apesar dos demais compostos possuírem um ΔG menos negativo que esta série e a Cefotaxime seus valores podem ser considerados viáveis para a utilização destes como possíveis inibidores da citada enzima, visto que outros fatores devem ser considerados como a predição farmacocinética.

De acordo com os resultados inseridos na Tabela 5 e Tabela 6, as moléculas que apresentaram menor energia livre foram as da série APB indicando um favorecimento destas em relação as demais como candidatas a inibição das β -lactamases testadas (Oxacilinase e ESBL). Apesar da pouca diferença entre os valores energéticos de mesma série para os substituintes, os que continham Cloro obtiveram melhores resultados de ΔG como pode ser observado no Gráfico 3.

Gráfico 3: Comparação das energias livres para os compostos docados.



Fonte: Aatoria (2020).

É possível observar a predominância das interações do tipo ligação de hidrogênio em todas as moléculas do estudo sendo no ligante co-cristalizado a de maior quantidade, indicando que diferente do *docking* anterior este alvo possui caráter do sítio ativo mais hidrofílico. Os compostos da série APB apresentam além de ligação de hidrogênio as do tipo π -doador de pares de elétrons de forma semelhante ao CFX.

A interação é mais forte quanto menor for a distância entre a molécula e o resíduo de aminoácido presentes. Desta maneira, ao comparar as interações do ASN170, ASN132, SER237 e SER 130, que os compostos AL-01 e APB-01 (compostos não substituídos) têm em comum percebe-se uma pequena diferença que favorece o APB-01. Essa maior aproximação frente aos resíduos o proporciona uma energia mais negativa, favorecendo sua interação. O Quadro 3 indica as interações respectivas das moléculas propostas e os resíduos de aminoácido do sítio ativo do 1IYO.

Quadro 3: Interação dos compostos com os resíduos de aminoácido presente na macromolécula de código IYYO e suas devidas interações. A distância indicada em Å.

	ASN 170	ASN 132	SER 237	SER 130	ASN 104	SER 70	LYS 73	THR 235	LYS 234	GLY 236	TYR 105	GLY 238	ASP 240	ARG 274
AL-01	2,69	2,86	4,07	3,62					4,59					
AL-02		3,48								3,18	4,26			
AL-15	2,74	3,23	3,74								3,87			3,08
APB-01	2,67	2,77	3,76	3,82										
APB-02		2,89		3,43	2,98/ 3,02	3,51								
APB-03	2,85	3,00		3,41	3,07	3,54								
APC-01	2,97	3,00	2,16						4,88					
APM-01	2,98		3,72	3,84										
APM-02	3,68		2,90											
APM-03	3,71		2,93											
EE-03	3,90		3,29	2,27/ 2,83		2,49/ 2,12								
EE-06	3,86		3,34	2,87/ 2,26		2,52/ 2,15								
CFX	2,63 3,16	2,92	3,01	2,79			2,66	2,64	3,81	2,87	4,00	3,53	3,10	

Legenda:

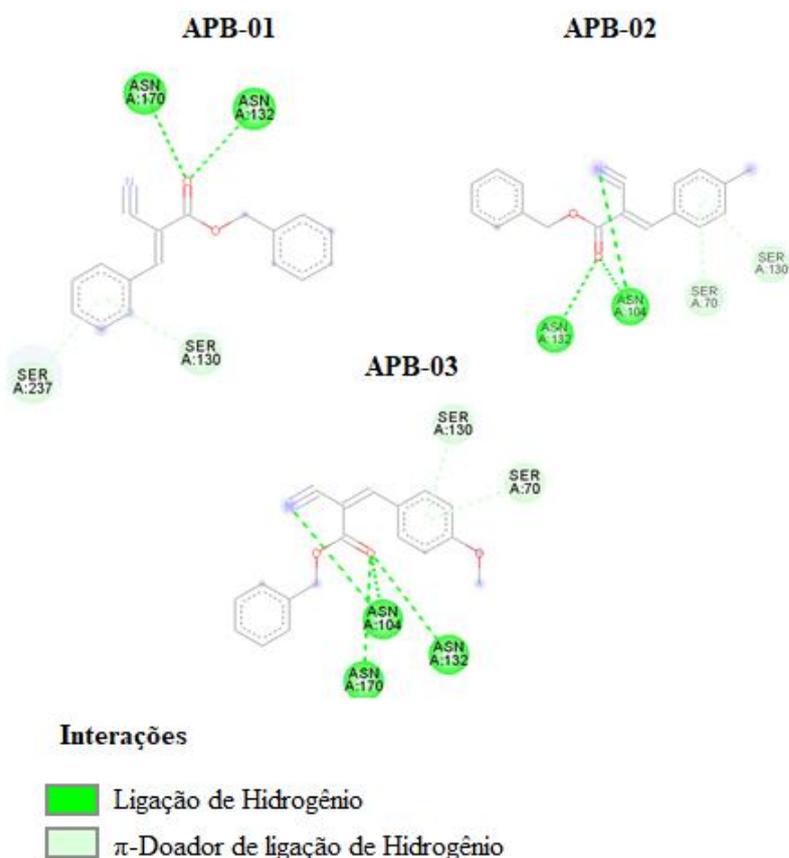
	Carga atrativa
	Ligação de Hidrogênio
	π -cátion
	π -Enxofre
	π -alquil
	Desfavorável doador-doador
	π - σ
	π -doador de par de elétrons
	Ligação carbono-hidrogênio
	Desfavorável aceptor-aceptor

Fonte: Autoria (2020).

As moléculas APB apresentaram-se como tendo os melhores resultados de ΔG e K_i sendo apontado em comum dois resíduos, o ASN132 e SER130, além destes o APB-01 apresentou o ASN170 e o SER237. Para o APB-02 mais dois além dos comuns puderam ser encontrados sendo eles o ASN104 e SER70. Por fim a molécula APB-03 apresentou três resíduos adicionais, ASN170, ASN132, ASN104 e SER170. A Figura 27 indica as interações em comum para o

presente estudo de *docking* relativos as moléculas que apresentaram melhor interação com o alvo 1IYO e a Cefatoxime.

Figura 27: Resíduos de aminoácido do alvo 1IYO e suas respectivas interações com as moléculas APB-01, APB-02 e APB-03.



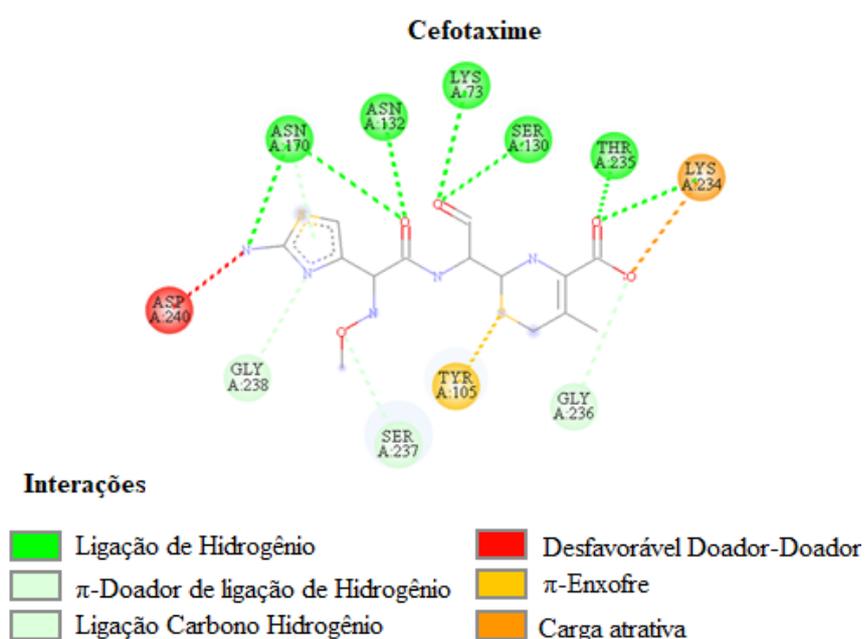
Fonte: Autoria (2020).

Os substituintes das moléculas não apresentaram diretamente uma interação com resíduos de aminoácidos, porém deslocaram as interações para lados opostos quando comparado o APB-02 com APB-03 sendo as SER70 e SER130 mantendo-se em comum. O APB-01 não apresentou interações com o resíduo SER70 sendo este substituído pelo SER237 formando uma angulação (resíduo- elétrons π) maior que os demais, implicando em uma maior distância e energia menos favorável.

Em acréscimo, é notório uma predominância nas interações hidrofílicas para os compostos apresentados no Quadro 3, não obstante os melhores compostos (APBs) para esta macromolécula apresentaram interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio e π -doador de ligação de hidrogênio. O envolvimento destas interações mais fortes e uma maior área de contato dos compostos com o alvo favorecem os resultados promissores para a série.

De acordo com os resultados de *docking* para as interações relativas ao processo de *redocking* do ligante co-cristalizado as interações são realizadas via ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácido ASN170, ASN132, LYS73, SER 130, THR235; por meio das ligações carbono hidrogênio e π - doador de ligação de hidrogênio com GLY238, SER237 e GLY236; apresenta para a LYS234 tanto cargas atrativas quanto ligação de hidrogênio; com o TYR105 uma relação do tipo π -Enxofre e para o ASP240 uma interação desfavorável que ocorre entre o nitrogênio e o ASP 240. Alguns destes resíduos podem ser observados para as moléculas que obtiveram resultados mais promissores neste estudo *in silico*.

Figura 28: Interação da Cefotaxime com a macromolécula 1IYO.



Fonte: Aatoria (2020).

O CFX apresentou em comum com as moléculas apresentadas boa parte das interações intermoleculares com os resíduos de aminoácido, principalmente devido a este apresentar tamanho estrutural semelhante aos APBs, sendo sua maioria com os: ASN170, ASN132, SER237 e SER130. Não sendo observados os resíduos LYS73, THR235, GLY238 e ASP240 em comum com nenhum dos compostos docados.

5.2.3 *Docking molecular da interação com a macromolécula 3MZE*

Um grupo de proteínas que está intimamente relacionada com o mecanismo de ação dos β -lactâmicos é a *Penicillin Binding Protein* (PBP) pois, ao ligar-se a ela promove a inibição sintética da parede celular bacteriana (CASTANHEIRA et al., 2020). Deste modo, o propósito do *docking* molecular para esta enzima direciona-se para a investigação da capacidade dos

compostos em exercer, além da função de adjuvante, uma potencialização do efeito farmacológico relativo ao antibiótico.

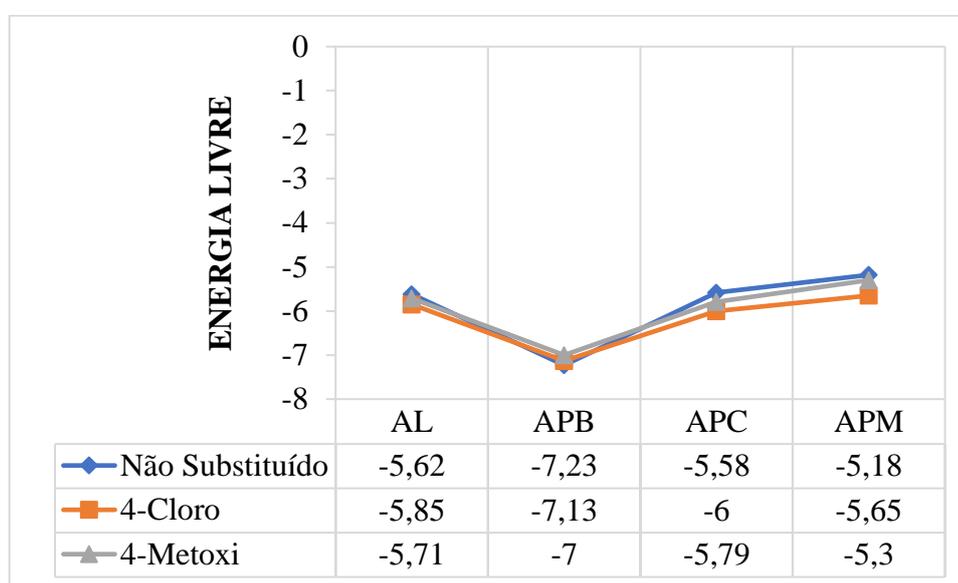
A estrutura cristalográfica da PBP, uma transpeptidase extraída da *E. coli*, pode ser encontrada sob o código 3MZE e foi utilizada para realizar o *docking* molecular das doze moléculas propostas. Os resultados obtidos para cada uma destas moléculas e para o *redocking* do ligante co-cristalizado de nome IUPAC (2R)-5-[(carbamoxyloxy)methyl]-2-[(1S)-1-methoxy-2-oxo-1-[(thiophen-2-ylacetyl)amino]ethyl]-3,6-dihydro-2H-1,3thiazine-4-carboxylic acid (código: 1QL) estão dispostos na Tabela 7, encontra-se os valores para a energia livre de ligação (Kcal.mol⁻¹) e constante de inibição estimada (nM).

Tabela 7: *Docking* molecular para as estruturas propostas e a transpeptidase PBP representada pelo código 3MZE, os melhores resultados estão destacados em negrito.

Código	Energia Livre de Ligação (ΔG) (Kcal.mol⁻¹)	Constante de Inibição Estimada (Ki) (nM)
AL-01	-5,62	76,36
AL-02	-5,85	51,77
AL-15	-5,71	65,69
APB-01	-7,23	5,02
APB-02	-7,13	5,97
APB-03	-7,00	7,38
APC-01	-5,58	81,78
APM-01	-5,18	159,72
APM-02	-5,65	72,32
APM-03	-5,30	130,69
EE-03	-6,00	40,26
EE-06	-5,79	57,18
1QL	-5,69	67,69

Dentre as moléculas analisadas apenas a série APM e o AL-01 apresentaram valores de ΔG menos negativos em relação ao *redocking* do ligante co-cristalizado. Nota-se um acentuado decréscimo nos valores de ΔG para os compostos da série APB, sendo novamente os mais promissores energeticamente as interações com os resíduos de aminoácido para esta última contempla majoritariamente a porção benzilox que demonstra ser uma porção importante frente a enzima. Ao avaliar os valores para a constante de inibição estimada (K_i) observa-se valores abaixo para a série APB, principalmente para a molécula não substituída. O Gráfico 4 apresenta a comparação do ΔG entre as séries e seus componentes.

Gráfico 4: Comparação da energia livre de ligação para os compostos docados.



Fonte: Aatoria (2020).

Observando os substituintes para cada série os 4-Cl prevalecem em detrimento dos demais, essa diferença energética chega a ser de $0,47 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ para o extremo superior entre o APM-01 e APM-02. No quesito substituinte, os APBs mostraram-se como uma exceção no qual o composto não substituído (APB-01) apresenta valores mais negativos. Semelhantemente aos resultados anteriores, a diferença energética entre família não é significativa, devendo ser utilizados outros testes (*in vitro* e *in vivo*) para manter, descartar ou seguir caminho pela árvore de decisão de Topliss.

No Quadro 4 podem ser encontradas as interações entre os compostos com os respectivos resíduos de aminoácidos da PBP, seu tipo (representado esquema de cores) e distância em Å. Apesar de serem diversificada a lipofilicidade das interações, sua maioria compreende as

ligações de hidrogênio (hidrofílico) e estas são ainda mais próximas quando comparado as do tipo alquil e π -alquil.

Quadro 4: Interação dos compostos com os resíduos de aminoácido presente na macromolécula de código 3MZE.

A distância indicada em Å.

	SER 86	SER 44	LYS 47	SER 87	SER 110	THR 217	ARG 248	PHE 245	ARG 198	ALA 43	LEU 153	ASN 112	HIS 216	HIS 151	LYS 213
AL-01	3,41	2,91	3,09	3,03	2,98										
AL-02		3,50				2,90	4,27	4,55	4,46						
AL-15		3,64				3,28	2,81/ 4,17								
APB-01	3,39	3,70	3,03	2,98	3,32					4,54	3,85	2,71			
APB-02	5,42			3,25	3,01				3,27/ 2,90		5,36/ 4,30	3,51			
APB-03		3,23			3,68		4,80/ 2,78	3,85	3,91	5,03	3,88	2,92			
APC-01			4,62/ 3,37			1,76							2,21		
APM-01		3,29		3,44	2,91					4,87	3,88				
APM-02		2,73								4,91	3,68		3,10		
APM-03		2,74			3,05		2,82			5,31				2,85	
EE-03						2,19	4,40	4,63					1,97		
EE-06						2,22	2,83/ 4,19						1,95		
1QL		3,22	3,70	3,25			4,92		4,37	4,76	3,98		3,37		5,17

Legenda:

	Ligação de hidrogênio
	Ligação carbono hidrogênio
	π -cátion
	π -alquil
	Alquil
	π -doador de ligação de hidrogênio
	π - σ
	π - π Formato T
	π -par de elétrons
	Carga atrativa

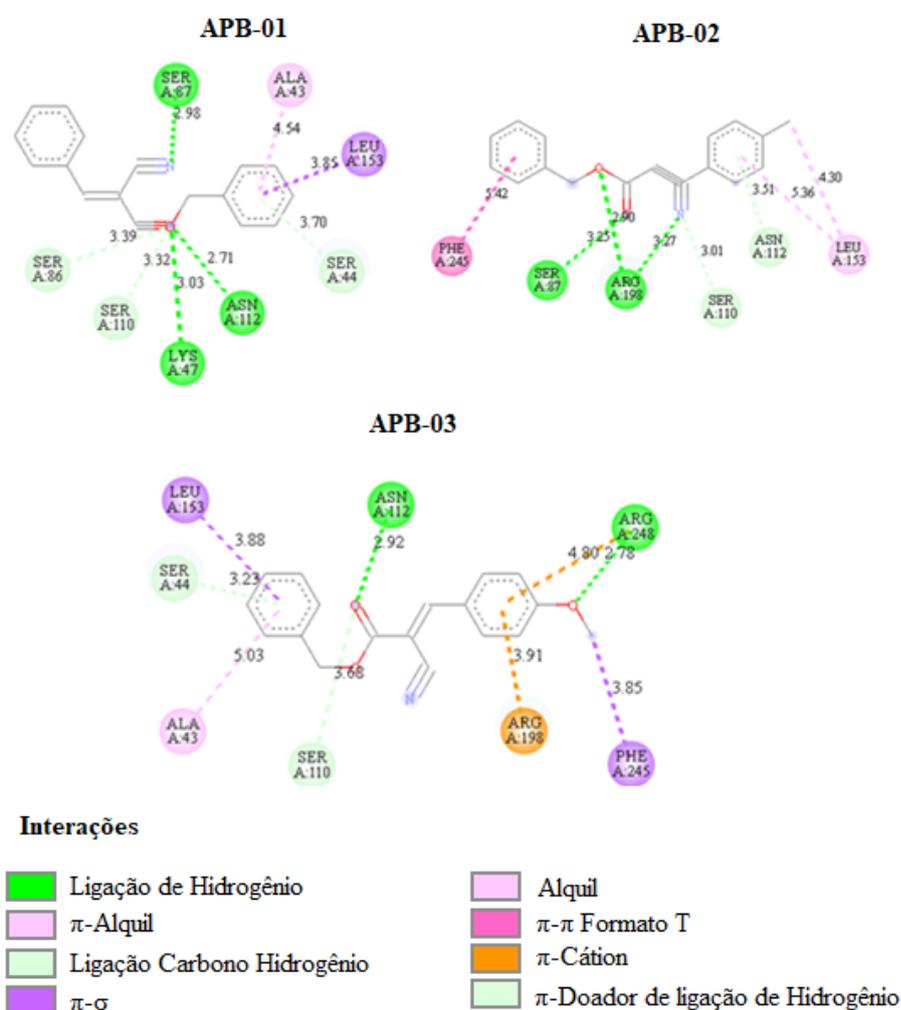
Fonte: Aatoria (2020).

O APB-01 apresentou ligação de hidrogênio com os resíduos de LYS47, SER87 e ASN112 com as distâncias de 3,03; 2,98; e 2,71 Å respectivamente. Essa proximidade e a força que este tipo de interação confere proporciona a esta molécula uma energia mais baixa de

ligação em relação ao APB-02 que possui o mesmo tipo para a SER87 (3,25 Å) e ARG198 (3,27 e 2,90 Å) e ao APB-03 com o ARG248 (2,78 Å) e ASN112 (2,92 Å).

Ao comparar o APB-02 com o APB-03, é perceptível uma maior quantidade de resíduos interagindo com este último, entretanto o de substituinte 4-Cl possui um ΔG levemente mais favorável (diferença de 0,13 Kcal.mol⁻¹). Isto pode ser explicado através da conformação que cada uma destas moléculas adquire quando realizado o *docking* molecular, como pode ser observado na Figura 29 o APB-02 está organizado de forma linear com os dois anéis aromáticos em direções extremamente opostas.

Figura 29: Interações das moléculas APB-01, APB-02 e APB-03.

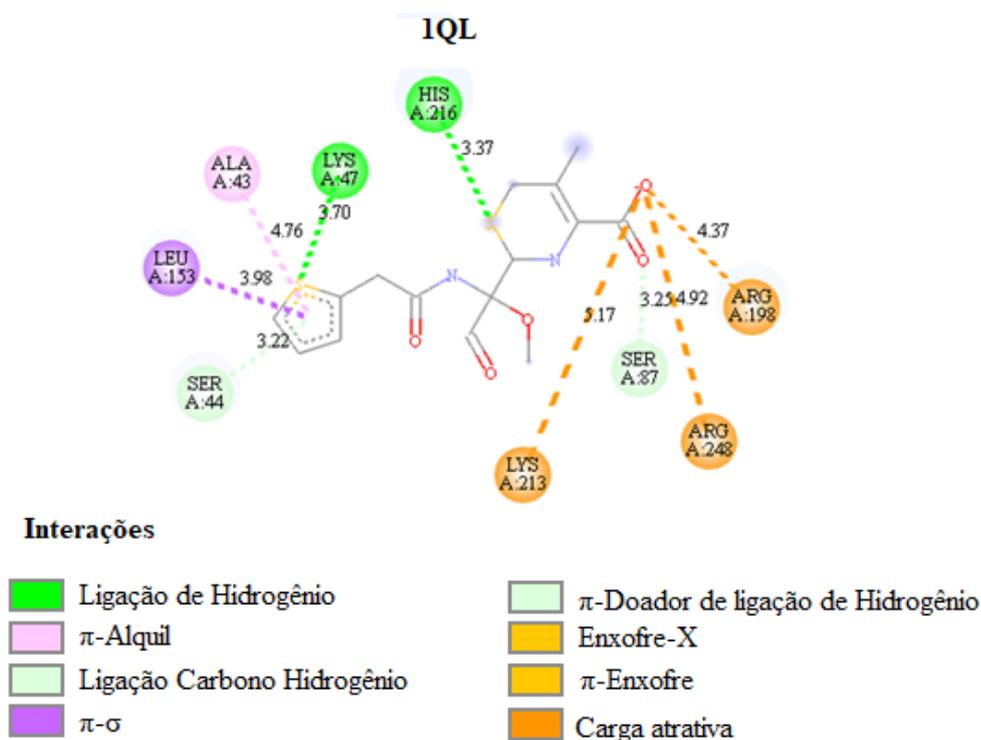


Fonte: Autoria (2020).

As interações para o ligante co-cristalizado 1QL (Figura 29) são semelhantes as encontradas para os compostos bem como compartilham os principais resíduos como a SER44, SER87, ARG248, ARG198, HIS216, LYS47, ALA43 e LEU153 apenas a LYS213 não

interagiu com as moléculas candidatas. Apesar de possuir uma boa quantidade de interações estas são mais distantes em comparação com as já analisadas, variando de 3,22 a 5,17 Å, o que implica em uma menor efetividade para a força de atração.

Figura 30: Interação do 1QL com a macromolécula 3MZE.



Fonte: Autoria (2020).

5.2.4 Docking molecular da interação com a macromolécula 3MTE

A macromolécula encontrada sob o código 3MTE no *Protein Data Bank* se trata da metiltransferase 16S rRNA. Os antibióticos aminoglicosídeos podem tratar de infecções graves causadas por bactérias Gram negativas e positivas quando administrado em conjunto com as β -lactamases (WANGKHEIMAYUM et al., 2017). Boa parte destes antibióticos são direcionados para ligar-se à decodificação do local aminoacil-tRNA do 16S rRNA, como consequência interferem no crescimento microbiano através do bloqueio da síntese de proteínas (VINAL; CONN, 2017). Assim, a análise de *docking* molecular frente a esta proteína direciona os compostos para a inibição da síntese proteica.

Na Tabela 8 encontram-se os resultados de energia livre de ligação e constante de inibição estimada para as interações das estruturas propostas com a metiltransferase 16S rRNA de código 3MTE no PDB.

Tabela 8: *Docking* molecular para as estruturas propostas e a metiltransferase 16S rRNA representada pelo código 3MTE, os melhores resultados estão destacados em negrito.

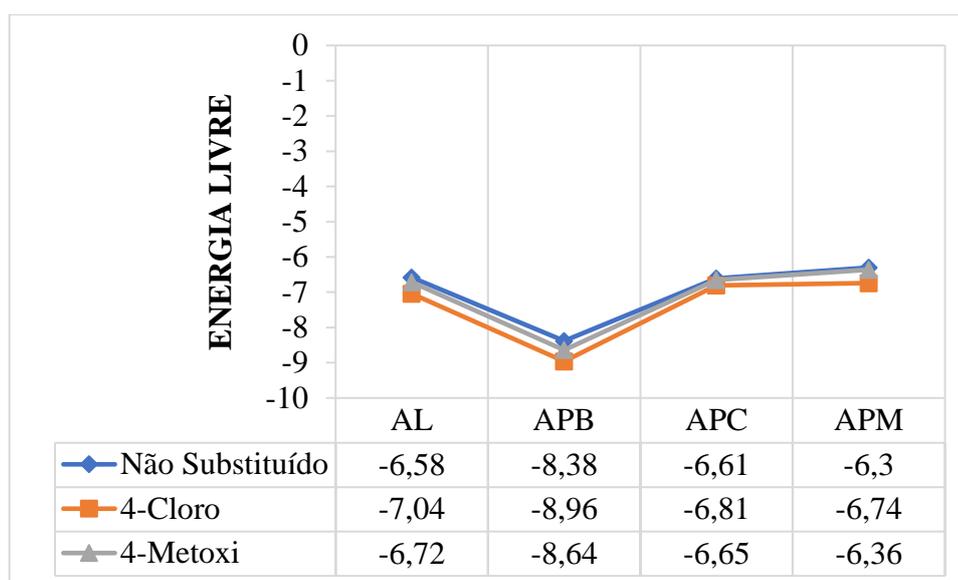
Código	Energia Livre de Ligação (ΔG) (Kcal.mol⁻¹)	Constante de Inibição Estimada (Ki) (nM)
AL-01	-6,58	15,05
AL-02	-7,04	6,88
AL-15	-6,72	11,82
APB-01	-8,38	725,55
APB-02	-8,96	270,19
APB-03	-8,64	464,53
APC-01	-6,61	14,17
APM-01	-6,30	24,1
APM-02	-6,74	11,56
APM-03	-6,36	21,77
EE-03	-6,81	10,26
EE-06	-6,65	13,39
SAM	-6,17	29,99

Fonte: Aatoria (2020).

A partir dos resultados expostos, observou-se um ΔG de -6,17 Kcal.mol⁻¹ para o ligante co-cristalizado (SAM) e Ki de 29,99 nM, sendo esta energeticamente desfavorável quando comparado a quaisquer das moléculas aqui estudadas. A série APB aparece novamente como a de energia mais promissora, entretanto possui Ki bastante elevado quando comparado com os demais. Isso indica que apesar de encaixar-se com facilidade no sítio ativo, os APBs não se manteriam alocados na proteína com eficiência, ou seja, uma concentração baixa destas se manteriam complexadas. É válido ressaltar que no *docking* molecular as estruturas são inseridas como uma peça de quebra-cabeças sem que haja uma reação, portanto não é considerada a formação de ligação covalente para este caso.

A energia livre de ligação para cada uma das séries pode ser comparada, onde, no Gráfico 5 os ΔG (Kcal.mol⁻¹) estão dispostos. Apesar dos substituintes 4-Cl se sobressaírem para cada uma das séries igualmente aos resultados dos alvos anteriores, a diferença de energia parece influenciar pouco mais acentuadamente, chegando a 0,58 Kcal.mol⁻¹ do APB-01 para o APB-02. As energias dos não substituídos e 4-OCH₃ não se distanciam entre si de modo que a menor diferença chega a ser de 0,04 Kcal.mol⁻¹ entre o APC-01 e EE-06.

Gráfico 5: Comparação da energia livre de ligação para os compostos docados.



Fonte: Aatoria (2020).

O Quadro 5 indica os resíduos de aminoácidos do 3MTE que interagem com as moléculas estudadas, sendo o tipo dado em esquema de cores e a distância indicada em Å. Os aspectos gerais apontam para uma maior diversidade e mais de uma interação para alguns dos resíduos, como o TRP107, LEU110, PRO56, ASP55 e ASP30. A presença de duas ou mais interações intermoleculares promove uma diminuição energética quando atrativas e um aumento para as desfavoráveis.

Quadro 5: Interação dos compostos com os resíduos de aminoácido presente na macromolécula de código 3MTE e suas devidas interações. A distância indicada em Å.

	TRP 107	SER 195	PRO 106	LEU 110	THR 33	TRP 197	LEU 104	PHE 105	GLY 32	ALA 87	ALA 86	PRO 56	ASP 55	ASP 30	ASN 38	GLU 88
AL-01	3,00															
AL-02	4,59/ 4,55	2,62	5,45	4,09												
AL-15	4,80	2,52	5,24		3,60	3,47										
APB-01	2,84			3,64			2,98	5,76	3,27	5,06	5,40	4,24				
APB-02	4,54/ 2,93			3,71		4,55				4,55	5,05	4,26				
APB-03	2,84			3,63						4,72	5,21	4,33	3,79			
APC-01	5,88	3,10						1,99						2,20	2,55	
APM-01	3,14							5,71								
APM-02	4,56/ 4,46	2,77	5,34	4,13												
APM-03	3,13/ 4,79	2,87	3,79			3,43		3,95								
EE-03	2,17/ 1,89/ 4,36					4,44										
EE-06	2,38/ 1,80/ 4,81															
SAM	2,95/ 4,48			3,75/ 4,07			2,88	2,93		3,37		4,26/ 5,02	5,24/ 3,68	3,40/ 2,86	2,60	3,06

Legenda:

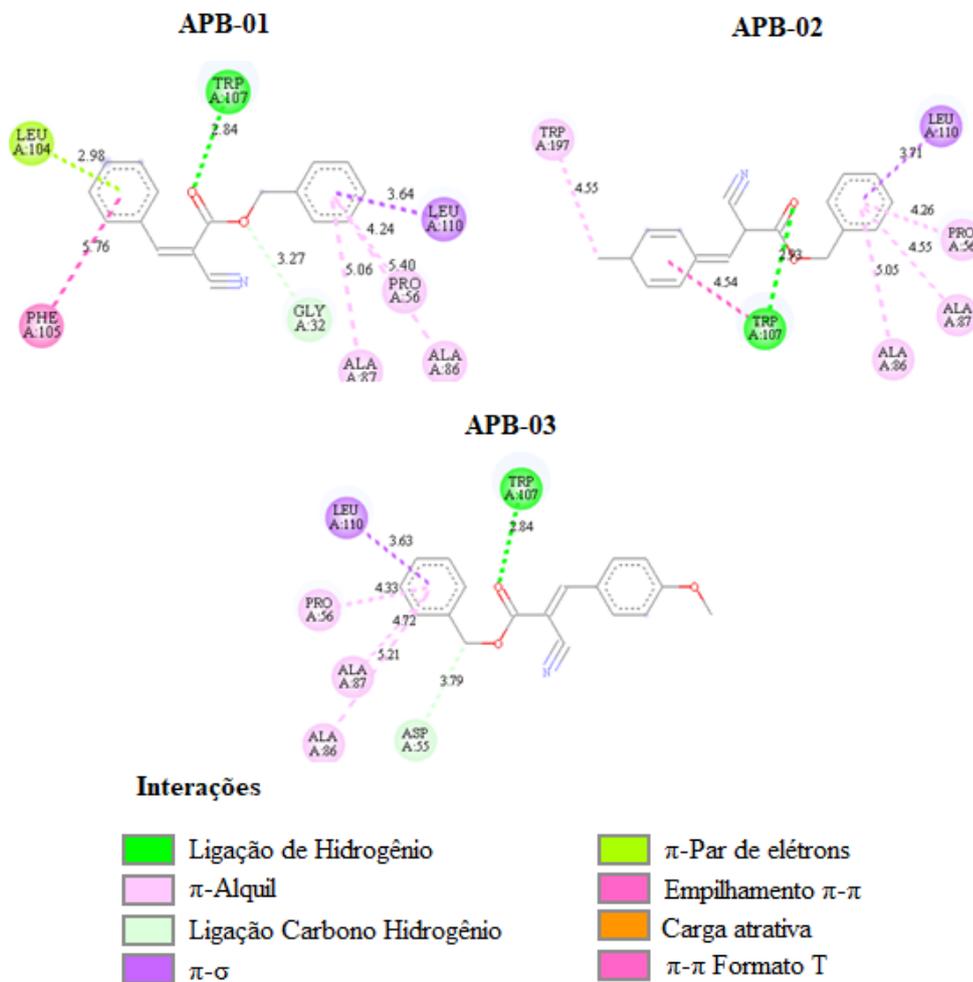
	Ligação de hidrogênio
	Ligação carbono hidrogênio
	Carga atrativa
	Pi-alquil
	Alquil
	Empilhamento Pi-Pi
	Pi-sigma
	Pi-Pi Formato T
	Pi-par de elétrons
	Desfavorável doador-doador

Fonte: Autoria (2020).

Os APBs demonstraram uma maior quantidade de resíduos interagindo com os mesmos, além disso o APB-02 apresenta mais de um tipo para o TRP107 sendo estes alquil e π - π formato T. Observava-se também para esta série uma predominância das interações hidrofóbicas,

principalmente a do tipo π -alquil seguida da π - σ , ligação carbono-hidrogênio e empilhamento π - π . As interações das moléculas APB podem ser visualizadas na Figura 31.

Figura 31: Interações das moléculas APB-01, APB-02 e APB-03.



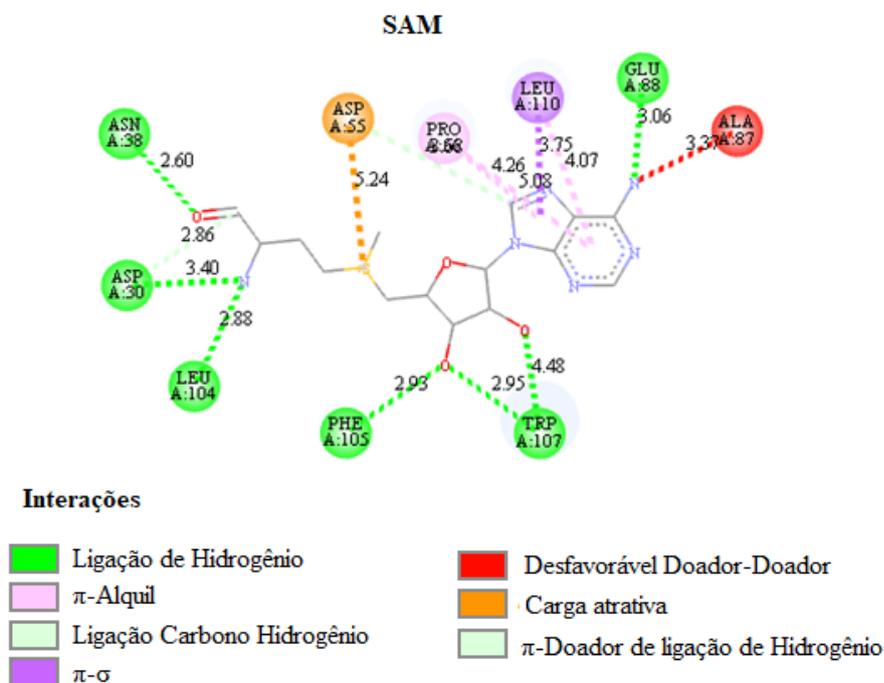
Fonte: Autoria (2020).

É notório que o anel aromático presente apenas nas estruturas dos APBs possui uma afinidade pelo sítio de ligação, pois são observados mais resíduos de aminoácido nesta região favorecendo as regiões hidrofóbicas. Em comum, além do anel aromático, o oxigênio da carbonila interage por ligação de hidrogênio com o TRP107 em uma curta distância, isto promove uma energia mais baixa visto que este tipo é uma das mais fortes interações intermoleculares. O 4-Cl do APB-02 apresenta interação com o resíduo TRP197 o que o diferencia dos demais da mesma série que o substituinte não influencia diretamente, esse fato pode ter gerado seu ΔG diminuto.

Na Figura 32 pode ser visto o ligante co-cristalizado (SAM) com suas interações e distância dada em Å. É possível observar mais de uma interação com um resíduo do 3MTE

como o LEU110, PRO56, ASP55 e ASP30 que interagem por π - σ , π -alquil, ligação de hidrogênio e carga atrativa o que geraria uma menor energia, entretanto tem-se uma interação desfavorável doador-doador relativamente próxima que dificulta a aproximação alvo-molécula.

Figura 32: Interação do SAM com a macromolécula 3MTE.



Fonte: Autoria (2020).

As estruturas planejadas apresentaram satisfatórios resultados para a energia livre de ligação e constante de inibição para o *docking* molecular, a diferença energética entre os grupos metilenos reativos mostrou um favorecimento do grupo benzilox (APBs) em relação aos demais na ordem crescente de energia os grupos amida (APCs), éster (ALs) e nitrila (APMs) havendo uma inversão da ordem amida-éster para o 16S rRNA.

Ao comparar os alvos de resistência avaliados os compostos apresentaram melhores resultados para as oxacilinas (4Y0U) e em relação a atividade antibacteriana foram mais promissores para a PBP (3MZE) quando considerada a constante de inibição, entretanto indicou uma boa energia de interação com o 16S rRNA (3MTE). De modo geral, as moléculas planejadas apresentaram bons resultados para a inibição das β -lactamases e para o efeito antibacteriano analisados. Com a obtenção de resultados favoráveis a síntese destas pode ser realizada a fim de comprovar sua eficácia para estes parâmetros.

5.3 Síntese e caracterização físico-química

Visto que os resultados para o estudo de *docking* molecular apresentaram boas correlações de energia dos compostos com os alvos quando comparada ao ligante co-cristalizado a síntese dos doze puderam ser efetuadas.

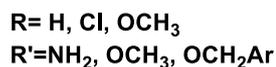
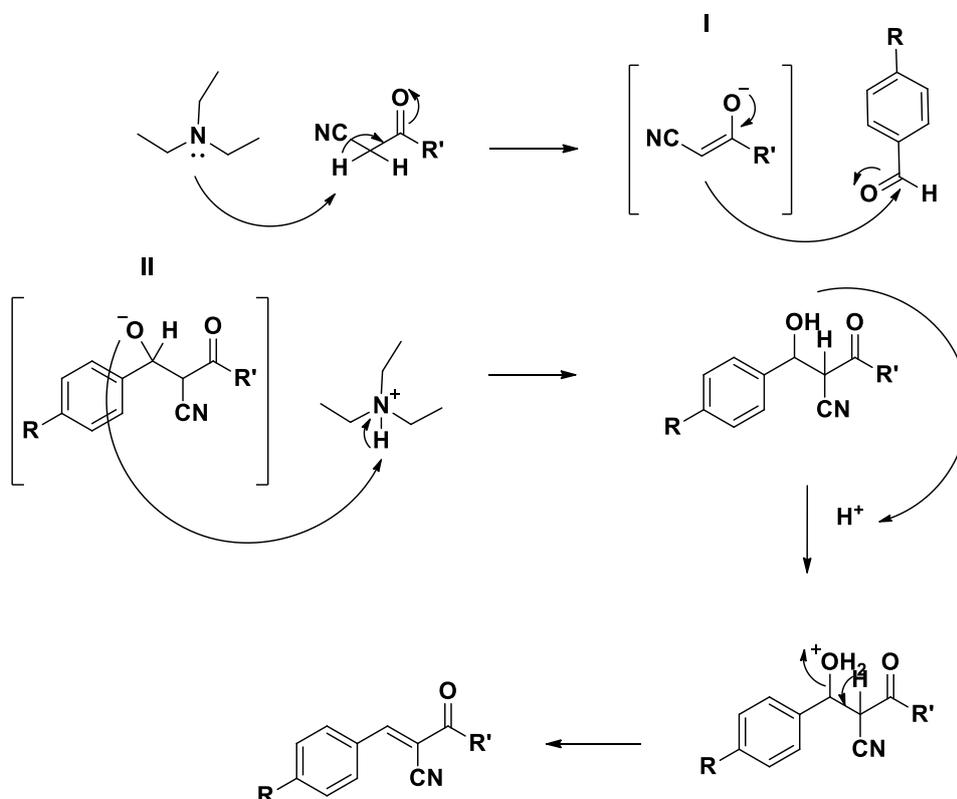
5.3.1 Mecanismo reacional

O mecanismo reacional proposto para os compostos apresentados neste estudo segue uma reação de condensação do tipo Knoevenagel, no qual uma reação envolvendo um composto carbonílico e um contendo grupamento metileno ativo interagem formando um novo composto que apresenta uma ligação dupla carbono-carbono. Conforme ilustrado pelo Esquema 4 este tipo de reação ocorre em meio básico, neste caso utilizou-se trietilamina. O esquema reacional para a síntese com o catalisador morfolina se encontra no Apêndice. Este tipo de reação é comumente empregado na síntese orgânica pois produz geralmente bons rendimentos (RUPAINWAR et al., 2019).

A trietilamina na primeira etapa da reação abstrai um próton ácido do centro metilênico que há no cianoacetil, formando a espécie nucleofílica I. Na segunda etapa reacional o enolato formado ataca o carbono ligado ao oxigênio do benzaldeído monosubstituído, implicando na formação do intermediário II que após a abstração do próton realizada pela hidroxila que em seguida abstrai mais um próton do meio, abandonando a estrutura na forma de água. Este processo leva a oxidação do carbono, formando uma ligação dupla.

Na etapa final, com a trietilamina de volta ao seu estado inicial, seus pares de elétron atacam o próton ligado ao mesmo carbono que o grupo ciano formando a seguir uma ligação dupla, eliminando água para formar o carbono vinílico.

Esquema 4: Mecanismo reacional proposto para os compostos sintetizados.



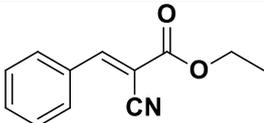
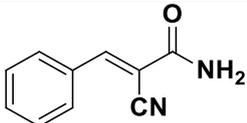
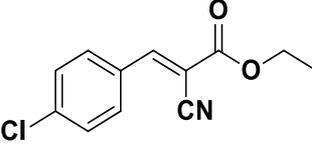
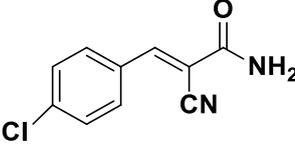
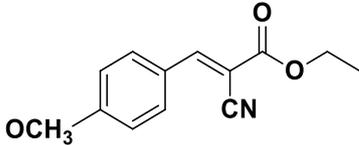
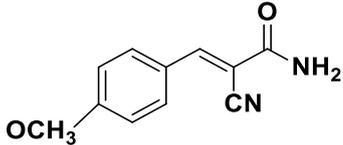
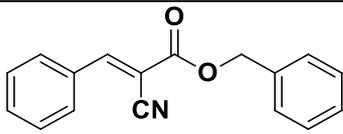
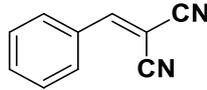
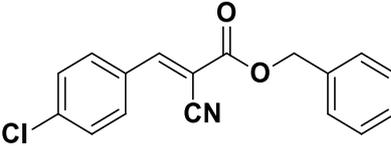
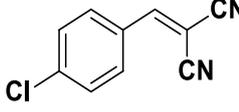
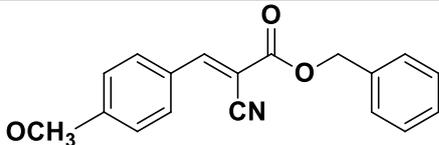
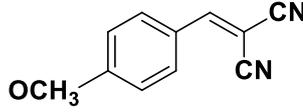
Fonte: Aatoria (2020).

Processos como estes são catalisados por intermédio de bases sólidas como as oriundas de metais alcalinos ou bases fracas como as aminas primárias, secundárias e terciárias sob condições homogêneas tendo ainda a limitação de não recuperação do catalisador. Estudos recentes têm mostrado que catálises com ácidos de Lewis, suportes sólidos amina-funcionalizados, catalizadores organometálicos, líquidos iônicos, cátions de zeólitos são possíveis para este fim (RAMBABU et al., 2017). Nesta condensação forma-se um ligação carbono-carbono e concomitantemente uma dupla ligação, como resultado perde-se uma molécula de água no processo. A condensação de Knoevenagel geralmente leva bastante tempo para que ocorra em solventes orgânicos quando aquecida e sob condições especiais, por este motivo a não utilização de solventes seria a melhor forma de se trabalhar com este tipo de reação, podendo fazer uso da água para esta finalidade, porém a desidratação é um processo

fundamental para a eficiência deste método e a adição de água em excesso desloca o equilíbrio em favor dos compostos hidratados, retardando a reação (XU et al., 2017).

Este tipo de reação é de suma importância para a química orgânica que é utilizada com frequência para a produção de compostos heterocíclicos de significado biológico, além disso pode servir de modelo para avaliar a atividade catalítica de novos catalisadores básicos sólidos (SAKTHIVEL; DHAKSHINAMOORTHY, 2017). De forma a facilitar a visualização dos compostos sintetizados por meio da condensação de Knoevenagel, o Quadro 6 os apresenta bem como os códigos de suas respectivas estruturas.

Quadro 6: Estrutura e código dos compostos sintetizados.

Código	Estrutura	Código	Estrutura
AL-01		APC-01	
AL-02		EE-03	
AL-15		EE-06	
APB-01		APM-01	
APB-02		APM-02	
APB-03		APM-03	

Fonte: Autoria (2020).

5.3.2 Características físico-químicas

Ao final da síntese de cada uma das moléculas foram realizados os cálculos de rendimento, fator de retenção, faixa de fusão, e a coloração determinadas visualmente. Para as propriedades físico-químicas como o coeficiente de partição (Log P) e peso molecular a ferramenta ChemDraw Ultra® foi utilizada. Na Tabela 9 estas propriedades podem ser observadas.

De maneira geral a síntese ocorreu eficientemente, pois seus rendimentos variaram de 33,06 a 100 %, sendo sua maioria acima dos 90%. Para que se pretenda utilizar destes compostos deve-se levar em consideração alguns fatores explicitados pela regra de Lipinski.

O coeficiente de partição (Log P) que para as moléculas estudadas variaram de 1,05 a 3,7, prediz a capacidade da molécula distribuir-se nos diferentes compartimentos fisiológicos, com uma boa biodisponibilidade *in vivo*, que é de fato necessária para que uma droga possa agir. Este intervalo de Log P encontrado é compreendido na Regra de Lipinski ($\text{Log P} \leq 5$), sendo capaz de solubilizar parcialmente em água e atravessar membranas biológicas (MIKOVISKI et al., 2019).

Outra característica desta regra que permite uma melhor atividade farmacológica seria um peso molecular inferior a 500 g.mol^{-1} , neste quesito todas as moléculas se apresentaram promissoras, visto que as de menor peso molecular geralmente possuem uma capacidade inibitória enzimática mais efetiva por esta ter uma facilidade de contato com os sítios ativos (DOLABELA et al., 2018).

O fator de retenção (Rf) variaram de 0,37 a 0,83, como os compostos apresentam diferentes lipofilias para que fosse possível observar um Rf mais centralizado, utilizou-se de diferentes proporções de Hexano e Acetato de Etila e até mesmo do solvente puro (Hexano) como eluente para determinar cada uma delas. As proporções pertinentes a este ensaio foram 9:1, 7:3, 6:4 (Hexano/Acetato de Etila) e Hexano puro.

As propriedades organolépticas como a cor tem grande importância, pois do ponto de vista da reprodutibilidade do experimento que igualmente ao fator de retenção influenciaria para o caso de não ter um composto padrão para a análise em CCD.

A faixa de fusão permite identificar uma possível pureza dos compostos sintetizados, para as moléculas estudadas houve uma variação (temperatura final reduzida da inicial) de 1 a 3 °C, sendo considerada uma diferença que indica uma pureza plausível.

Tabela 9: Propriedades físico-químicas dos compostos.

Código	Rendi. (%)	Log P	F. R.	P.M. (g/mol)	F. M.	F.F. (°C)	Cor
AL-01	75,77	2,43	0,80 ^b	201,08	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	52~53	Bege
AL-02	100	2,99	0,83 ^b	235,04	C ₁₂ H ₁₀ ClNO ₂	80~82	Amarelo
AL-15	71,63	2,30	0,40 ^b	231,09	C ₁₃ H ₁₃ NO ₃	101~103	Alaranjado
APB-01	76,85	3,82	0,37 ^a	263,09	C ₁₇ H ₁₃ NO ₂	79-80	Branco
APB-02	99,94	4,38	0,42 ^a	297,06	C ₁₇ H ₁₂ ClNO ₂	148~149	Branco
APB-03	88,95	3,7	0,42 ^d	293,11	C ₁₈ H ₁₅ NO ₃	81~82	Amarelo Claro
APC-01	33,06	1,18	0,65 ^c	172,06	C ₁₀ H ₈ N ₂ O	119-120	Pérola
APM-01	50,64	2,3	0,56 ^a	154,05	C ₁₀ H ₆ N ₂	84-85	Amarelo
APM-02	71,58	2,86	0,62 ^a	188,01	C ₁₀ H ₅ ClN ₂	154~156	Creme
APM-03	91,56	2,18	0,57 ^b	184,06	C ₁₁ H ₈ N ₂ O	124~125	Amarelo claro
EE-03	60,50	1,66	0,92 ^c	206,02	C ₁₀ H ₇ ClN ₂ O	183~184	Bege
EE-06	78,50	1,05	0,65 ^c	202,07	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₂	226~229	Marrom

Legenda: Rendi – Rendimento; F. R. – Fator de Retenção; P. M. – Peso Molecular; F.M. – Fórmula Molecular; F.F. – Faixa de Fusão; Log P – Coeficiente de Partição; a - sistema 9:1 Hexano/Acetato de Etila; b - sistema 7:3 Hexano/Acetato de Etila; c - sistema 6:4 Hexano/Acetato de Etila e d - sistema Hexano.

Fonte: Aatoria (2020).

Os compostos sintetizados puderam ser submetidos a testes de solubilidade aparente sendo seus resultados observáveis no Quadro 7 a fim de encontrar os melhores solventes para

evitar problemas relacionados a entupimento dos capilares de equipamentos para caracterização. Analisou-se a solubilidade em diferentes solventes, comumente utilizados em síntese e ensaios espectroscópicos. Visto que os compostos foram precipitados em meio aquoso não houve a necessidade de testá-las para água.

Quadro 7: Solubilidade dos compostos sintetizados.

Código	Acetato de Etila	Acetonitrila	Clorofórmio	DMSO	Metanol
AL-01	S	S	S	S	I
AL-02	S	S	S	S	I
AL-15	S	S	S	S	I
APB-01	S	S	S	S	I
APB-02	S	S	S	S	I
APB-03	S	S	S	S	I
APC-01	S	S	S	S	I
APM-01	S	S	S	S	I
APM-02	S	S	S	S	I
APM-03	S	S	S	S	I
EE-03	S	S	I	S	I
EE-06	S	S	I	S	I

Legenda: S – Solúvel; PS – Parcialmente Solúvel; I – Insolúvel; DMSO – Dimetilsulfóxido.

Fonte: Autoria (2020).

5.4 Caracterização estrutural

5.4.1 Ressonância Magnética Nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é um método largamente escolhido para a caracterização estrutural de compostos orgânicos, isto se deve à sua precisão e alta resolução de campos magnéticos altos (maiores que 0,1 T) (GRISI et al., 2019).

Tratando-se de uma técnica espectroscópica de absorção, o espectro de RMN se forma ao incidir radiação eletromagnética à uma amostra, a absorvendo na região de radiofrequência em uma frequência característica da estrutura do composto em função de determinados núcleos da molécula, enfatizando os de hidrogênio e carbono (LIU et al., 2019).

5.4.1.1 RMN 1H

O RMN 1H forneceu importantes informações relativas ao perfil químico dos hidrogênios presentes nos compostos sintetizados e caracterizados, permitindo a elucidação estrutural das moléculas pela identificação dos seus deslocamentos químicos.

Devido a pandemia do COVID-19, apenas as estruturas de cinco dos doze compostos sintetizados puderam ser elucidadas através dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H) e Carbono 13 (RMN ^{13}C). Os valores pertinentes ao deslocamento químico (δ) (ppm) e constantes de acoplamento (J) dos espectros de RMN 1H podem ser encontrados na Tabela 10 em que a Figura 33 indica a numeração dos hidrogênios, nesta foram verificados os valores característicos para os grupos esperados. Os espectros obtidos com os dados tabelados e estrutura para os compostos estão explicitados nos apêndices com seus principais picos destacados.

Figura 33: Numeração dos hidrogênios para as estruturas.

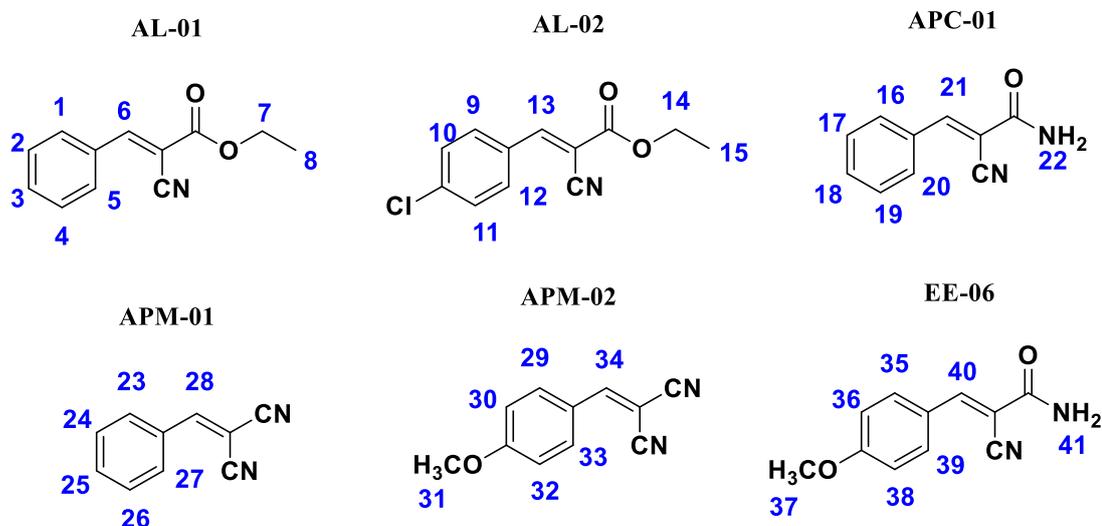


Tabela 10: Resultado da análise por RMN de ^1H dos compostos sintetizados, utilizando como solvente o DMSO deuterado.

Código	^1H	Deslocamento químico (δ) (ppm)
AL-01	1	8,06 (d, J=7,6 Hz, 2H)
	2	7,60 (t, J=7,9 Hz, 2H)
	3	7,65 (t, J=7,9 Hz, 1H)
	4	7,60 (t, J=7,9 Hz, 2H)
	5	8,06 (d, J=7,6 Hz, 2H)
	6	8,41 (s, 1H)
	7	4,33 (q, J=7,1, 2H)
	8	1,31 (t, J=7,1 Hz, 3H)
AL-02	9	8,07 (d, J=8,4 Hz, 2H)
	10	7,68 (d, J=8,5 Hz, 2H)
	11	7,68 (d, J=8,5 Hz, 2H)
	12	8,07 (d, J=8,4 Hz, 2H)
	13	8,41 (s, 1H)
	14	4,32 (q, J=7,1 Hz, 2H)
	15	1,31 (t, J=7,1 Hz, 3H)
APC-01	16	7,94 (d, J=5,8 Hz, 2H)
	17	7,58 (m, 3H)
	18	7,58 (m, 3H)
	19	7,58 (m, 3H)
	20	7,94 (d, J=5,8 Hz, 2H)
	21	8,19 (s, 1H)
	22	7,80 (s, 2H)
APM-01	23	7,96 (d, J=7,2 Hz, 2H)
	24	7,63 (t, J=7,7 Hz, 2H)
	25	7,70 (t, J=7,5 Hz, 1H)
	26	7,63 (t, J=7,7 Hz, 2H)
	27	7,96 (d, J=7,2 Hz, 2H)
	28	8,56 (s, 1H)

Continua

	29	7,97 (d, J=8,7 Hz, 2H)
	30	7,18 (d, J=9,0 Hz, 2H)
	31	3,89 (s, 3H)
APM-02	32	7,18 (d, J=9,0 Hz, 2H)
	33	7,97 (d, J=8,7 Hz, 2H)
	34	8,38 (s, 1H)
	35	7,96 (d, J=8,1, 2H)
	36	7,13 (d, J=8,9 Hz, 2H)
	37	3,85 (s, 3H)
EE-06	38	7,13 (d, J=8,9 Hz, 2H)
	39	7,96 (d, J=8,1, 2H)
	40	8,12 (s, 1H)
	41	7,81 (s, 1H); 7,69 (s, 1H)

Legenda: s – simpletos, d – duplete, t – tripleto, q – quarteto, m – multipleteo.

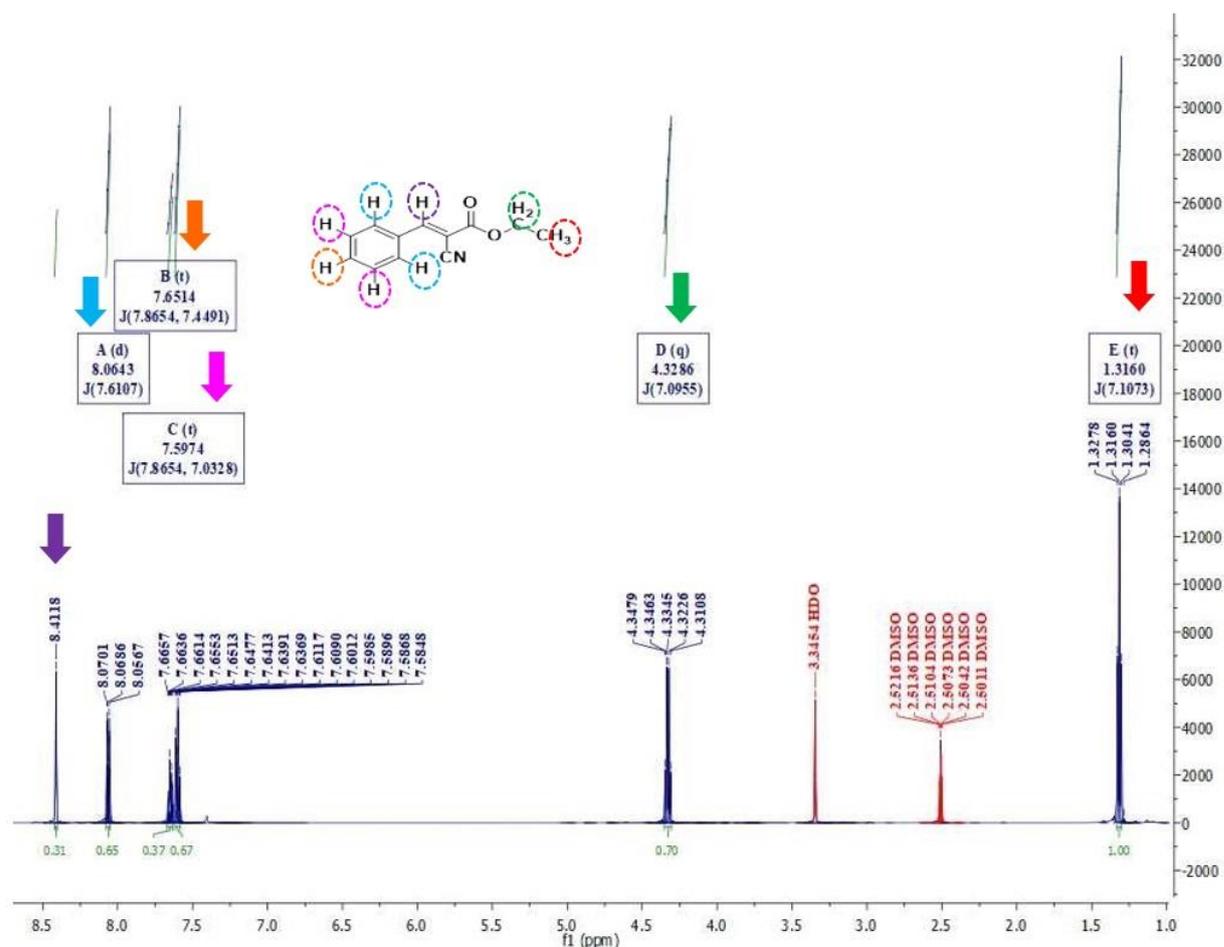
Fonte: Aatoria (2020).

Nos espectros de RMN ^1H , foram observados simpletos referentes aos hidrogênios diretamente ligados ao carbono vinílico característico da reação de condensação para as moléculas caracterizadas onde os deslocamentos químicos variaram de 8,11 a 8,55 ppm. Estes sinais diagnósticos estão fora da faixa característica (que seria de 4,6 e 5,9 ppm), se deu pelo efeito anisotrópico. Com o aparecimento destes picos pode-se inferir que os compostos são oriundos da reação de condensação de Knoevenagel como o esperado. Para a série APC puderam ser observados picos de NH_2 da função amida presente entre 7,68 e 7,81 ppm, que no caso do EE-06 apresentaram-se como dois singletos distintos devido aos seus rotâmeros, em APC-01 estes aparecerem normalmente como um único singleto para 2H.

Os hidrogênios ligados diretamente ao carbono secundário (CH_2) como na série AL-01 apresentaram-se normalmente como um quarteto, indicando o acoplamento com três hidrogênios em ambiente químicos diferentes. Para os ligados a carbono primário (CH_3) como na função éster dos AL presente em cada uma das séries do estudo apresentaram-se como tripletos mais protegidos em δ que variaram de 1,30 a 1,32 ppm com J variando de 7,10 a 7,12 Hz já para os compostos metoxilados, observou-se a presença de singletos para os três hidrogênios que o δ variou de 3,85 a 3,88.

Na Figura 34 apresenta-se o espectro que contribui para a elucidação estrutural da molécula AL-01, aplicada como base para as demais estruturas de sua série, visto que as mudanças são substituições no aromático as quais demonstram apenas a presença de dois dupletos presentes no espectro em detrimento dos dois tripletos e um dubleto dos compostos não substituídos.

Figura 34: RMN ^1H para o composto AL-01



Fonte: Aatoria (2020).

Pode-se esperar que para hidrogênios vinílicos o deslocamento químico ocorra entre 8,0 e 8,6 ppm para todas as séries, sendo o deslocamento químico para o caso do AL-01 de 8,41 ppm. Os hidrogênios presentes no anel aromático possuem constante de acoplamento (J) próxima de 8 como o esperado para os acoplamentos do tipo *orto*, sendo apresentados dois tripletos que representam os hidrogênios das posições *para* e *meta* em 7,65 (t, J=7,86 Hz, 1H) e 7,60 ppm (t, J=7,86 Hz, 2H) que acoplam entre si e este último com o em *orto* (dupleto) (BONNOT et al., 2018).

5.4.1.2 RMN ^{13}C

Na continuidade da caracterização por ressonância magnética nuclear, os espectros de RMN ^{13}C de cinco dos compostos sintetizados foram obtidos resultando dos deslocamentos químicos indicados na Tabela 11 e a numeração dada pela Figura 35. A realização das análises por RMN de ^{13}C forneceram importantes informações quanto ao perfil dos átomos de carbono na estrutura, permitindo identificar os principais picos de absorção: carbonos vinílicos, aromáticos, CH_2 , CH_3 e grupo ciano. Os resultados obtidos por meio da espectroscopia confirmam os picos característicos dos espectros de RMN ^1H .

Figura 35: Numeração dos carbonos para as estruturas.

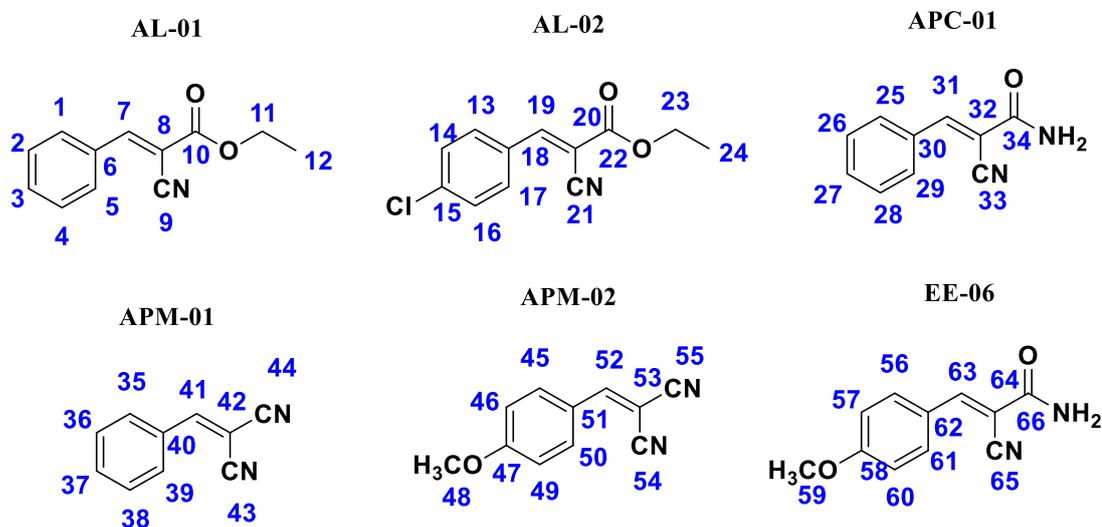


Tabela 11: Resultado da análise por RMN de ^{13}C dos compostos sintetizados.

Código	^{13}C	Deslocamento químico (δ) (ppm)
AL-01	1	133,9
	2	131,8
	3	131,3
	4	131,8
	5	133,9
	6	129,8
	7	155,6
	8	103,1
	9	116,1
	10	162,2

Continua

	11	62,9
	12	14,4
AL-02	13	132,9
	14	130,7
	15	138,5
	16	130,7
	17	132,9
	18	130,7
	19	154,1
	20	103,7
	21	115,9
	22	162,1
	23	62,9
	24	14,4
		25
	26	129,7
	27	132,4
	28	129,7
APC-01	29	130,5
	30	132,8
	31	151,0
	32	107,2
	33	116,9
	34	163,2
		35
	36	130,0
	37	134,8
APM-01	38	130,0
	39	131,0
	40	131,8
	41	162,0
	42	82,1

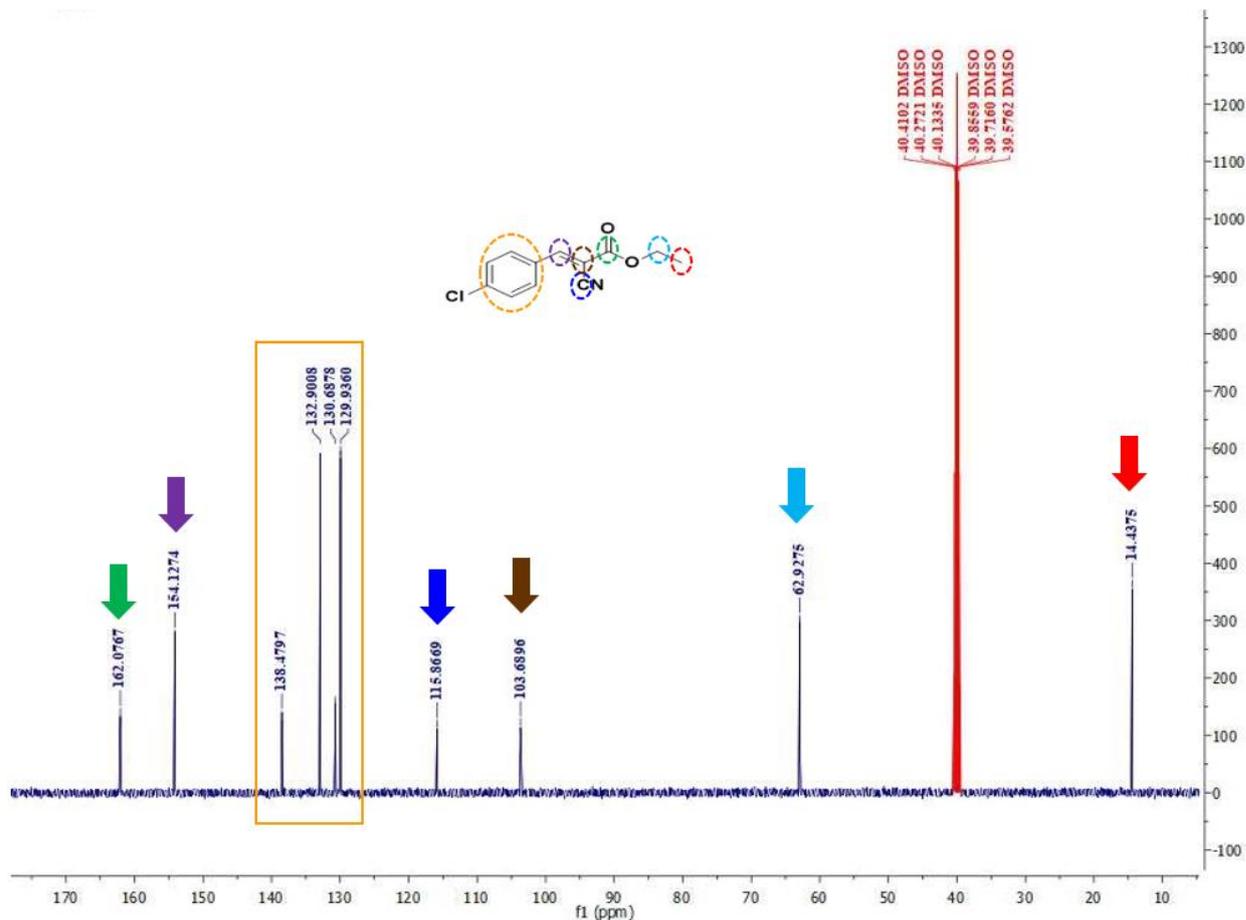
Continua

APM-03	43	114,7	
	44	113,7	
	45	133,8	
	46	115,7	
	47	124,6	
	48	56,4	
	49	115,7	
	50	133,8	
	51	160,9	
	52	164,8	
	53	77,3	
	54	115,3	
	55	114,4	
	EE-06	56	132,9
		57	115,3
58		124,9	
59		56,1	
60		115,3	
61		132,9	
62		163,0	
63		150,6	
64		103,4	
65		117,5	
66		163,6	

Fonte: Aatoria (2020).

A continuidade da caracterização estrutural por RMN será realizada para o AL-02 a qual apresenta picos característicos de carbono aromático de 138,5 a 129,9 ppm corroborando com os valores indicados na literatura que seriam de 110 a 140 ppm (Figura 36). O carbono vinílico presente em todas as estruturas sintetizadas pode ser identificado em 164,1 ppm, os deslocamentos químicos referentes a carbonila (C=O) identificado normalmente em 162,1 ppm. Para o grupo ciano os sinais são observados em 115,9 ppm e o carbono diretamente ligado a ele em 103,7 (MELO et al., 2019).

Figura 36: RMN ^{13}C para o AL-02.



Fonte: Autoria (2020).

O RMN ^{13}C da série APM apresentou deslocamento químico variando de 130,0 a 134,8 ppm e os carbonos insaturados diretamente ligados ao anel aromático tinham δ de 162,0 e 164,8 ppm para o APM-01 e APM-02 respectivamente sendo estes últimos os mais desprotegidos da série. Os espectros da série APM apresentaram picos equiporcionais em deslocamentos químicos bem próximos, 114,7 e 113,4 ppm para o APM-01 e 115,3 e 114,4 ppm para o APM-03. Este fato se deve a ocorrência de uma pequena desproteção relativa a um dos grupos, a rigidez da ligação π acarreta em posições espaciais distintas entre os grupos o que gera esta diferença. O carbono insaturado ligado aos dois grupos nitrila apresentou-se como o de δ mais protegido, sendo este de 82,1 e 77,3 ppm para o não substituído e o com substituinte metoxi na devida ordem.

5.5 Predições farmacocinéticas

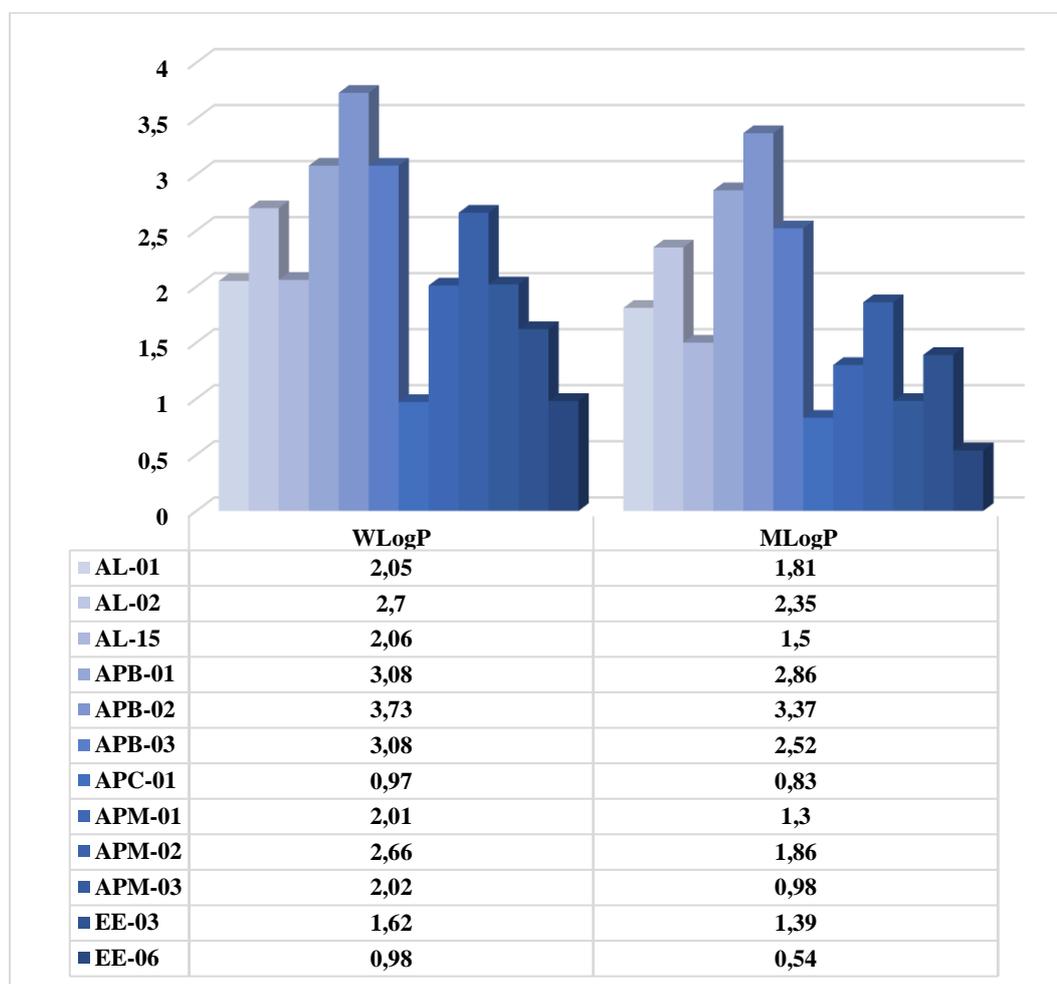
As predições farmacocinéticas *in silico* puderam ser realizadas para todos os compostos sintetizados para prever, de acordo com a associação das propriedades físico-químicas, as prováveis características relativas à absorção, solubilidade em meio aquoso, metabolização e eliminação (ADME). A realização deste teste é de fundamental importância para a discussão e planejamento de novos fármacos, visto que suas propriedades influenciam na facilidade e forma que o composto poderá chegar ao seu alvo, podendo contribuir de forma significativa com o aumento da atividade biológica (TRIPATHI; GHOSH; TALAPATRA, 2019).

As características intrínsecas de cada molécula darão indícios da necessidade de formas farmacêuticas, características de solubilidade em água, perfis de absorção gastrointestinais, capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, possíveis alvos biológicos e relação estrutura-atividade podendo direcionar ou justificar e ensaios biológicos (WANG et al., 2019). Os estudos de ADME permitem selecionar compostos promissores de forma a reduzir falhas relacionadas a fase farmacocinética nas etapas clínicas (YOUSIF; MAHDI; RAAUF, 2019).

Estas predições teóricas se baseiam no *druglikeness*, que consiste na avaliação do índice de fragmentos comuns a fármacos comerciais. O *drug-score* combina uma série de descritores que incluem o próprio *druglikeness*, a lipofilicidade (Log P), solubilidade (Log S), massa molecular e o risco de toxicidade, inferindo na capacidade teórica de um composto ser um candidato a fármaco (RAJAN; RAGI; MURALEEDHARAN, 2019).

5.5.1 Log P, Log S e Log K_p

A técnica mais utilizada para prever os valores para o Log P consiste em utilizar múltiplos preditores de forma a selecionar a metodologia mais precisa para uma determinada série de compostos ou gerando uma estimativa. Apresentado do Gráfico 6, dois métodos que fundamentam as *druglikeness* de Lipinski e Ghose. O M Log P, metodologia de Moriguchi (1994) e utilizada por Lipinski, considera parâmetros como lipofilia, ligações insaturadas, hidrogênios livres, rigidez da estrutura. O W Log P criado por Wildman e Crippen (1999), apresentou um método que acrescentou 68 parâmetros ajustáveis ao cálculo do Log P.

Gráfico 6: Log P dos compostos sintetizados, estudo *in silico*.

Fonte: Autoria (2020).

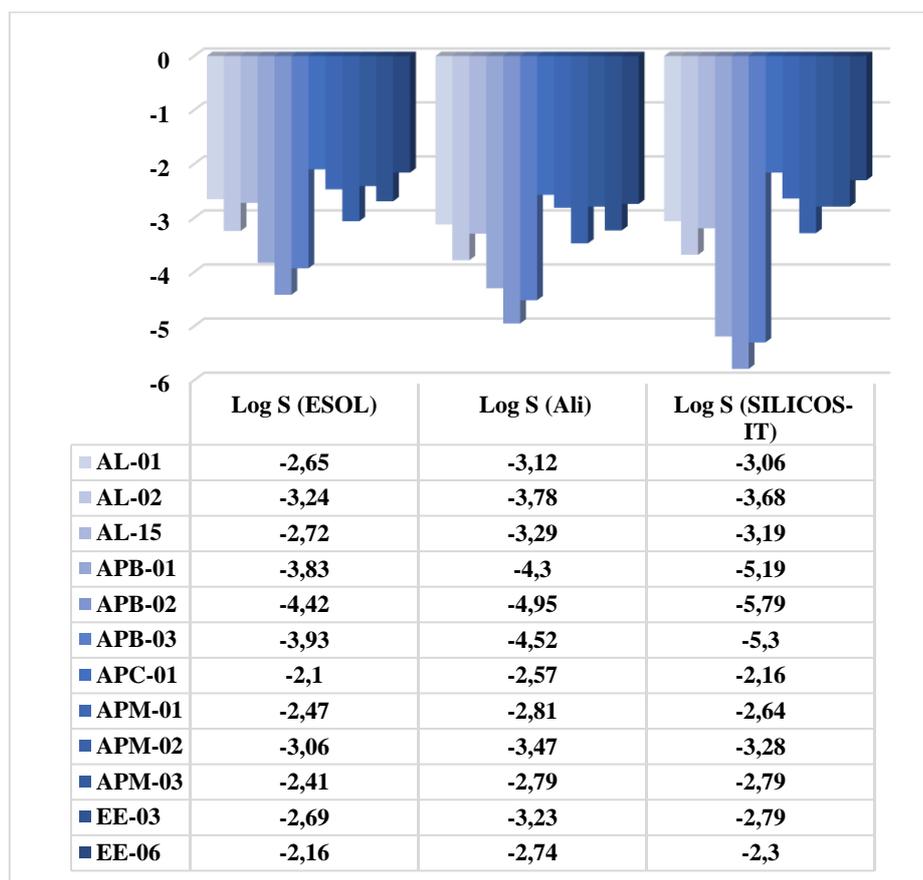
De acordo com os critérios de *druglikeness* estabelecidos por Lipinski, Ghose e Egan para os valores de W Log P (entre -0,4 e 5,6) e de M Log P (menor ou igual a 4,15) dos compostos em estudo situaram-se na faixa desejável. Dentre as moléculas que apresentaram menores valores tanto para W Log P quanto para M Log P estão o APC-01 e EE-06 apresentando os valores 0,97 e 0,98 para o W Log P; 0,83 e 0,54 para M Log P respectivamente. Estes valores decorrem da baixa lipofilicidade dos que possuem em sua estrutura pontos que podem atuar como aceptores ou doadores de ligação de hidrogênio presentes na função amida, favorecendo-se em meio mais hidrofílico em relação as demais.

Dos compostos que apresentaram maior valor tem-se o APB-02 e APB-01 com os valores de 3,73 e 3,08 para W Log P; 3,37 e 2,86 para M Log P respectivamente. Valores mais elevados como estes, que ocorrem para a maior parte dos compostos sintetizados, indicam a existência de um caráter mais lipofílico sendo este de suma importância para a atividade biológica pois

sua absorção no organismo passando a promover sua eficácia. No geral, compostos que apresentaram o substituinte 4-Cloro (AL-02, APB-02, APM-02 e EE-03) apresentaram maiores valores para o Log P, reafirmando o caráter lipofílico deste radical para seus derivados.

O Log S dos compostos puderam ser analisados frente as três metodologias indicadas no Gráfico 7, no método adaptado por Ali et al. (2012) se baseia na Equação Geral de Solubilidade, capaz de prever a solubilidade aquosa (Log S) para grande parte de diversos compostos compreendendo valores de -8,48 a 1,58 (ALI et al., 2012). O método ESOL utiliza da regressão linear ao serem analisados nove propriedades moleculares, dentre elas o Log P e o peso molecular. No terceiro método (SILISCOS-IT) demonstra a correlação entre as duas últimas metodologias como sendo 0,81 para o Ali e 0,69 para o ESOL.

Gráfico 7: Valores de Log S para os compostos estudados.



Fonte: Aatoria (2020).

Similarmente ao Log P, a solubilidade aquosa (Log S) de um medicamento afeta sua biodisponibilidade e conseqüentemente sua absorção. A metodologias teóricas adaptada por Ali et al. (2012), tem sua capacidade averiguada por prever 81% das solubilidades experimentais para 1265 compostos. Um segundo método, o ESOL, que utiliza de técnicas de regressão linear

analisando nove propriedades moleculares, consegue estimar a solubilidade a partir de sua estrutura molecular. O SILICOS-IT desenvolveu um preditor de solubilidade em que a correlação linear para este método fragmentário corrigido pelo peso molecular é $R^2=0,75$, o que demonstra aproximação dos resultados teóricos e experimentais.

A solubilidade expressa em mol.L^{-1} de compostos orgânicos pode ser representada pelo seu logaritmo, se tratando dos fármacos cerca de 85% deles possuem valores de Log S entre -1 e -5 existindo dificilmente valores inferiores a -6. Valores acima de -1 geralmente são associados a moléculas bastante polares como açúcares e pequenos peptídeos e possuem baixa permeabilidade de membrana na ausência de transporte ativo. O intervalo já citado para o Log S da maioria dos fármacos é relacionada com a relação entre a polaridade necessária para razoável solubilidade aquosa e a hidrofobicidade para a permeação das membranas. Os valores de Log S para os compostos variaram de -2,10 a -5,79 indicando que os compostos se encontram na faixa estimada para os fármacos em circulação (AVDEEF; KANSY, 2020).

Pertinente aos estudos de SwissADME outra relevante informação é o coeficiente de permeabilidade sobre a epiderme (Log Kp), os cálculos são baseados no peso molecular e no Log P do composto. A promoção de da permeação dos fármacos através da pele pode melhorar a liberação do fármaco a partir de preparações farmacêuticas transdérmicas; aumento do fluxo através da pele ou a retenção de fármaco nesta; e aumento da liberação localizada, tópica ou dos tecidos alvo através da pele.

As características físico-químicas de um fármaco têm interferência no Log Kp, podendo transformar por meio de modificação molecular um que possua fraca permeabilidade em um pró-fármaco que permeia a pele com facilidade. Os resultados deste parâmetro para as moléculas podem ser observados na Tabela 12, quanto mais negativo o valor do coeficiente menor a permeação do composto na pele (ELIWA et al., 2019). Para os compostos analisados o Log Kp apresentou-se valores entre -6,45 (EE-06) e -5,14 (APB-02) sendo considerados diminutos e, portanto, apresentam teoricamente baixa permeação. Deste modo, estes compostos podem ter efeito para o tratamento de infecções oculares e de uso tópico como por exemplo em feridas de diabéticos.

Tabela 12: Valores de Log Kp.

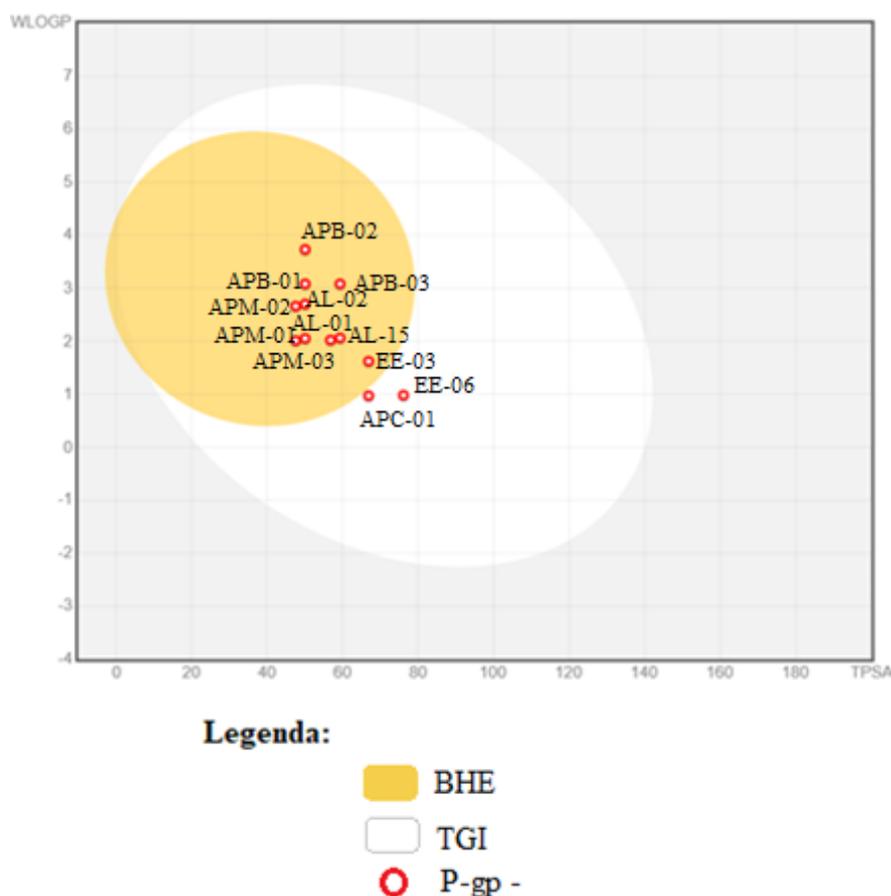
Molécula	Log Kp (cm.s⁻¹)
AL-01	-5,8
AL-02	-5,56
AL-15	-6,01
APB-01	-5,38
APB-02	-5,14
APB-03	-5,54
APC-01	-6,24
APM-01	-5,59
APM-02	-5,46
APM-03	-6,02
EE-03	-6,01
EE-06	-6,45

Fonte: Autoria (2020).

5.5.2 Absorção

No Gráfico 8, destaca-se importantes informações acerca da absorção dos compostos, chamado de *boiled-egg*, este gráfico relaciona o WLog P (coeficiente de partição octanol/água de Wildman e Crippen) com o TPSA (área de superfície polar topológica, indicando a polaridade) sendo direcionado o método de permeação para o cérebro ou intestino (TAHA; RAAUF; ALI, 2019). Este gráfico correlaciona a capacidade de absorção dos compostos sintetizados ao compará-los com fármacos de referência, oferecendo informações relevantes para estudos relativos à forma de administração, podendo também influenciar nos alvos moleculares planejados para o fármaco.

Gráfico 8: Perfil teórico de absorção das moléculas sintetizadas.



Fonte: Autoria (2020).

A área branca do gráfico representa a probabilidade de compostos serem absorvidos pelo trato gastrointestinal (TGI) que favorece uma possível administração por via oral, comumente preferida por pacientes em contraste com a via parenteral. Na área amarela é apresentada como a região onde há a maior probabilidade de a molécula permear a barreira hematoencefálica (BHE), esta barreira atua como um obstáculo físico obstruindo a passagem de fármacos para o encéfalo, incluindo agentes antineoplásicos e antibióticos.

De acordo com os resultados obtido para o *boiled-egg*, apenas o composto APC-01 (mais à esquerda no espaço em branco) e o EE-06 não conseguem atravessar a BHE, representado no gráfico como a área em branco. Esta característica favorece a administração oral, forma comumente preferível por pacientes.

A maior parte dos compostos apresentaram-se na área amarela do gráfico indicando a possibilidade de permearem a barreira hematoencefálica (BHE), responsável por impedir a passagem de vários fármacos como os antibióticos (ATTIA et al., 2019). Esta propriedade dos

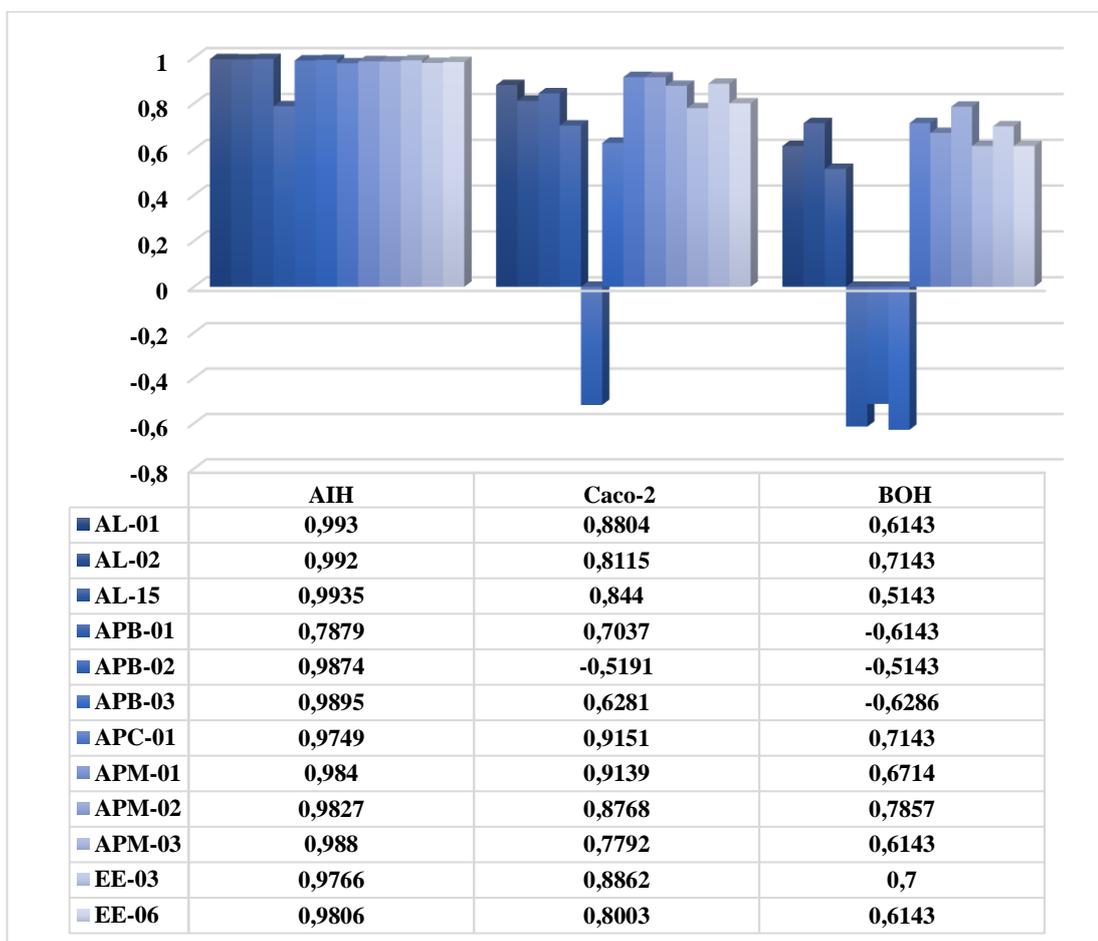
compostos que podem atravessar a BHE, implica na possibilidade de auxiliar no tratamento de doenças nas quais a permeação seja necessária.

No Gráfico 8 também podem ser observados a capacidade dos compostos serem substratos ou não da glicoproteína-P (P-gp), que para todas as moléculas do presente estudo não se mostram como possíveis substratos. A P-gp é responsável por dificultar a permeabilidade às membranas biológicas, protegendo o sistema nervoso central (SNC) de xenobióticos, isso implica que a absorção e atividade dos compostos que não são substrato desta proteína influenciam na farmacocinética das moléculas. Ademais, as P-gp são bombas de efluxo comuns em bactérias de tal modo que este seja um bom indicativo de não excreção das moléculas nas bactérias.

A depender de como um composto passa pela Absorção Intestinal Humana (AIH) pode ocorrer uma variação substancial na farmacocinética do mesmo, o que implica na modificação de seu efeito farmacológico. Em termos de avaliação da permeabilidade da membrana em humanos, as células Caco-2 (adenocarcinoma do cólon humano) são mais amplamente utilizadas visto que possuem excelente capacidade de se diferenciar em monocamadas, geram resistência elétrica transepitelial e expressão de transportadores presentes no epitélio intestinal (ESAKI et al., 2019).

A predição *in silico* da Biodisponibilidade Oral Humana (BOH) é uma importante ferramenta para selecionar um potencial candidato a fármaco, esta característica refere-se à quantidade do fármaco que alcançará a circulação sistêmica para atingir o seu alvo (FALCÓN-CANO et al., 2020). Desta forma, a AIH, Caco-2 e BOH foram preditos *in silico* para os compostos sendo os resultados expressos em termos de percentagem estão alocados no Gráfico 9.

Gráfico 9: Resultados expressos em probabilidade de Absorção Intestinal Humana (AIH), Caco-2 e Biodisponibilidade Oral Humana.



Fonte: Aatoria (2020).

De acordo com os resultados preditos pelo admetSAR a AIH apresentou elevada probabilidade para todos os compostos sendo em sua maioria acima de 0,97 com exceção apenas para o APB-01 que apresentou um AIH de 0,7879.

Para o Caco-2 os valores foram elevados para todos os compostos do presente estudo sendo desfavorável apenas para o APB-02 que obteve valores negativos, indicando que possivelmente não haveria permeabilidade desta molécula com as células Caco-2. O aspecto que tornava esta estrutura com maior área de contato no estudo de *docking* é o mesmo que a torna ruim para esta análise, por se tratar de uma molécula grande e o substituinte cloro conferir a estrutura uma polaridade. Entretanto é válido ressaltar que como visto nos resultados teóricos de Log K_p esta molécula possui baixa permeação epitelial de forma a direcionar a pesquisa para o uso tópico principalmente para o APB-02.

Da Biodisponibilidade Oral Humana (BOH) apenas a série APB apresentou valores negativos para este parâmetro, neste caso, a sua administração via oral não seria indicada pois não entraria na circulação sistêmica. As demais séries possuem um BOH variando de 0,5143 (AL-15) a 0,7857 (APM-02).

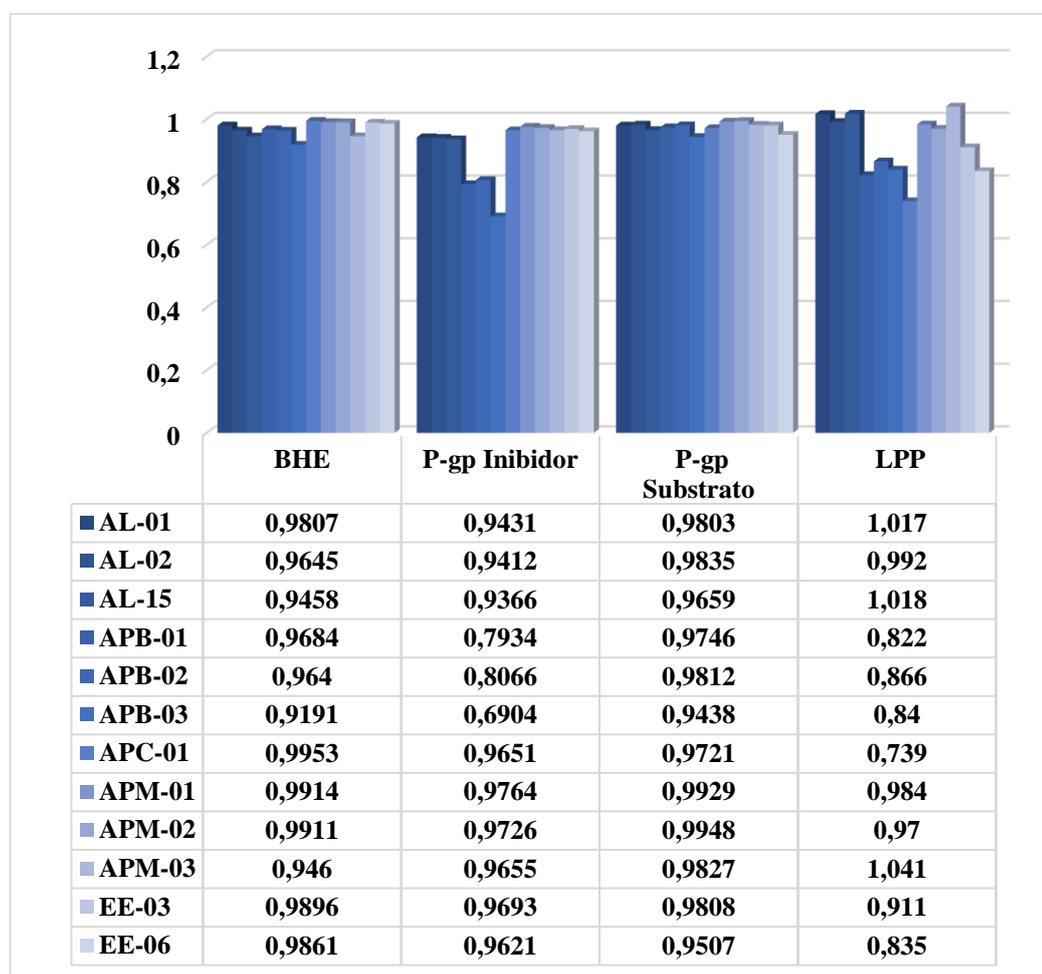
5.5.3 Distribuição

Após a absorção dos fármacos e sendo este entregue à circulação sistêmica, ocorre a distribuição em todos os tecidos corporais, porém de forma desigual a depender da perfusão sanguínea, ligar-se a tecidos, permeabilidade das membranas celulares e características intrínsecas do composto (VAN DEN ANKER et al., 2018).

Ao adentrar na circulação estes fármacos podem ter uma tendência maior ou menor a ligar-se às proteínas plasmáticas variando de acordo com a concentração do fármaco livre, afinidade do fármaco pelos locais de ligação e concentração das proteínas. Quanto maior as chances do composto se ligar às proteínas em questão menor será o percentual que irá fornecer o efeito farmacológico (KLOTZ, 1976).

Os compostos sintetizados foram avaliados frente a Ligação às Proteínas Plasmáticas (LPP), capacidade de transpor a Barreira Hematoencefálica (BHE) e de ser substrato ou inibidor da glicoproteína P (P-gp), representados no Gráfico 10.

Gráfico 10: Distribuição *in silico* dos compostos sintetizados através da barreira hematoencefálica (BHE), P-gp Inibidor, P-gp substrato e Ligação às Proteínas Plasmáticas (LPP).



Fonte: Autoria (2020).

De acordo com os resultados obtidos a partir do admetSAR e expressos em termo de probabilidade no Gráfico 10, as moléculas sintetizadas possuem majoritariamente elevadas chances de ligar-se às proteínas plasmáticas sendo todas acima de 70%, os valores mais elevados foram encontrados para o APM-03, AL-15 e AL-01 e são associados respectivamente à 1,041; 1,018 e 1,017.

Para os valores encontrados acima da unidade, o que ocorre com o AL-15, AL-01 e APM-03, em termos probabilísticos diz-se que o evento (propriedades físico-químicas da molécula relacionadas a atividade) não se encontra no espaço amostral (cerca de 96 mil compostos analisados pela ferramenta de acordo com o admetSAR). Neste caso pode-se indicar, de acordo com as limitações do *software*, que estes compostos apresentam chances teoricamente totais de ligar-se às proteínas plasmáticas.

Como visto anteriormente um composto o qual se liga facilmente às proteínas plasmáticas possui uma tendência a uma menor distribuição para os órgãos alvo e sítios de eliminação, como consequência tem-se a redução da metabolização deste, o que gera um tempo de ação reduzido (SUN et al., 2018). Assim, as moléculas de maior chance de LPP são também a que devem ser administradas em maiores concentrações para que possa exercer sua função farmacológica.

Uma tabela que classifica alguns antimicrobianos em relação ao percentual de LPP fornecidos por Brink (2017) indica se estes se ligam de forma forte (>70%), moderada (30-70%) ou fraca (<30%). De acordo com esta classificação os compostos sintetizados são fortemente ligados às proteínas plasmáticas, na Tabela 13 alguns dos β -lactâmicos estão indicados.

Tabela 13: Classificação de alguns β -lactâmicos de acordo com o percentual de Ligação às Proteínas Plasmáticas

Forte (>70%)	Moderado (30-70%)	Fraco (<30%)
Cefazolina (75-85%)	Cefatoxima (40%)	Amoxicilina (17-20%)
Cloxacilina (94%)	Penicilina G (65%)	Ampicilina (15-25%)
Nafcilina (90%)	Piperacilin (30%)	Ceftarolina (20%)
Oxacilina (93%)	Ticarcilin (55%)	Ceftazidima (17%)
Dicloxacilina (97%)	Piperacilin/Tazomactam (30/30%)	Ceftazidima/Avibactam (<10%/6-8%)

Fonte: Adaptado de Brink (2017).

A Tabela 13 fornece valiosas informações acerca dos antimicrobianos que podem ser utilizados em conjunto com algum dos compostos sintetizados, visto que estes últimos podem atuar como adjuvantes.

Quando um fármaco de alta LPP é administrado simultaneamente com uma de baixa LPP, o último pode sofrer deslocamento, ficando em sua forma livre, consequentemente se disponibiliza para as reações e pode provocar efeitos adversos. Assim, para que não haja ocorrências indesejadas pela administração conjunta e o efeito adjuvante se mantenha deve-se haver um estudo prévio do deslocamento que um composto confere ao outro para posterior avaliação *in vivo*.

Como a associação de compostos que deslocam um ao outro de forma similar podem ser mais eficientes em detrimento das associações com fármacos de LPP extremamente divergentes, em teoria os compostos do presente estudo podem apresentar efeito adjuvante *in*

vivo com os β -lactâmicos de forte LPP como a cefazolina, dicloxacilina, cloxacilina, nafcilina, entre outros.

Para o caso do AL-01, AL-15 e APM-03 que se ligam totalmente às proteínas plasmáticas quando administrados individualmente podem ter pouco ou nenhum efeito farmacológico considerável, porém quando em conjunto com um LPP forte estes compostos podem ser deslocados para desenvolver sua função. Deste modo a concentração administrada destes compostos adjuvantes deve ser pequena, visto que há a possibilidade da ocorrência de efeitos adversos.

Estas três últimas moléculas apresentam os Log P variando de 2,18 a 2,43 sendo próximos entre si, contudo outras moléculas também possuem valores semelhantes, então o Fator de Retenção (F.R.) pode ser analisado como característica secundária da lipofilicidade das moléculas. Curiosamente o AL-01, AL-15 e APM-03 foram eluidos no sistema Hexano/Acetato de Etila na proporção 7:3 igualmente apenas ao AL-02, entretanto este último apresentou Log P e F.R. mais elevado que os demais. Deste modo, os três compostos que apresentam total ligação às proteínas plasmáticas possuem caráter lipofílico semelhante e intermediário em relação aos outros nove, isto implica em semelhança com a superfície das referidas proteínas.

Como apresentado pelo *boiled-egg* do Gráfico 8, a maior parte dos compostos sintetizados (com exceção do APC-01 e EE-06) possuem a capacidade de permear a Barreira Hematoencefálica (BHE) de acordo com os resultados previstos pelo SwissADME. A partir do admetSAR pôde-se inferir uma probabilidade de que ocorra ou não a permeação da BHE, que seja inibidor ou substrato da P-gp.

Neste contexto os resultados de ambas as plataformas corroboram que os compostos do estudo possuem altas chances de não inibir ou não ser substrato da P-gp. Para a permeação da BHE todas as moléculas apresentam chances acima de 90% de atravessá-la, mesmo as que para o *boiled-egg* do SwissADME apresentem-se na região do trato gastrointestinal (APC-01 e EE-06).

5.5.4 Metabolização

A metabolização sistêmica de fármacos pode ocorrer de diferentes maneiras, de forma genérica algumas enzimas (principalmente as hepáticas) têm a propriedade de modificar quimicamente alguns substituintes nas moléculas dos fármacos. Basicamente, as biotransformações podem ser de dois tipos, a de Fase I que compreende as reações de oxidação,

redução e hidrólise, e a de Fase II em que ocorrem reações de conjugação (ANDRADE et al., 2016).

5.5.4.1 Fase I

Na Fase I as moléculas passam por uma funcionalização realizada pelo fígado através de catálise enzimática, sendo estas pertencentes à superfamília do citocromo P450 (CYP). Esta superfamília é composta por 14 famílias e aproximadamente 57 isoformas diferentes. As isoenzimas 1A2, 2C19, 2C9, 2D6 e 3A4 são reconhecidas como as mais influentes para o metabolismo de drogas. Informados na Tabela 14, tem-se a capacidade inibitória dos doze compostos indicando se há a possibilidade de ocorrer ou não a inibição frente a cinco isoformas da enzima citocromo P450 (CYP) (MANO; SCOTT; HONORIO, 2018).

Tabela 14: Possibilidade da ocorrência de inibição das isoformas CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP1A2. Os resultados com valores negativos indicam a não inibição; os positivos, possibilidade de inibição.

Código	CYP3A4	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP1A2
AL-01	-0,9582	-0,6648	-0,8294	-0,9099	0,67
AL-02	-0,9597	0,5939	-0,5	-0,8853	0,7981
AL-15	-0,8490	-0,8486	-0,8153	-0,9286	0,8363
APB-01	-0,9154	0,5000	-0,5342	-0,8826	0,7716
APB-02	-0,9028	0,6973	0,7709	-0,8738	0,8418
APB-03	-0,7704	-0,5981	-0,5911	-0,9183	0,9082
APC-01	-0,8333	-0,729	-0,8487	-0,7764	0,7064
APM-01	-0,5519	-0,8019	-0,9058	-0,8956	0,6754
APM-02	0,5452	-0,5579	-0,6716	-0,8853	0,695
APM-03	0,7822	-0,9071	-0,9025	-0,9231	0,9107
EE-03	-0,773	-0,5549	-0,6087	-0,7875	0,8112
EE-06	-0,5147	-0,9136	-0,9469	-0,937	0,7746

Fonte: Autoria (2020).

A isoenzima CYP1A2 é a principal metabolizadora da cafeína no fígado pelos processos de desmetilação. Sua expressão é induzida por alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), como os presentes na fumaça de cigarros transformando-a em agentes carcinogênicos. Apesar de poder interagir muito facilmente os substratos xenobióticos desta enzima são desconhecidos. Alguns outros substratos como a cafeína, aflotoxina B1 e o paracetamol podem ser metabolizados, além ácidos graxos poli-insaturados em moléculas de sinalização que possuem atividade patológica e fisiológica. Todas as moléculas estudadas possuem interação com esta isoenzima (WESTPHAL; KONKEL; SCHUNCK, 2011).

Os valores probabilísticos variantes de zero à unidade obtidos na Tabela 14 podem ser convertidos para percentagem quando multiplicados por cem, facilitando a compreensão dos termos apresentados. No estudo em questão, o CYP1A2 tem chances acima de 65% de ser inibida pelos compostos sintetizados, sendo maior a possibilidade de acordo com a ordem $H < Cl < OCH_3$, com exceção da série APC na qual o de substituinte 4-Cloro (EE-03) possui chances mais elevadas em relação ao de substituinte OCH_3 (EE-06). A família de moléculas com maiores chances de inibição para esta isoenzima é a APB.

O CYP2C19 é responsável por metabolizar nos seres humanos ao menos 10% dos fármacos de uso clínico e está envolvido no metabolismo de xenobióticos incluindo muitos inibidores da bomba de prótons e antiepiléticos. Além disso, estas enzimas são monooxigenases que catalisam muitas reações envolvidas no metabolismo de colesterol, esteroides e outros lipídeos (KHANAL et al., 2019).

Todas as moléculas, com exceção do APB-02, não apresentaram capacidade de inibir a CYP2C19 que é predominante no fígado, participando da Fase I de metabolização de fármacos como o omeprazol, alguns antidepressivos, anti-úlceras, anticonvulsivantes, entre outros dependem desta enzima (FLEMING, 2014).

A CYP2C9 está associada a catálise de fármacos anti-inflamatórios não estereoidais, anticoagulantes e anticonvulsivantes. A partir do modelo teórico, esta isoenzima tem chances de 59,39; 50,00; e 69,73% de ser inibida pelo AL-02, APB-01 e APB-02 respectivamente. Os demais compostos tem de 55,59 a 91,36% de chances de não inibir esta enzima.

Para a CYP2D6 nenhum dos compostos mostrou-se como provável inibidor visto que as chances de não-inibição são elevadas e variaram de 78,75 (EE-03) a 93,70% (EE-06). O CYP3A4 foi apontado como não sendo inibido pela maioria dos compostos, com exceção do APM-02 e APM-03 que apresentaram chances de inibição de 54,52 e 78,22% respectivamente,

os demais apresentaram uma variação de 51,47 a 95,97% de probabilidade de não-inibição. Estas duas últimas isoenzimas são responsáveis por metabolizar aproximadamente 70% dos fármacos.

Estas isoenzimas da família de monooxigenase CYP450 são frequentemente relacionadas com a metabolização da maioria dos medicamentos, desta forma quando se administra um fármaco em conjunto pode ocorrer interação medicamentosa a depender de se o fármaco exerce ou não função de substrato, indutor e/ou inibidor frente a esta enzima (BRAZ et al., 2018).

Interações medicamentosas podem ocorrer principalmente quando há inibição da enzima CYP450, ocorrendo quando ambos inibidor e substrato competem diretamente pelo sítio ativo da macromolécula. Ao atuar como inibidor ocorre um aumento da toxicidade do medicamento quando afetado pela interação ou redução da efetividade (no caso dos pró-fármacos) (THOMFORD et al., 2016).

Na Tabela 15 podem ser encontradas a possibilidade de os doze compostos sintetizados serem ou não substrato frente a três isoenzimas CYP3A4, CYP2C9 e CYP2D6 anteriormente apresentadas e a capacidade das moléculas atuarem ou não como suas inibidoras. Os valores negativos expostos indicam a chance de não serem substrato opostamente, os positivos a de atuarem como substrato.

Tabela 15: Estudo *in silico* da capacidade de atuar como substrato das isoenzimas CYP3A4, CYP2C9 e CYP2D6. Valores negativos indicam a chance de serem não substrato.

Código	CYP3A4	CYP2C9	CYP2D6
AL-01	-0,5802	-0,8005	-0,8531
AL-02	0,5658	-0,8116	-0,8620
AL-15	-0,5000	-0,6268	-0,8323
APB-01	-0,5915	-1,0000	-0,8358
APB-02	0,5390	-1,0000	-0,8469
APB-03	0,5188	-1,0000	-0,8146
APC-01	-0,7327	-1,0000	-0,8528
APM-01	-0,7595	-0,6243	-0,7377
APM-02	-0,6062	-0,6201	-0,7652
APM-03	-0,6082	0,7659	-0,7069
EE-03	-0,5839	-1,0000	-0,8608
EE-06	-0,5823	-0,7983	-0,8335

Fonte: Aatoria (2020).

Para o CYP3A4 o AL-02, APB-02 e APB-03 apresentaram a possibilidade de atuar como substrato, sendo estas de 0,5658; 0,5390; e 0,5188, os demais apresentaram valores que variaram de 0,5000 a 0,7595 negativos, ou seja, de não atuarem como possíveis substratos. Ao analisar este parâmetro, não houve linearidade observável em relação aos grupos dos compostos ou mesmo do substituinte.

De acordo com estudos realizados por Wungwattana e Savic (2017) a Nafcilina atua como um indutor da CYP3A4 podendo ter como principal consequência clínica a redução da efetividade de um possível adjuvante. Desta forma, pode-se presumir que de acordo com as avaliações *in silico* compostos como o AL-02, APB-02 e APB-03 (substrato) e principalmente o APM-02 e APM-03 (inibidores) possivelmente apresentariam interações medicamentosas com este fármaco decorrente do aumento da toxicidade provocada pela indução do CYP3A4.

Os demais compostos sintetizados teoricamente tem baixas chances de interagirem com a Nafcilina, podendo assim atuar como adjuvante deste.

Assim, apesar da Nafcilina e os compostos sintetizados possuírem LPP próximos e não apresentarem possíveis problemas relativos à distribuição, há chances elevadas de que haja competição desta com o AL-02, APB-02, APB-03, APM-02 e APM-03 pelo sítio ativo da isoenzima CYP3A4, levando a efeitos adversos.

Das moléculas apresentadas, apenas o APM-03 apresentou probabilidade de atuar como possível substrato da CYP2C9 sendo esta de 0,7659. Os demais apresentaram valores para não substrato que variaram de 0,6201 a 1,0000, sendo o valor máximo encontrado para a série APB, APC-01 e EE-03 assim, estes últimos possuem poucas chances de atuar como substrato desta isoenzima.

No caso do CYP2D6 todas as moléculas são não substratos e seus valores situaram-se entre 0,7069 e 0,8969. Para o caso desta isoenzima os compostos apresentaram um padrão de aumento de chance de ser não substrato na ordem $OCH_3 < H < Cl$.

Algumas proteínas localizadas na membrana celular têm a função de transportar substâncias endógenas e fármacos exercendo uma importante função na absorção, distribuição e excreção. Assim, estes influenciam na variabilidade da resposta farmacêutica e a toxicidade alguns deles são os da família OATP, MATE, OCT e BSEP (DROZDZIK et al., 2019). Na Tabela 16 podem ser encontradas as probabilidades dos ensaios *in silico* dos compostos serem inibidores ou não destes transportadores.

Tabela 16: Probabilidade *in silico* dos compostos atuarem como inibidor ou não inibidor dos transportadores OATP2B1, OATP1B1, OATP1B3, MATE1, OCT2 e BSEP.

Código	OATP2B1	OATP1B1	OATP1B3	MATE1	OCT2	BSEP
AL-01	-1,0000	0,9340	0,9600	-0,9200	-0,8750	0,5511
AL-02	-1,0000	0,9449	0,9538	-0,8600	-0,8250	0,7650
AL-15	-1,0000	0,9477	0,9686	-0,9200	-0,9250	0,6390
APB-01	-1,0000	0,9347	0,9398	-0,8800	-0,8250	0,7250
APB-02	-1,0000	0,9343	0,9407	-0,8000	-0,8250	0,8550
APB-03	-1,0000	0,9275	0,9527	-0,9000	-0,8750	0,8560
APC-01	-1,0000	0,9698	0,9505	-0,9218	-0,9250	-0,6580
APM-01	-1,0000	0,9486	0,9549	-0,9800	-0,9000	-0,8100
APM-02	-1,0000	0,9529	0,9539	-0,9000	-0,8250	-0,6450
APM-03	-1,0000	0,9503	0,9716	-0,9400	-0,9000	-0,7080
EE-03	-1,0000	0,9694	0,9488	-0,9018	-0,7500	-0,5120
EE-06	-1,0000	0,9677	0,9596	-0,9218	-0,9250	-0,6340

Fonte: Autoria (2020).

Um sistema de transporte permite a incorporação do fármaco ao tecido hepático para que haja sua biotransformação, este sistema é influenciado pelo Polipeptídeo Transportador de ânions Orgânicos (*Organic Anion Transporting Polypeptides* – OATP) (FARASYN et al., 2019). Além disso alguns substratos OATP são parcialmente metabolizados pelos CYP450 de forma que ambos contribuem para a farmacocinética (SANOI et al., 2020).

O OATP2B1 se trata de um transportador de captação que possui uma especificidade ampla de substrato, transportando principalmente endo e xenobióticos orgânicos aniônicos. Esta enzima é comumente associada a absorção oral de fármacos pois sua função está ligada ao pH do meio, sendo importante para o transporte gastrointestinal (FUJITA et al., 2016). Todos os compostos que estão apresentados na Tabela 16 podem ser considerados como possíveis não inibidores desta enzima.

Se tratando da OATP1B1, responsável pela absorção hepática de fármacos e compostos endógenos do sangue, os estudos *in silico* apontaram para a inibição desta enzima transportadora com probabilidade a partir de 93,40%. Este aspecto é fundamental pois ao ocorrer a inibição pode haver uma exposição exacerbada do paciente ao medicamento (ZHANG et al., 2019).

O OATP1B3 quando em conjunto com o OATP1B1 é responsável pela absorção hepática de algumas importantes classes de medicamentos, sendo considerado também um mediador de interações medicamentosas (TAKEHARA et al., 2017). Analogamente ao caso do OATP1B1, os compostos sintetizados também apresentaram probabilidades elevadas de agirem como inibidor do OATP1B3.

O MATE1 é uma enzima responsável por controlar o efluxo de diversos substratos no rim e no fígado, este transportador é de fundamental importância para a excreção renal e biliar de cátions orgânicos endógenos e exógenos (DOKI et al., 2019). Na Tabela 16 podem ser encontradas as probabilidades de os compostos agirem como inibidores ou não do MATE1, todos eles são possíveis não inibidores com chances acima de 80%.

Assim como o MATE1, o OCT2 desempenha um papel fundamental na eliminação e depuração renal de fármacos principalmente os catiônicos e endógenos, esta enzima possui ação mútua com o MATE1 que facilita a eliminação de seus substratos (SUENAGA et al., 2017). Os compostos não apresentaram, de acordo com a avaliação *in silico*, capacidade considerável de inibir o OCT2.

A Bomba de Exportação de Sal Biliar (BSEP, do inglês *Bile Salt Export Pump*), responsável por transportar sais biliares do hepatócito para os canalículos biliares para posterior exportação para o trato gastrointestinal (TGI), apresentou como possíveis inibidores as moléculas da série AL e APB com probabilidades acima de 55,11% (AL-01) os demais são possíveis não inibidores. Quando um fármaco atua como inibidor da BSEP como resultado tem-se o acúmulo de sais biliares no fígado, podendo levar à colestase e/ou lesão hepática induzida por medicamento (JIA; XIE; JIA, 2018).

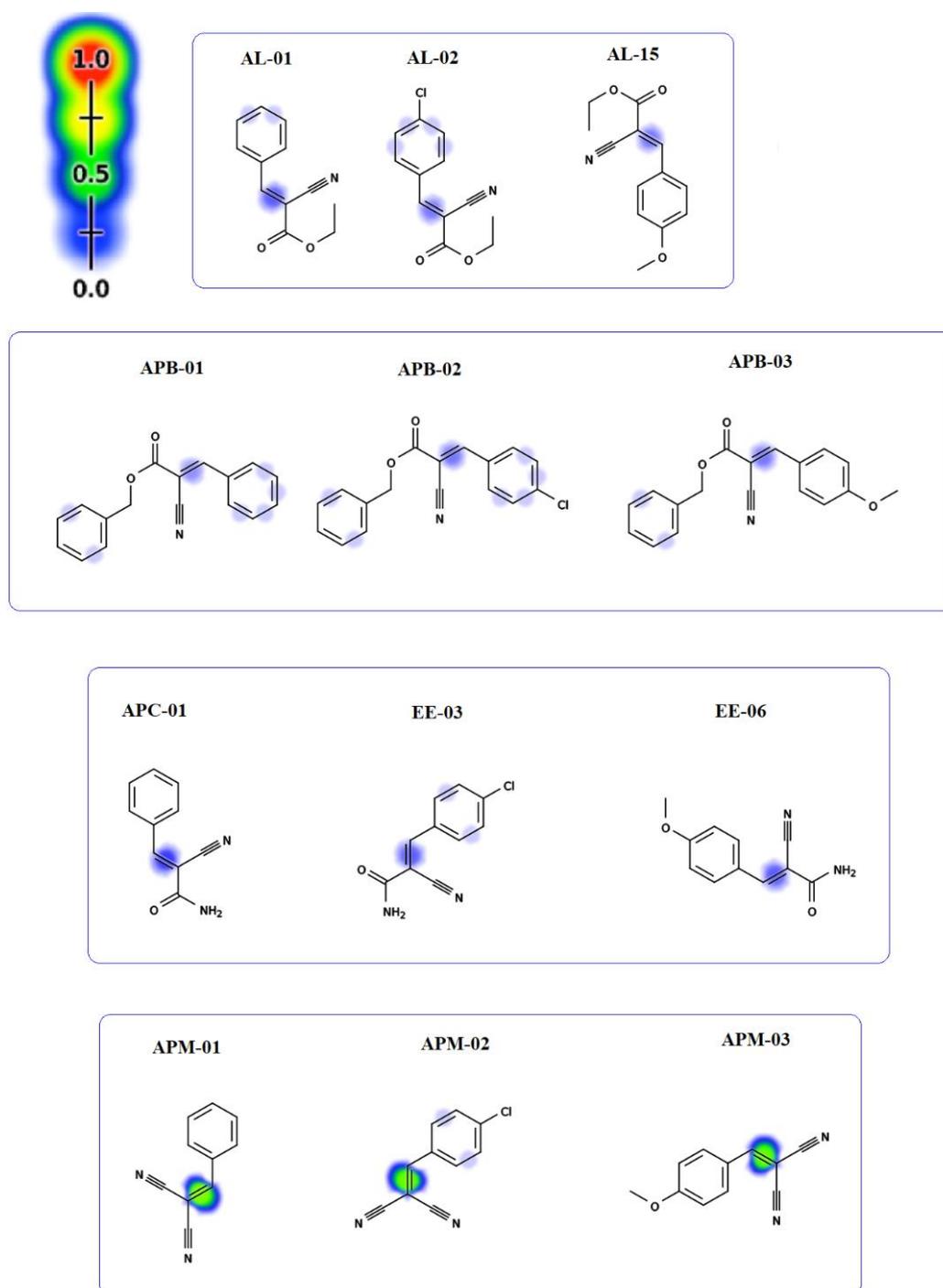
Vistas as possibilidades dos compostos sintetizados atuarem como inibidores das enzimas transportadoras e como inibidor e/ou substrato das principais isoenzimas (CYP450), para que se possa planejar uma futura modificação molecular visando facilitar a eliminação ou diminuição da toxicidade bem como alterar sua capacidade de ser inibidor/substrato deve-se estudar as reações que estão envolvidas na farmacocinética das moléculas.

A conversão dos compostos originais para formas mais eletrofílicas, reações estas que ocorrem nas P450, produzem moléculas capazes de reagir irreversivelmente com nucleófilos de tecidos. Os metabólitos reativos geralmente são de curta duração e tem sua toxicidade limitada ao órgão onde são formados, em alguns casos pode ocorrer o seu transporte entre tecidos de modo a exercer efeitos deletérios. Dentre os metabólitos reativos incluem-se os epóxidos, quinonas, radicais livres, espécies reativas de oxigênio e conjugados instáveis (RUDIK et al., 2017).

5.5.4.1.1 *Epoxidação*

Quimicamente, os epóxidos são compostos que contém um éter cíclico sendo este anel composto por três átomos, estruturalmente aproximando-se de um triângulo equilátero, ou seja, sua angulação o torna tenso e, portanto, altamente reativo. A identificação de compostos que podem sofrer esta reação e determinar o local de epoxidação de uma estrutura pode auxiliar nas pesquisas para encontrar novos medicamentos mais seguros (XIAO et al., 2020). Na Figura 37 encontram-se os compostos sintetizados e os possíveis locais de epoxidação apresentados de forma qualitativa onde são apontados em forma de padrão de cores fornecidos pelo Xenosite.

Figura 37: Possíveis locais de epoxidação dos compostos sintetizados, apontando quão possíveis são de ocorrer por meio de padrão de cores em seus devidos locais.



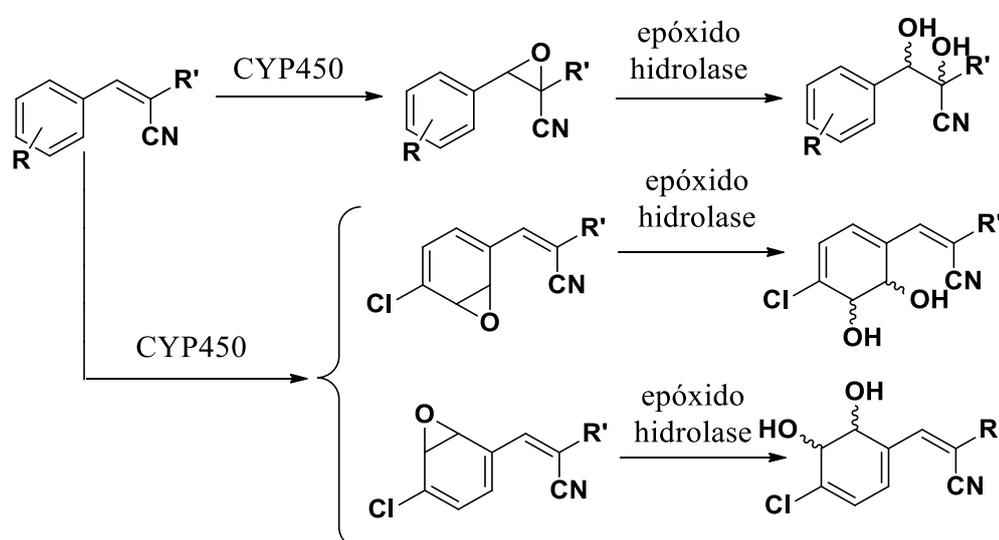
Fonte: Autoria (2020).

Das doze moléculas, as séries AL, APB e APC apresentaram baixas chances de ocorrer a reação sendo para estas um *score* de reatividade abaixo de 0,25 e seus principais locais de epoxidação estão situados principalmente na ligação π formada a partir da reação de Knoevenagel e secundariamente em alguns dos anéis aromáticos ocorrendo em grande parte

nos de substituinte 4-Cloro. A série APM apresentou um maior *score* (0,50) de acontecer a epoxidação, assim, modificações estruturais são mais necessárias nesta para reduzir as chances de toxicidade por reação de epoxidação.

Outro aspecto importante é a presença do halogênio na estrutura que promove uma leve tendência de a reação ocorrer no aromático ligado a ele. Por se tratar de um substituinte fraco desativador *orto-para* dirigente, a epoxidação tende a ocorrer na posição *orto* de forma mais efetiva quanto menor for o *score* na insaturação característica. Na Figura 38 pode ser observada uma estimativa de como ficariam os compostos após sofrer a reação de metabolização epoxidação, sendo a ocorrência desta mais relacionada a série APM ($R' = CN$).

Figura 38: Possível reação de epoxidação para os compostos.



$R = H, Cl, OCH_3$

$R' = COOCH_2CH_3, COOCH_2Ar, CONH_2, CN$

Fonte: Aatoria (2020).

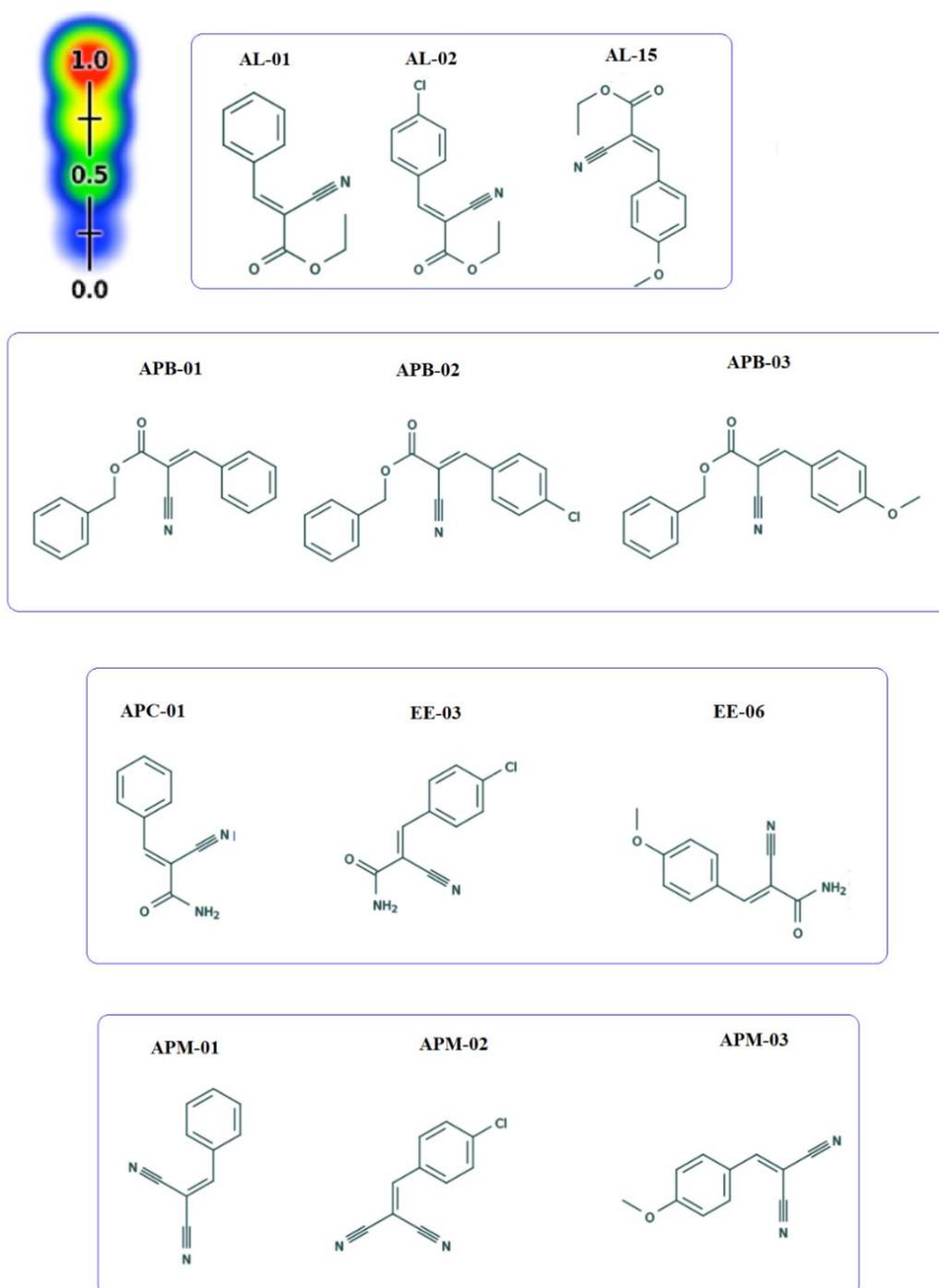
5.5.4.1.2 Desidrogenação

As isoenzimas CYP3A4 e CYP2D6 são responsáveis pela desidrogenação que anteriormente foram vistas as probabilidades de os compostos atuarem ou não como substratos e/ou inibidor destas CYP450 (WEI et al., 2019). Na Figura 39 encontram-se os compostos sintetizados e os locais onde há provável chance de ocorrer esta reação.

De acordo com os resultados *in silico* obtidos por meio do *software* XenoSite em nenhum dos compostos sintetizados há possíveis locais que sejam possíveis de ocorrer a desidrogenação,

entretanto de acordo com os resultados de inibição para as CYP450 as moléculas APM-02 e APM-03 aparentemente podem inibir a CYP3A4. Assim, a competição destas moléculas com um fármaco pelo sítio de ação desta isoenzima tornaria mais difícil uma reação de desidrogenação com um fármaco substrato.

Figura 39: Locais onde há chances de ocorrer reação de desidrogenação.



Fonte: Autoria (2020).

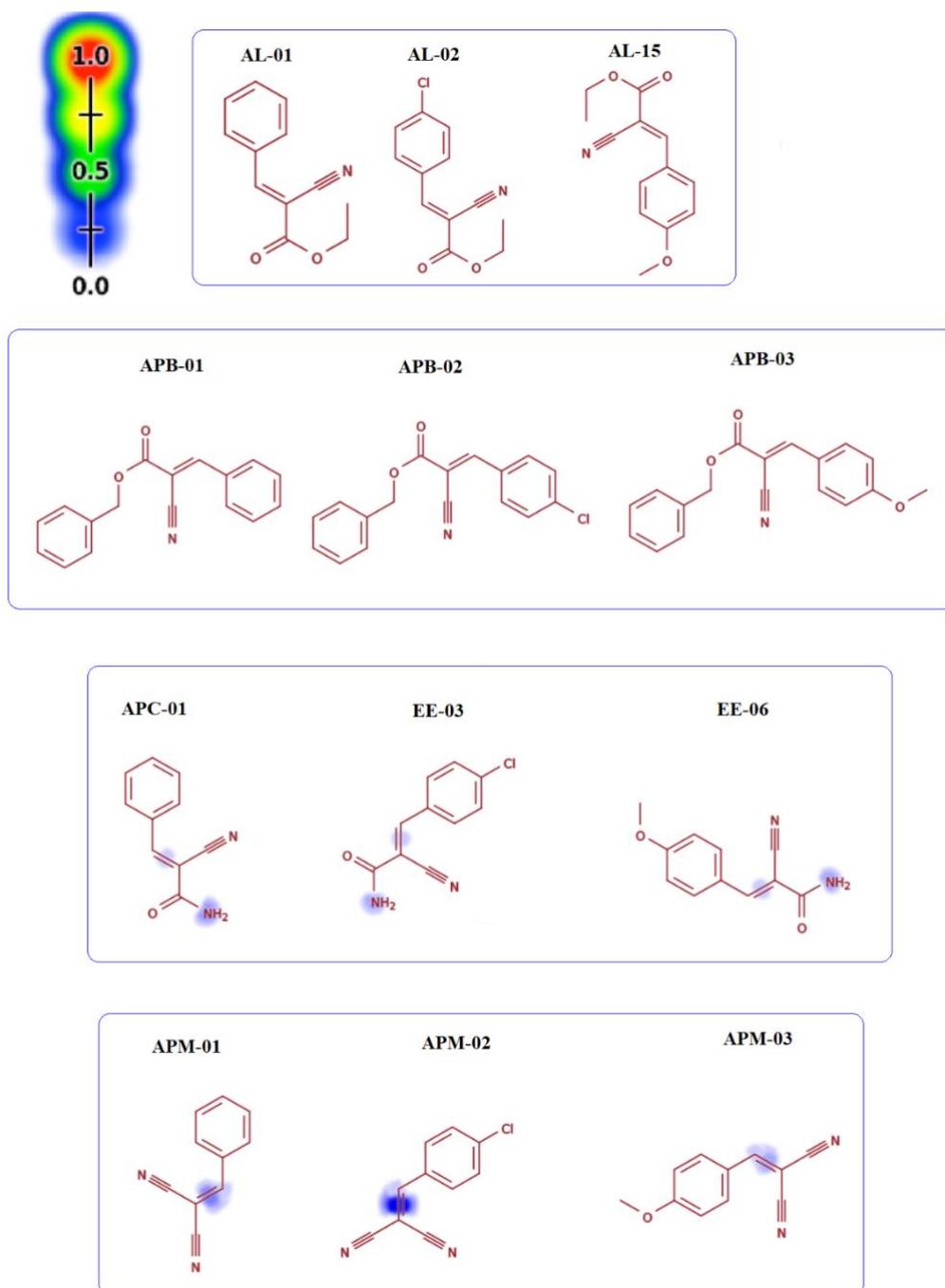
5.5.4.1.3 Oxigenação Estável e Instável

Os fármacos podem sofrer algumas reações que envolvem a oxigenação, quando há presença de espécies oxidativas e uma subsequente interrupção da homeostase redox celular são um fator para a promoção da hepatotoxicidade (FISK; GREENE; NAVEN, 2018). No caso da oxigenação estável, um oxigênio é adicionado ao substrato produzindo um único metabólito observável, estas reações incluem a hidroxilação, epoxidação alifática/aromática, oxidação de nitrogênio e enxofre (DANG et al., 2020).

A oxigenação instável está associada a desestabilização do substrato mediante a introdução de um oxigênio, o que ocorre é uma separação da molécula em duas partes uma contendo o átomo de oxigênio e outra não. Estas reações incluem as com nitrogênio, oxigênio, enxofre, desalquilação de carbono e desalogenação oxidativa (FLYNN et al., 2020).

Assim, alguns compostos podem reagir com o oxigênio, produzindo espécies tóxicas e conseqüentemente dano celular. Na Figura 40 e Figura 42 podem ser encontrados os *scores* de reatividade relativos à oxigenação estável e instável respectivamente.

Figura 40: Oxigenação Estável.

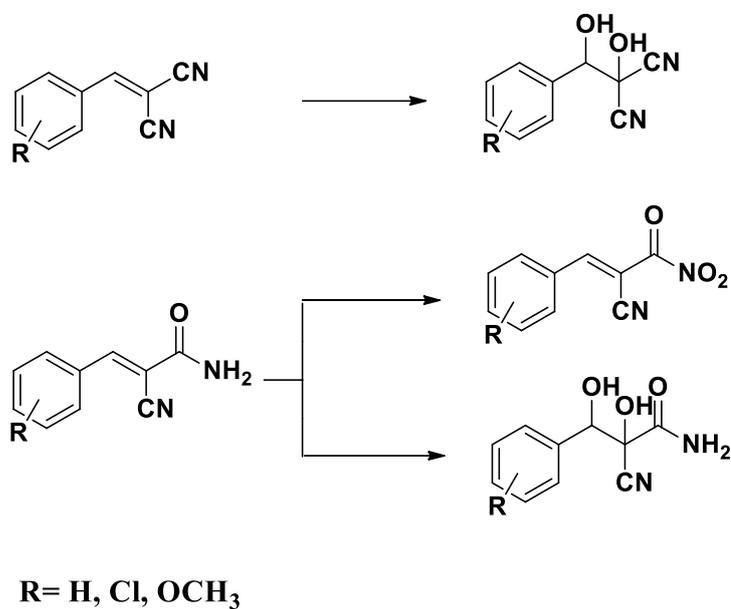


Fonte: Aatoria (2020).

Dos doze compostos, observou-se regiões onde podem ocorrer a adição de um oxigênio sem que este seja separado em duas partes. As moléculas das séries AL e APB não apresentaram pontos de possíveis oxigenação estável, mantendo-se inalterado quanto a este parâmetro. A série APC, apresentou fracas *scores* de reatividade na ligação π característica e no nitrogênio da função amida, os APMs também apresentaram fracas *scores* na insaturação. Na Figura 41

podem ser observadas as possíveis reações que estas duas últimas série podem apresentar para este parâmetro.

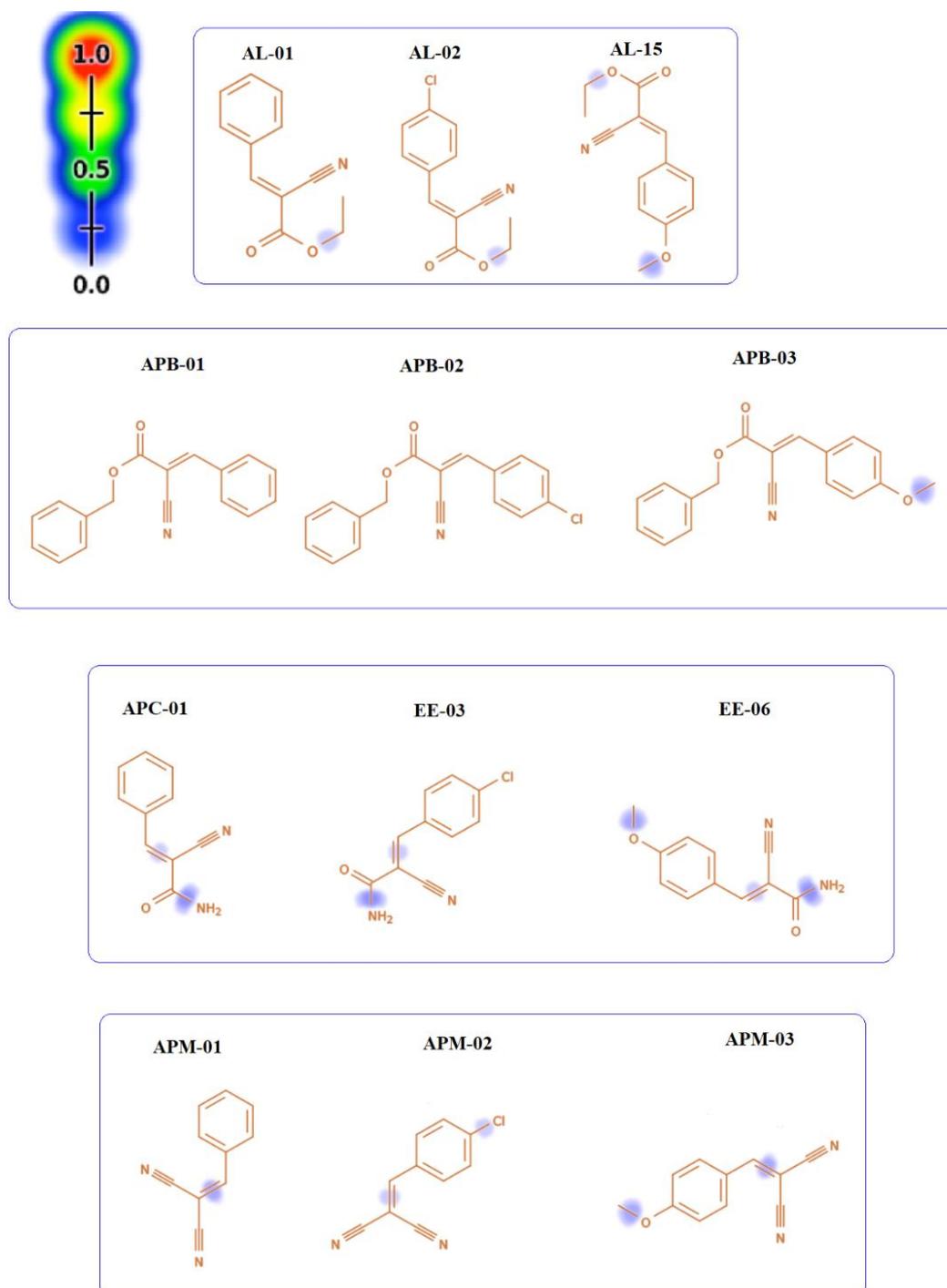
Figura 41: Possíveis reações de oxidação estável.



Fonte: Aatoria (2020).

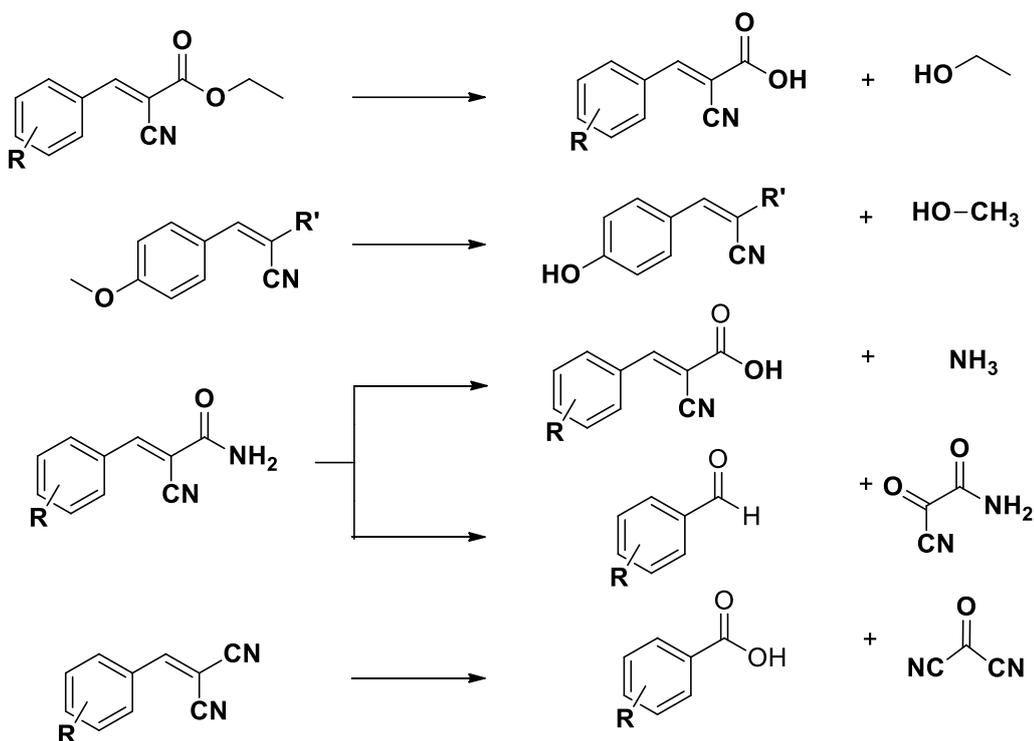
Para o caso da oxigenação instável, na qual há a separação do composto original em duas ou mais espécies, todos os que apresentaram a metoxila têm singelos *scores* de reatividade neste ponto os demais apresentam na função éster para os ALs, amida e insaturação para os APCs, insaturação para os APMs e 4-cloro para o APM-02. Os únicos compostos que não apresentaram nenhum ponto de reatividade para este parâmetro foram o APB-01 e APB-02.

Figura 42: Oxigenação Instável.



Fonte: Autoria (2020).

Na Figura 43 pode ser observada as possíveis reações para a oxidação instável para os compostos, os rompimentos das ligações ocorrem principalmente nas funções metoxila, etoxila, vinílico e amida cujas densidades eletrônicas estão mais evidentes.

Figura 43: Possíveis reações para a oxidação instável dos compostos

R= H, Cl, OCH₃

R'=COOCH₂CH₃, COOCH₂Ar, CONH₂, CN

Fonte: Aatoria (2020).

Por se tratarem de *scores* de reatividade muito baixo para a oxigenação estável e instável, pode-se dizer que dificilmente ocorreria este tipo de reação nos compostos sintetizados. Isto reduz as chances de haver uma possível toxicidade pela formação de espécies reativas.

5.5.4.1.4 Redução

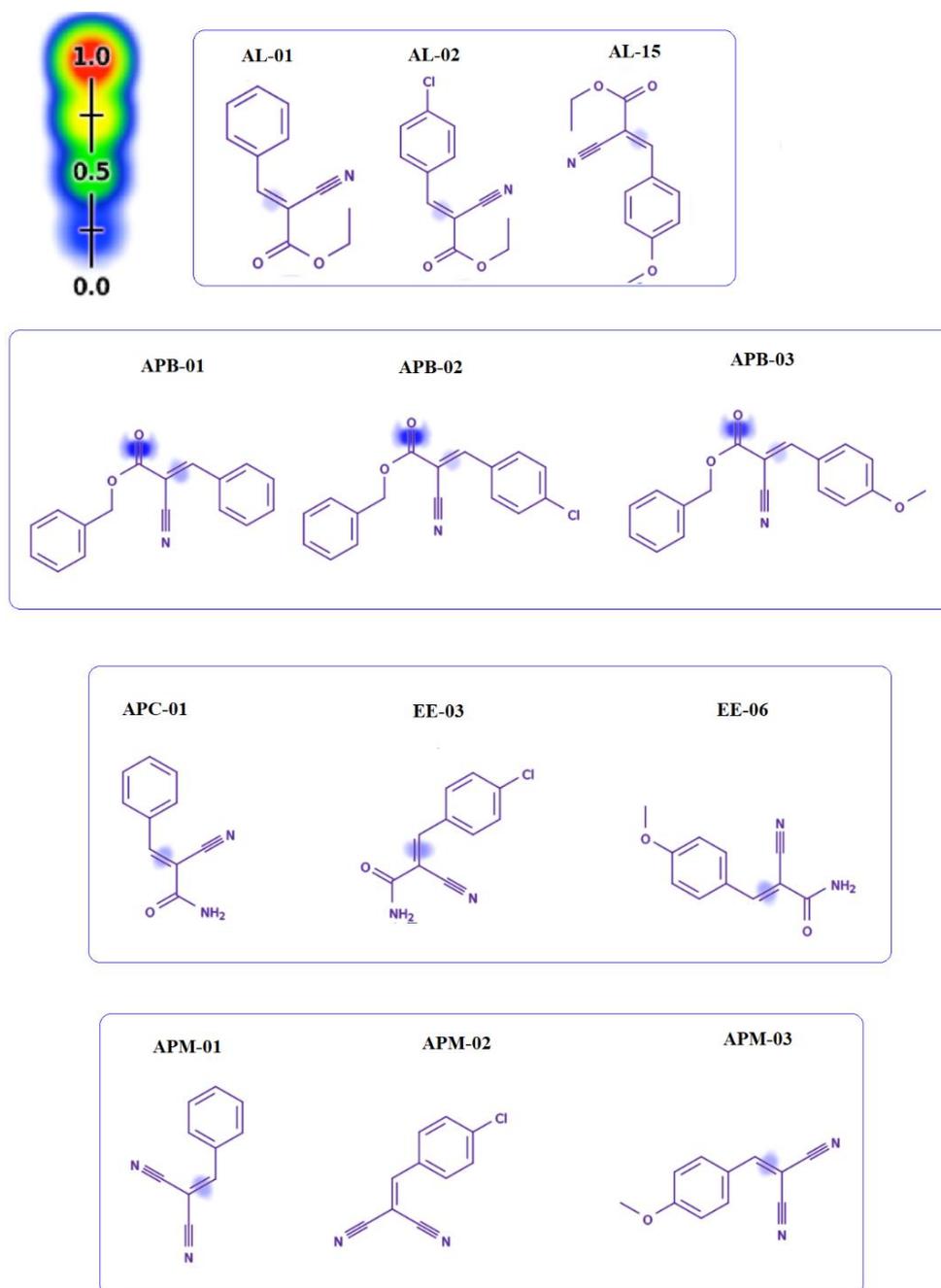
Nas reações de redução um oxigênio é removido ou hidrogênios são adicionados a esta, podem compreender grupos nitro, carbonila, sulforedução, desalogenação redutiva e hidrogenação. Estas reações podem ser de três tipos: Azo reduções, quando há insaturação entre dois nitrogênios e estes são separados como no caso do prontossil e tartrazina; nitro reduções em que um grupo RNO₂ é sucessivamente reduzido até RNH₂ como nos substratos de fármaco nitrobenzeno, cloranfenicol, clonazepam e dantrolneo; e por fim reduções de carbonilas, onde o grupo carbonila é convertido em hidroxila assim como ocorre com a metirapona, metadona e naloxona (THAKKAR; KATE, 2020).

Na Figura 44 podem ser observados os possíveis locais nos quais podem ocorrer a reação de redução na Fase I de metabolização de fármacos. Dos compostos analisados por meio do

software os que apresentaram maiores *scores* de reatividade foram os da série APB, os quais situam-se mais acentuadamente nos grupos carbonila, podendo-se presumir que ocorra uma redução destas em hidroxilas. Ainda que comparativamente alta em relação aos demais, esta reatividade não é acentuada podendo apenas uma parte ser reduzida e outra permanecer inalterada.

De modo geral, os compostos apresentaram fracos *scores* de reatividade, porém ainda assim presentes nas insaturações comum à todas as séries com exceção do APM-02 que houve ausência de pontos de redução.

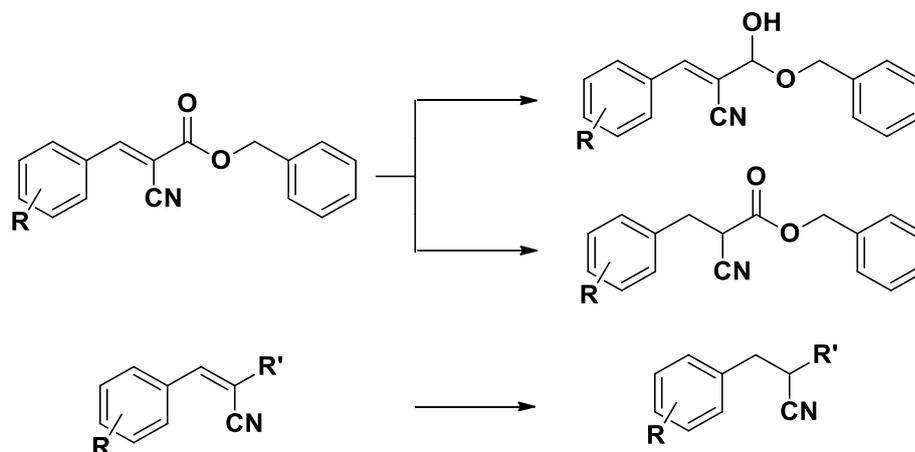
Figura 44: Locais onde podem ocorrer as reações de redução na Fase I de metabolização.



Fonte: Autoria (2020).

Apesar dos fracos *scores* de reatividade é necessário um entendimento prévio das substâncias que serão originadas a partir da reação de metabolização por redução (Figura 45) para que os seus produtos sejam avaliados para uma possível toxicidade ou dificuldade de eliminação pelo organismo.

Figura 45: Possíveis reações de metabolização por redução.



R= H, Cl, OCH₃

R'=COOCH₂CH₃, COOCH₂Ar, CONH₂, CN

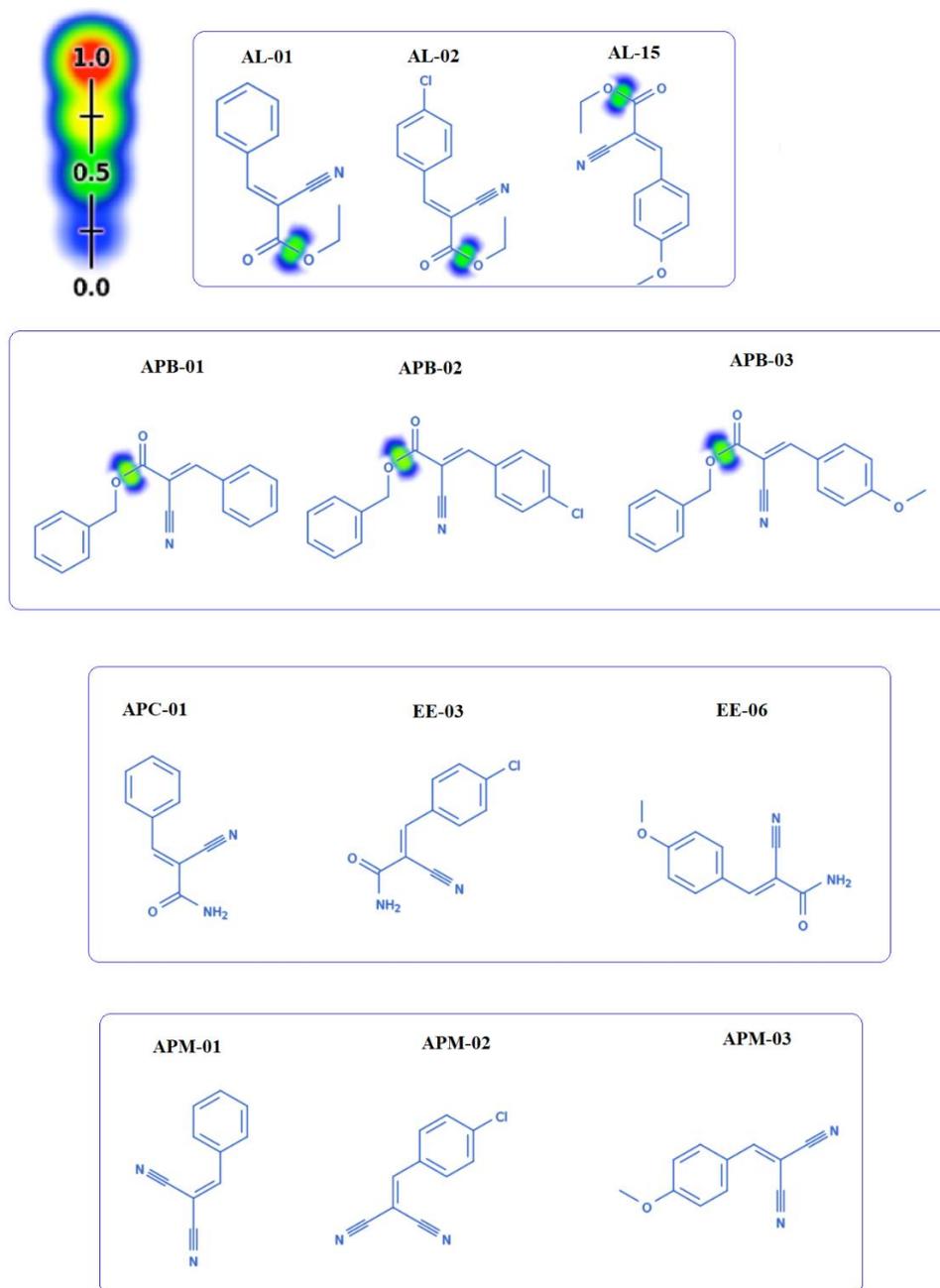
Fonte: Autoria (2020).

5.5.4.1.5 Hidrólise

Para finalizar as reações metabólicas de Fase I, na hidrólise ocorre a adição de uma molécula de água à uma amida ou éster, causando a ruptura de uma ligação gerando dois metabólitos. Quando ocorre esta reação com ésteres formam-se um ácido carboxílico e um álcool como ocorre com os substratos procaína, succinilcolina, ácido acetilsalicílico, clofibrato e metilfenidato. As amidas são separadas em ácido carboxílico e aminas como a procainamida, lidocaína e indometacina (RUDIK et al., 2019).

Na Figura 46 é possível observar os possíveis locais onde pode ocorrer reações de hidrólise, para as séries APC e APM não há prováveis pontos em que possa ocorrer este tipo de reação. Entretanto as séries AL e APB podem sofrer hidrólise em suas funções ésteres considerando um *score* de reação por volta de 0,5/1,0. Ao ocorrer um rompimento de ligação neste ponto poderia ser observado a obtenção da mesma molécula principal onde seria observada a função ácido carboxílico onde havia previamente um éster. Como subproduto das reações de hidrólise para as séries AL e APB se teriam o etanol e fenilmetanol respectivamente.

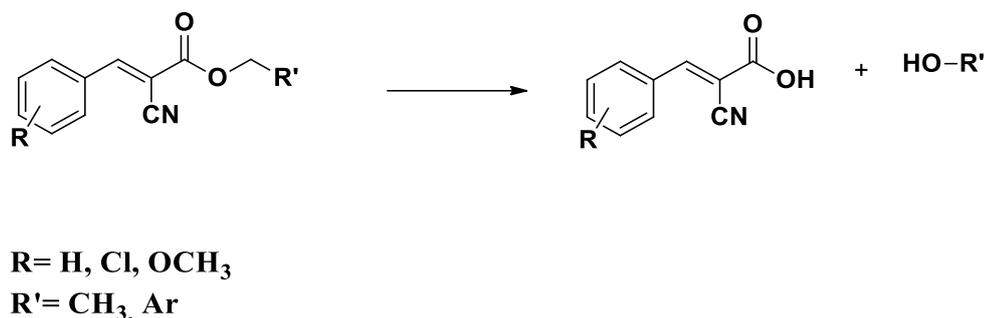
Figura 46: Possíveis locais onde podem ocorrer reações de hidrólise.



Fonte: Aatoria (2020).

Na Figura 47 é possível observar os produtos da reação de metabolização por hidrólise para as séries AL e APB, onde ocorre a mudança de função éster para ácido carboxílico em ambos os casos.

Figura 47: Possíveis reações de metabolização por hidrólise para os compostos AL e APB.



Fonte: Aatoria (2020).

5.5.4.2 Fase II

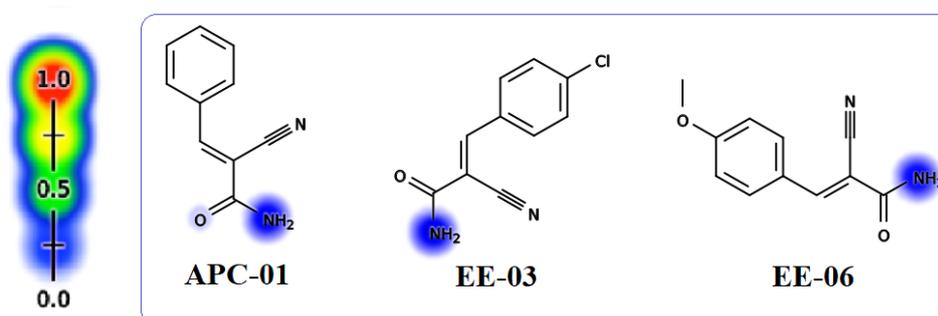
Na metabolização de Fase II os fármacos que contêm grupos químicos adequados frequentemente sofrem de reações de acoplamento ou conjugação com uma substância endógena, gerando os conjugados de fármacos. Como consequência desta fase, as moléculas após passarem pelas reações se tornam polares e acabam por ser excretada de imediato e/ou inativadas (MORTELE et al., 2018).

5.5.4.2.1 UGT catálise

Para que estes conjugados sejam formados é necessário que haja antes a formação de intermediários de alta energia, como estas reações não ocorreriam naturalmente enzimas de transferência específicas se encarregam deste processo. Uma das transferases, a uridina 5'-difosfato (UDO)-glicuronil transferases (UGT) é uma das mais dominantes e é responsável pela catálise do acoplamento de substâncias endógenas ativas com um fármaco ou outro composto endógeno (SHARMA et al., 2020).

Através das predições farmacocinéticas do *software* admetSAR nenhum dos compostos apresentou probabilidade de ser catalisado pela UGT, entretanto o XenoSite apontou alguns possíveis pontos nos quais poderia ocorrer a catálise apenas para a série APC estão apontados na Figura 48 como tendo baixo *score* de reatividade no NH₂ da função amida.

Figura 48: Locais onde podem ocorrer a UGT catálise.



Fonte: Aatoria (2020).

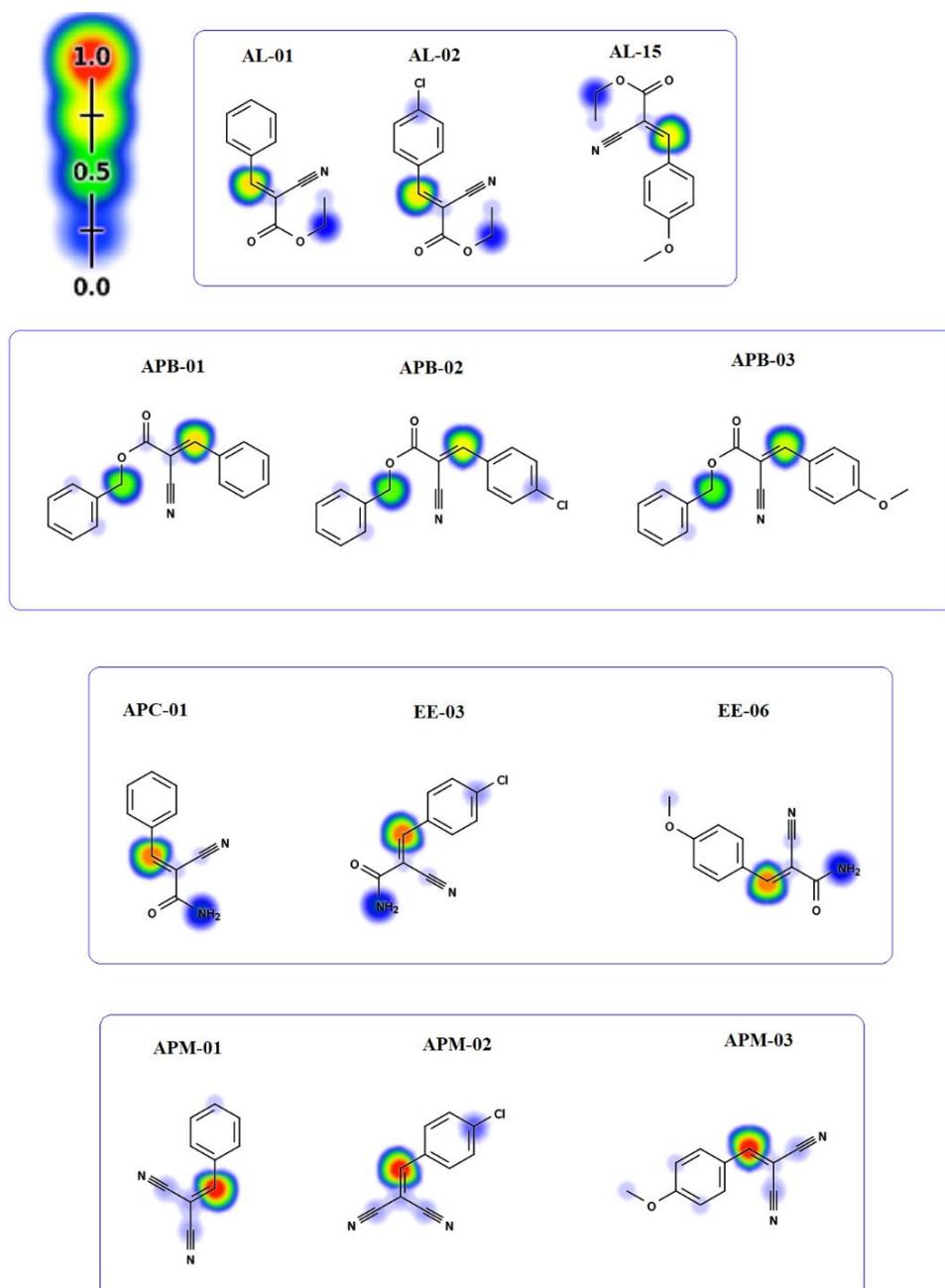
5.5.4.2.2 Adutos de glutatona (GSH)

As glutatona (GSH) transferases (GST) citosólicas e microssômicas fazem parte do metabolismo de fármacos e xenobióticos, estas são responsáveis pela catálise de substâncias contendo aminas aromáticas ou metade hidrazinas. A conjugação de glutatona possui um perfil de substratos que variam de epóxidos, óxidos de areno, grupos nitro e hidroxilaminas como por exemplo o paracetamol, ácido etacrínico e bromobenzeno (AL-SHAKLIAH et al., 2020).

A importância deste parâmetro farmacocinético vai além da destoxicação, o GSH está associado com o mecanismo de adição de Michael por causa da polaridade positiva do carbono β e da densidade eletrônica da ligação π (SCHWÖBEL et al., 2010). Os compostos sintetizados são objetivados como possíveis inibidores da β -lactamase por meio desta mesma reação, assim além dos resultados de *docking* molecular que indica a finalidade da molécula com o sítio ativo tem-se também seus *scores* de reatividade que indica quais moléculas tem maior tendência a formar adutos de Michael.

Na Figura 49 se encontram os *scores* de reatividade na insaturação dos compostos sintetizados para indicar a tendência destes em sofrerem ataque nucleofílico, servindo tanto para indicar a capacidade de serem metabolizados pela glutatona quanto para atuar como possíveis inibidores da β -lactamase.

Figura 49: *Score* de reatividade para formação de adutos de Glutaciona (GSH).



Fonte: Aatoria (2020).

Os resultados de GSH indicam que, para cada série a reatividade segue a ordem $\text{OCH}_3 < \text{Cl} < \text{H}$ não sendo esta numericamente significativa, ou seja, os substituintes não influenciam de forma efetiva na reatividade frente a formação de adutos de Michael. Entretanto, para indicar quais os melhores substituintes para as respectivas séries devem-se considerar os demais resultados principalmente interação com o sítio ativo, farmacocinética e toxicidade.

A ordem de séries que apresentaram melhores resultados de *score* de reatividade são APB<AL<APC<APM. Apesar de ser nítida a distância de *score* entre o APB e APM não se pode afirmar com precisão que o APM seria mais eficaz em inibir a β -lactamase, pois devem ser considerado os seus aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Pode-se ressaltar também que a formação de aduto de glutathione pode reduzir o efeito do composto como possível inibidor enzimático por competição da β -lactamase com o GSH, este efeito pode ser contornado pela utilização das moléculas para o uso tópico.

5.5.4.2.3 Adutos de proteína

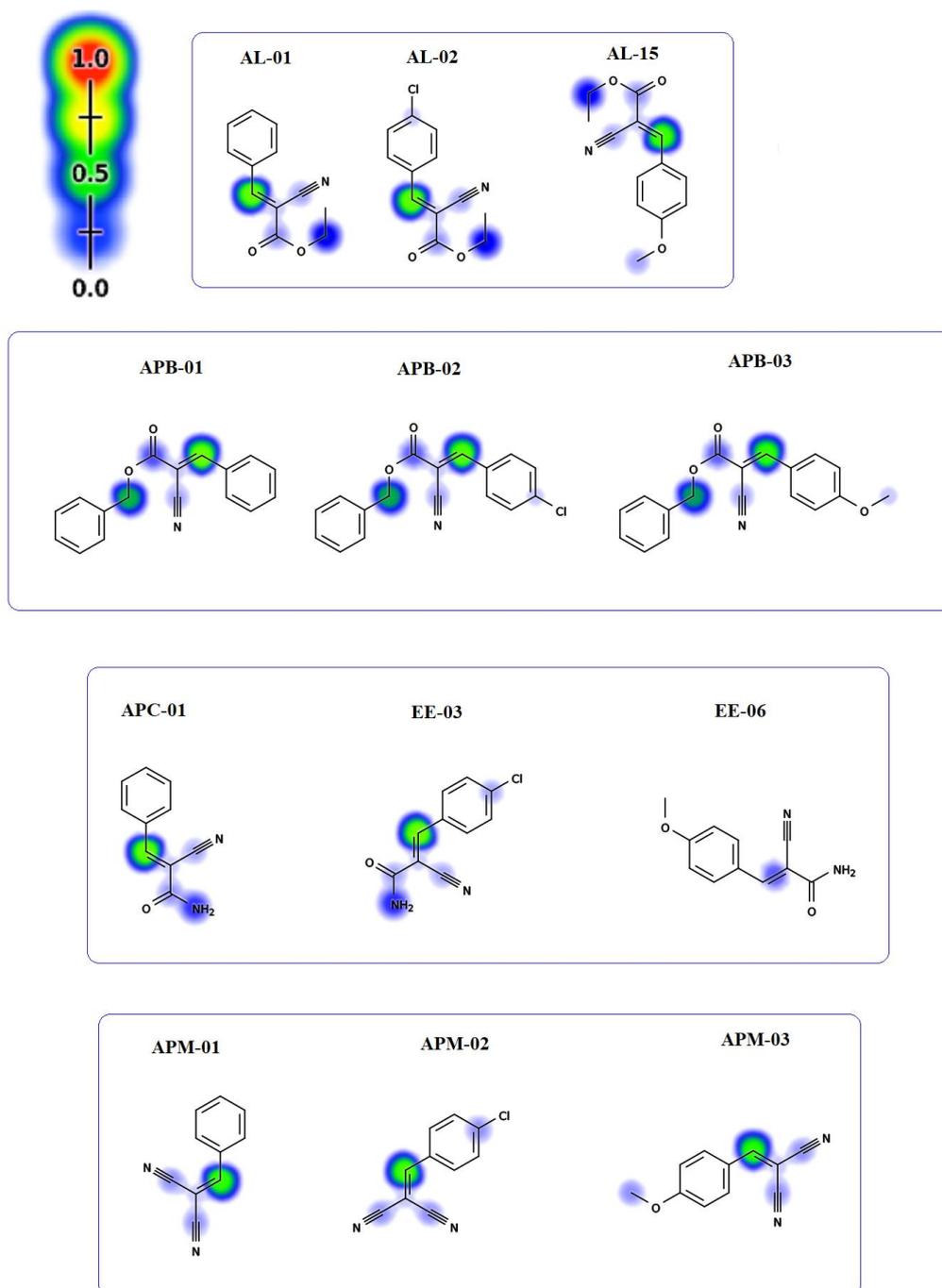
Quando se formam os adutos de proteína o organismo não tem capacidade de reparar esta alteração causada, para que ocorra a formação destas reações de adição de Michael os compostos envolvem ataque de um nucleófilo carregado à insaturação (HUGHES; SWAMIDASS, 2017). Na Figura 50 encontram-se os *scores* de reatividades e pontos em que podem ocorrer a formação dos adutos de proteína.

Com o intuito de ligar-se irreversivelmente às β -lactamases de forma a inativá-la, deixando as bactérias resistentes aos β -lactâmicos susceptíveis a ação desta classe de fármacos, as substâncias do presente estudo encontram neste parâmetro uma base para fortalecer argumentos relativos à sua utilização como adjuvantes.

Os pontos de reatividade das moléculas corroboram com sua capacidade de atuarem como aceptores de Michael assim como mencionado na Fase II de metabolização para a formação de adutos de glutathione (GSH), os compostos apresentam reatividade nos mesmos locais porém com diferentes intensidades. Apesar das possíveis metabolizações que podem ocorrer através desta reação, as moléculas podem ter maior afinidade com as β -lactamases e inibi-la antes do GSH ou a sua quantidade excedente (não metabolizada) inibe a enzima.

As insaturações apresentaram-se igualmente capazes de realizar a formação de adutos de proteínas com exceção do EE-06 (substituinte metoxila) que detém de um *score* mais baixo em relação aos demais. Outros pontos menos explicitados também são capazes da formação de adutos, entretanto podem ocorrer por outros tipos de reação.

Figura 50: Adutos de proteína.



Fonte: Aatoria (2020).

5.5.5 Toxicidade

A partir do admetSAR foram obtidos resultados relativos à toxicidade dos compostos sintetizados, foram avaliadas a carcinogenicidade binária e ternária, corrosão e irritação ocular, toxicidade oral aguda, mutagenicidade (teste Ames), inibição do hERG (do inglês, *human ether-a-go-go related gene*), hepatotoxicidade e eco-toxicidade.

Um dos parâmetros toxicológicos que demandam bastante atenção é a carcinogenicidade de compostos, devendo este ser previamente testados antes do pedido de aprovação de comercialização de produtos farmacêuticos e químicos (GUAN et al., 2019; LI et al., 2015).

Boa parte dos estudos de relação estrutura-atividade (QSAR) tem sido feitos para este parâmetro em que geralmente se trata da carcinogenicidade binária (classificação de duas classes) diferenciando-se apenas a probabilidade de ser ou não carcinogênico e ternária (classificação de três classes) em que considera-se uma possível carcinogenicidade de acordo com a dosagem (DI et al., 2019). Na Tabela 17 encontram-se as probabilidades de os compostos serem carcinogênicos binário ou ternário fornecidos pelo *software* admetSAR.

A carcinogenicidade ternária está relacionada com a quantidade da molécula por peso/dia do paciente. Se a dose for igual ou inferior a 10 mg.Kg^{-1} será considerada como perigoso ao organismo, para o caso de a dose ser superior a 50 mg.Kg^{-1} de peso corporal/dia considera-se que este composto é não carcinogênico (NATHAN et al., 2019).

Tabela 17: Carcinogenicidade binária e ternária.

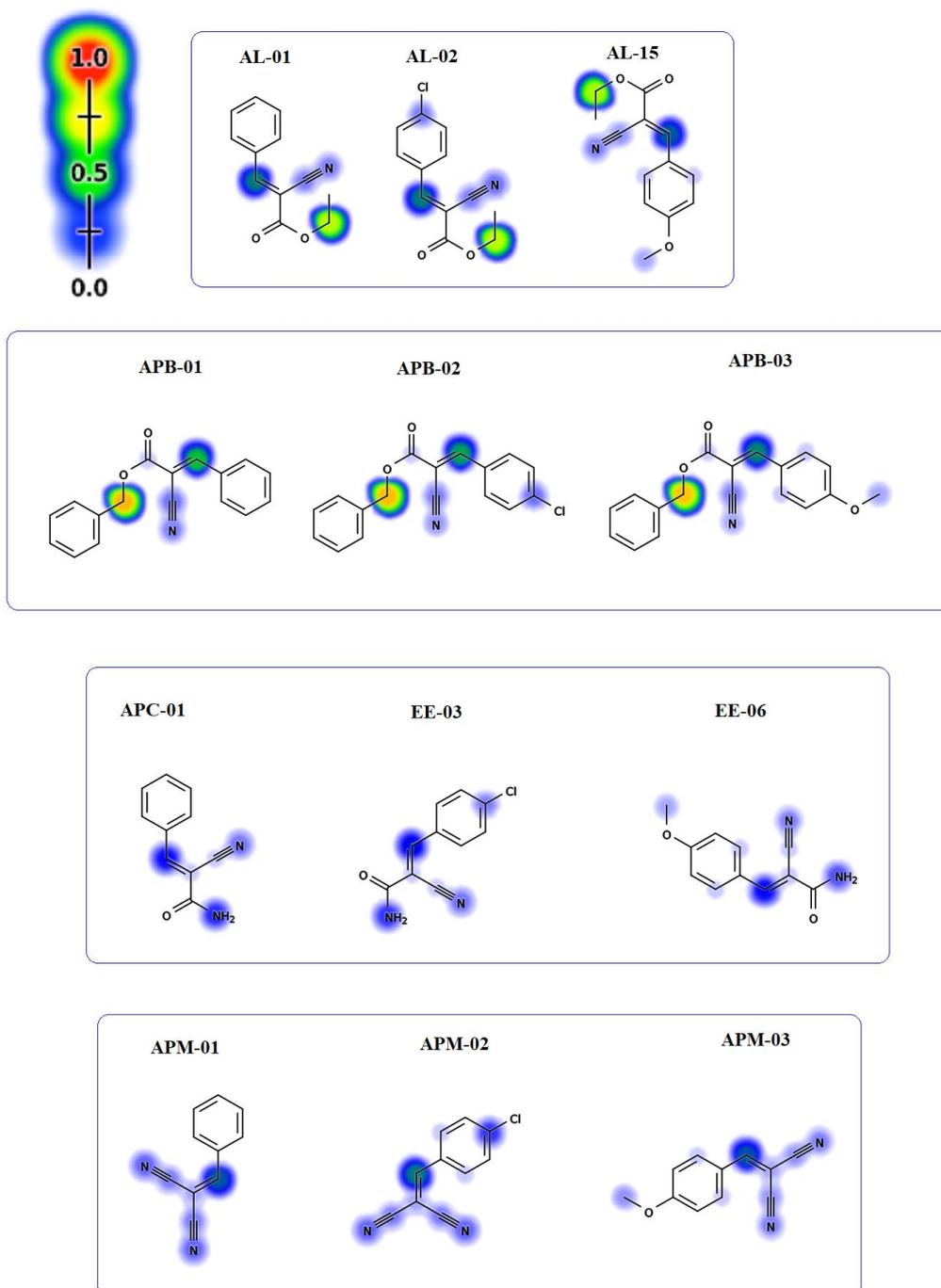
Código	Carcinogenicidade (binária)	Carcinogenicidade (ternária)
AL-01	-0,6874	0,6868
AL-02	-0,6589	0,6823
AL-15	-0,8034	0,6713
APB-01	-0,7017	0,7042
APB-02	-0,6731	0,7107
APB-03	-0,7891	0,6266
APC-01	-0,6874	0,5723
APM-01	0,5840	0,6295
APM-02	0,5697	0,6941
APM-03	0,5476	0,6095
EE-03	-0,6589	0,5837
EE-06	-0,7568	0,4436

Fonte: Autoria (2020).

A partir dos dados *in silico* obtidos para a carcinogenicidade binária, a maioria dos compostos apresentaram-se como possíveis não carcinogênicos apenas com a exceção da série APM com probabilidades de 0,5840; 0,5697; 0,5476 de serem carcinogênicos. Ademais, apontou-se que nenhum dos compostos pode ser considerado carcinógeno ternário a partir dos algoritmos fornecido ao banco de dados para as referidas substâncias em relação a sua estrutura.

Alguns compostos endógenos e principalmente exógenos são capazes de ligar-se covalentemente ao DNA formando adutos, que se não reparados podem provocar mutações (DELANNÉE et al., 2019). Assim, na Figura 51 encontram-se os possíveis locais em que podem ocorrer este tipo de reação de adição e seus *scores* de reatividade obtidos pela ferramenta XenoSite.

Figura 51: Adutos de DNA.



Fonte: Aatoria (2020).

A série APB é a que possui mais pontos em que podem ocorrer a formação de adutos de DNA, sendo principalmente situado entre o oxigênio da função éster e o anel aromático seguido da insaturação do grupo vinílico. A série AL apresentou *score* de reatividade pouco menos elevados em comparação aos APBs, porém localizam-se nos mesmos pontos. Os compostos apresentaram diferentes perfis frente a formação do aduto, isto pode ser justificado pela

presença de pontos eletrofílicos coincidentes com os locais de maior *score* e por o DNA se tratar de um bionucleófilo aumenta a reatividade. Por fim, as séries APC e APM apresentam os pontos de reatividade de *score* mais baixos que ocorrem principalmente na insaturação característica de ambos e no nitrogênio da função amida dos APCs.

Apesar de possuírem pontos com *score* de reatividade relativamente altos, de acordo com os demais estudos computacionais relativos à probabilidade mutações genicas obtidos pelo admetSAR os compostos não apresentam chances significativas de serem carcinogênicos. Assim, este parâmetro é um indicativo para auxiliar em mudanças nas estruturas para caso futuros *estudos in vitro* e/ou *in vivo* das substâncias apresentarem-se como carcinogênicos.

A avaliação da ocorrência de irritação e/ou corrosão ocular é um importante parâmetro a ser observado nas indústrias farmacêuticas e cosméticas para isso, sua predição *in silico* é necessária pois diversas substâncias são capazes de causar irritação ou corrosão dos olhos e derme incluindo-se produtos farmacêuticos oculares e dérmicos (YANG et al., 2018). Além disso, as análises anteriores indicaram uma boa tendência às moléculas poderem ser administradas por via tópica e ocular. Na Tabela 18 encontram-se os resultados *in silico* para a predição da capacidade de corrosão e irritação ocular dos compostos sintetizados.

Tabela 18: Corrosão e Irritação ocular.

	Corrosão ocular	Irritação Ocular
AL-01	-0,7849	0,9629
AL-02	-0,7172	0,758
AL-15	-0,9393	0,8698
APB-01	-0,9037	0,7651
APB-02	-0,7689	-0,5401
APB-03	-0,9729	-0,6965
APC-01	-0,8352	0,9463
APM-01	0,8909	0,9958
APM-02	0,8303	0,9886
APM-03	-0,6917	0,9917
EE-03	-0,8136	0,7834
EE-06	-0,9661	0,8468

Fonte: Aatoria (2020).

Os valores das probabilidades negativos são não corrosivos/irritantes oculares, considerando estes fatores apenas as moléculas APM-01 e APM-02 apresentaram-se como possíveis corrosivos oculares com chances de 0,8909 e 0,8303 na devida ordem. Estes apresentaram também capacidade de serem carcinogênicos binários, o que os torna toxicologicamente menos atraente do ponto de vista farmacocinético em detrimento dos demais apesar de possuir insaturação de elevado *score* de reatividade para reações de Michael.

Majoritariamente os compostos são oticamente irritáveis com exceção dos compostos APB-02 e APB-03 que apresentaram probabilidade de não irritação ocular de 0,5401 e 0,6965 respectivamente, e concomitantemente com os demais resultados pode ser utilizado para tratar infecções bacterianas resistente aos β -lactâmicos. Estas moléculas são aqui descritas como tendo alto *score* de reatividade na insaturação para reações de Michael, possuem energia livre de ligação (ΔG) e constante de inibição estimada favoráveis para a oxacilinase (4Y0U), ESBL (1IYO), metiltransferase 16S (3MTE) e traspeptidase (3MZE), além disso também podem ser

metabolizadas por hidrólise o que as torna interessante do ponto de vista farmacocinético, farmacodinâmico e toxicológico para os parâmetros até aqui analisados.

Outra forma de avaliar a toxicidade de uma substância é através da toxicidade oral aguda (TOA), sendo este caracterizado pela administração ou exposição do mesmo em uma única dose ou múltipla em 24 horas em que os efeitos adversos ocorridos neste espaço de tempo são analisados. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos classifica à TOA em quatro categorias distintas as quais diferem entre si de acordo com seu DL_{50} , a dose necessária para que uma substância mate 50% da população teste. Para a categoria I os valores são iguais ou inferiores a 50 mg.Kg^{-1} ; a II o DL_{50} situa-se entre 50 e 500 mg.Kg^{-1} ; a categoria III os entre 500 e 5000 mg.Kg^{-1} ; e por fim o IV os que obtiverem valores acima de 5000 mg.Kg^{-1} (OLIVEIRAL et al., 2018). A probabilidade de ocorrência e tipo da toxicidade oral aguda dos compostos sintetizados pôde ser predita pelo *software* admetSAR e estão dispostas na Tabela 19.

Tabela 19: Toxicidade oral aguda.

Código	Probabilidade	Tipo
AL-01	0,8235	III
AL-02	0,4817	III
AL-15	0,6707	III
APB-01	0,5788	III
APB-02	0,4526	II
APB-03	0,5805	III
APC-01	0,7413	III
APM-01	0,3442	III
APM-02	0,6447	II
APM-03	0,5780	II
EE-03	0,6009	III
EE-06	0,6516	III

Fonte: Autoria (2020).

De acordo com os resultados expostos na Tabela 19 para a toxicidade oral aguda, a maior parte das moléculas situaram-se na categoria III sendo assim, para estes seria necessárias doses elevadas para que traga resultados tóxicos para o organismo (PALMEIRA et al., 2019). Os que estão na categoria II como o APB-02, APM-02 e APM-03 apresentam uma maior toxicidade oral aguda em relação aos do tipo III.

O teste AMES identifica compostos que são possíveis causadoras da indução de mutações gênicas, esta avaliação se torna um componente essencial na avaliação de substâncias e proteção da saúde humana. As mutações causadas por agentes genotóxicos podem promover mutações em células somáticas e/ou germinativas podendo causar câncer, problemas de aprendizado, infertilidade entre outros. Na Tabela 20 podem ser encontradas as probabilidades dos compostos do presente estudo serem genotóxicos.

Tabela 20: Mutagenicidade (teste AMES), inibição do hERG (do inglês, *human ether-a-go-go related gene*), hepatotoxicidade.

Código	Mutagenicidade (AMES)	Inibição hERG	Hepatotoxicidade
AL-01	-0,81	-0,5000	-0,800
AL-02	-0,79	-0,4154	-0,575
AL-15	-0,85	0,7680	-0,550
APB-01	-0,79	0,6986	0,650
APB-02	-0,73	0,7548	0,575
APB-03	-0,76	0,8450	0,625
APC-01	-0,73	-0,6959	0,550
APM-01	-0,74	-0,6583	-0,650
APM-02	-0,80	-0,6597	-0,550
APM-03	-0,89	-0,4356	-0,575
EE-03	-0,73	-0,6621	-0,500
EE-06	-0,73	-0,5137	0,600

Fonte: Aatoria (2020).

De acordo com os resultados da Tabela 20 nenhum dos compostos apresentou capacidade *in silico* de mutagenicidade para o teste AMES implicando na não genotoxicidade dos mesmos em elevadas probabilidades que variaram de 0,73 a 0,85 para as substâncias analisadas.

A cardiotoxicidade, avaliada através da inibição do hERG, gene responsável pelo transporte de potássio no coração são vitais para a fase de repolarização do potencial de ação cardíaco. Ou seja, uma substância que iniba o hERG pode causar arritmias cardíacas, torsade de pointes e morte súbita. Este parâmetro é um dos motivos do qual muitos fármacos não passam da fase pré-clínica (ROMAN et al., 2019). Na Tabela 20 são encontradas as probabilidades de os compostos atuarem como possíveis inibidores do hERG.

Quatro dos doze compostos são possíveis inibidores do hERG sendo estes o AL-15 e a série APB, esta última que detinha boa parte dos melhores resultados *in silico* e de acordo com a avaliação do admetSAR seria um potencial cardiotoxíco podem ainda permanecer como possíveis fármacos pois a inibição dos canais de hERG são dependentes da concentração utilizada podendo não implicar em danos significativos na utilização destas quatro substâncias. Novos testes são necessários para avaliar a concentração necessária para que estes propiciem sua ação e se esta é capaz de inibir o referido canal.

Muitos medicamentos comerciais são capazes de induzir lesão hepática, que pode variar de um leve aumento nas concentrações de aminotransferases até insuficiência hepática fulminante. As lesões hepáticas medicamentosas estatisticamente representam 30% das hepatites agudas e 10% das reações adversas o que pode levar um fármaco a sair de circulação (JALILI-BALEH et al., 2017).

A previsão da hepatotoxicidade nos estágios pré-clínicos é difícil em decorrência da variabilidade de fatores que a influenciam como os genéticos e ambientais. Por conseguinte, a utilização de *softwares* para a identificação de um possível fármaco hepatotóxico é de alta necessidade. Entretanto, as dificuldades geradas nestes testes promovem falhas nas previsões geradas por um sistema de algoritmo pobre em dados, de forma a não construir um modelo preditivo de boa exatidão e precisão (RAGAB et al., 2019). Para efeito de conclusão das possíveis toxicidades dos compostos sintetizados, na Tabela 20 encontram-se as probabilidades de estes serem hepatotóxico.

Os resultados preditos pelo admetSAR indicaram que o APC-01, EE-03 e toda a série APB apresentaram-se como possíveis substâncias hepatotóxicas. Contudo, vale ressaltar que além de não existirem programas robustos o suficiente para predizer este critério também seria necessário averiguar o nível de lesão causada e concentração requerida para tal.

5.5.6 Eco-Toxicidade

Um fator importante e adicional quando se planeja novos fármacos é a eco-toxicidade, o termo refere-se ao estudo dos efeitos químicos no ecossistema e seus componentes. Ademais é um parâmetro legal da regulamentação de qualidade da água, efluentes e sedimentos que são instituídos pela Resolução Conama nº 344/04 e nº 357/05 (KRAMER; AZEVEDO, 2013). Os testes utilizados para este fim incluem os testes de toxicidade com organismos, os chamados bioensaios, em que são averiguados o grau de efeito biológico de uma substância desconhecida ou substância-teste (KAR; LESZCZYNSKI, 2020).

Na Tabela 21 são encontrados alguns resultados *in silico* da eco-toxicidade dos compostos sintetizados obtidos a partir do admetSAR. Os resultados preliminares de toxicidade em mel de abelha, biodegradação, toxicidade aquática de crustáceos e peixes, e a *Tetrahymena pyriformis* seguem o mesmo padrão de probabilidade em que os valores negativos indicam a não toxicidade para determinado critério.

Tabela 21: Eco-Toxicidade.

	Toxicidade em mel de abelha	Biodegradação	Toxicidade aquática de crustáceos	Toxicidade aquática de peixes	<i>Tetrahymena pyriformis</i> pIGC₅₀ (µg/L)
AL-01	0,7528	-0,525	-0,5255	0,9533	0,967
AL-02	0,7481	-0,800	0,6045	0,9871	0,728
AL-15	0,8627	0,550	-0,5100	0,9339	0,670
APB-01	0,7020	-0,675	-0,5355	0,9862	1,298
APB-02	0,7218	-0,650	0,6145	0,9960	1,423
APB-03	0,7563	-0,650	0,5100	0,9758	1,307
APC-01	-0,5761	-0,675	-0,6600	-0,3809	0,242
APM-01	0,7437	-0,600	0,6100	0,9350	0,939
APM-02	0,7858	-0,925	0,7500	0,9833	0,640
APM-03	0,8362	-0,675	0,6600	0,7746	0,596
EE-03	-0,6161	-0,825	0,5747	0,8653	0,153
EE-06	0,6218	-0,700	-0,5600	-0,5199	0,035

Fonte: Aatoria (2020)

A maioria dos compostos apresentou chances de serem tóxicos em mel de abelha com exceção do APC-01 e EE-03 que indicaram as respectivas probabilidades de 0,5761 e 0,6161. Suas chances biodegradação também não foram boas, apenas o AL-15 pôde ser considerado como biodegradável (0,550). A toxicidade aquática de crustáceos apresentou alguns possíveis não tóxicos como o AL-01, AL-15, APB-01, APC-01 e EE-06, entretanto quando considerada a de peixes as substâncias favoráveis são reduzidas ao APC-01 (-0,3809) e EE-06 (-0,5199)

sendo os demais altamente prováveis de serem tóxicos para estes. Os testes *in silico* de *Tetrahymena pyriformis* indicaram que a série APB são os que necessitam de maior concentração para causar a morte de 50% destes protozoários, sendo assim menos tóxicos que os demais, a série APC mostrou ser a mais tóxica neste parâmetro.

Apesar de os compostos sintetizados não serem ecologicamente favoráveis, vale ressaltar que com o descarte correto e tratamento adequado qualquer rejeito está sujeito a ser menos prejudicial ao planeta. Assim, estas toxicidades podem ser contornadas por estratégias de descarte, não oferecendo riscos à saúde dos animais e plantas.

5.6 Teste de hemólise

A exposição do organismo ao fármaco apresenta um potencial citotóxico a hemácias originando complicações oriundas do processo hemolítico que pode ocorrer por oxidação da hemoglobina, com defeitos intrínsecos dos eritrócitos de pacientes com deficiência de glicose ou doença de hemoglobina instável, hemólise imune, adsorção do fármaco ou proteína não imunológica e anemia hemolítica autoimune (MORGAN et al., 2019).

Com o intuito de avaliar a toxicidade preliminar das moléculas sintetizadas realizaram-se testes de atividade hemolítica. A concentração de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inicialmente utilizada, tida como relativamente alta, prediz a capacidade dos compostos de causarem lesão na membrana plasmática da célula, podendo esta ocorrer via formação de poros ou ruptura total (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ; TAVÁREZ; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, 2019). Na Tabela 22 podem ser observados os resultados obtidos para esta análise.

Tabela 22: Potencial hemolítico das moléculas de estudo.

Código	Potencial Hemolítico (%)
AL-01	2,259
AL-02	6,154
AL-15	6,727
APB-01	4,823
APB-02	48,015
APB-03	8,732
APM-01	6,679
APM-02	3,007
APM-03	2,924
EE-03	3,588
EE-06	4,452
Ácido Acético	100

Fonte: Aatoria (2020).

Do potencial hemolítico obtido para esta concentração apenas o APB-02 apresentou alta atividade, cerca de 48,015% de hemólise, ao apresentar valores superiores a 30% indica uma toxicidade elevada (GOUSKOV et al., 2019). Este grande potencial de dano aos eritrócitos, podem ter ocorrido por distúrbios da membrana em decorrência de interações com lipídios, proteínas e/ou carboidratos da superfície celular, facilitada pela lipofilicidade elevada. Os estudos de toxicidade *in silico* apontaram que esta molécula é um possível hepatotóxico podendo este elevado potencial hemolítico estar relacionado com esta característica.

Dos compostos analisados, as séries AL e APB obtiveram os valores mais elevados, sendo entre eles os de substituinte Hidrogênio de menor poder hemolítico. Quando comparados entre si o APB se sobressai indicando que o tamanho da molécula influencia os resultados. Além deste fator, tem-se em comum a função éster indicando que pode haver uma relação com as respostas.

Com exceção do APB-02, as demais apresentaram valores considerados baixos para esta análise (inferiores a 10%) indicando que não apresentaram potencial dano citotóxico frente às hemácias. Demais experimentos (inicialmente *in silico* e posterior *in vitro*) são necessários para averiguar a toxicidade preliminar.

5.7 Concentração Inibitória Mínima

Após realizadas as sínteses dos compostos bem como a caracterização de alguns deles e teste de hemólise os compostos de todas as séries puderam ser submetidos à avaliação antibacteriana frente às cepas de *Escherichia coli*, a fim de identificar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) presuntivas de cada composto. Os valores observados para as CIMs estão dispostos na Tabela 23.

Por se tratar de um microrganismo pertencente a classe das Gram-negativas as *Enterobacteriaceae* e, portanto, a *E. coli* fazem parte dos patógenos que possuem resistência a diversos antibióticos (LOOSE et al., 2019). Detentora de diversos mecanismos de resistência, esta bactéria está diretamente associada à produção de diferentes tipos de β -lactamases que sua descoberta pode ser efetuada em cepas de *E. coli* (KREWING et al., 2019).

Tabela 23: Concentração Inibitória Mínima dos compostos sintetizados frente à cepa de *E. coli*.

Composto testado	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
AL-01	>1024
AL-02	>1024
AL-15	>1024
APB-01	>1024
APB-02	>1024
APB-03	>1024
APC-01	>1024
APM-01	1024
APM-02	>1024
APM-03	1024
EE-03	>1024
EE-06	>1024
Cefazolina (Controle Positivo)	128

Fonte: Aatoria (2020).

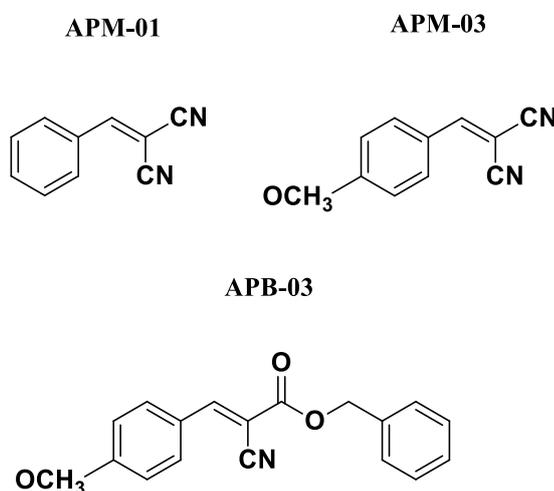
O valor indicado do controle positivo para o CIM, quando utilizado o antibiótico Cefazolina comercial apresentou-se como $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$. No controle negativo contendo DMSO (20%) e Tween20 (12%) não apresentou atividade para a cepa testada. Este antibiótico pertence à classe das cefalosporinas de primeira geração e sua utilização proporciona menor duração do tratamento em relação à pacientes tratados com Amoxicilina (HEROWATI et al., 2019).

Das moléculas apresentadas sua maioria não apresentou atividade na maior concentração testada sendo reproduzido os resultados obtidos para a *E. coli* ATCC 25922 ao qual o composto EE-06 foi submetido em prévios estudos realizados por Santos (2017), podendo estes terem ocorrido principalmente pela dificuldade em atravessar a parede celular bacteriana.

Contudo, os resultados obtidos indicam que para as moléculas APM-01 e APM-03 apresentaram inibição presuntiva bacteriana na concentração de $1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As estruturas destes compostos podem ser encontradas na Figura 52. De acordo com o observável estes são os de menor tamanho e peso molecular, diferenciando-se das demais séries como por exemplo a APB, indicando a possibilidade de atravessar as porinas presentes na parede celular das Gram-

negativas. Estas moléculas ainda possuem menores lipofilias, sugerindo melhor característica para ação desta classe de compostos.

Figura 52: Estrutura dos compostos com melhores resultados para a CIM da *E. coli*.



Fonte: Própria

O caráter eletrônico e hidrossolúvel dos compostos influencia na atividade biológica que de acordo com o método manual de Topliss as diferentes substituições na posição *para* do anel aromático interferem diretamente nos resultados. Seguindo o Esquema 3 da árvore de decisão de Topliss ao ser realizado o estudo da atividade com os compostos não substituídos e com 4-Cloro (equipotentes entre si), havendo o decaimento dos resultados para este último o passo seguinte seria utilizar a substituição 4-Metoxila. Este recurso pode ser utilizado pois relaciona-se a constante de hidrofobicidade (π) e a constante de Hammett (σ , efeito eletrônico) para os prováveis parâmetros ativos $\pi-2\sigma$ e $\pi-3\sigma$, ou seja, possíveis doadores de elétrons que ao serem acoplados a núcleos aromáticos aumentam a hidrofobicidade da molécula. Foram observadas que a inserção de um grupo metoxila sobre um anel β -lactâmico torna um antibiótico mais ativo contra microrganismos Gram negativos como a *E. coli* e patógenos anaeróbios (OLIVEIRA et al., 2009).

Os resultados obtidos para a CIM divergem dos resultados de *docking* molecular realizado para as moléculas, entretanto é válido ressaltar que o processo de docagem foi realizado utilizando a enzima a qual o estudo se destina não sendo atendidas, no caso do estudo *in silico*, as atividades antibacterianas visto que diversas barreiras são apresentadas aos antibióticos antes do contato com a β -lactamase.

A insaturação nos carbonos α e β em relação a carbonila implica em uma possível inibição da enzima β -lactamase por reação de adição de Michael, funcionando neste caso como aceptor. Esta inibição pode ser verificada em testes posteriores *in silico* (modelagem molecular) e *in vitro* (modulação). Para os compostos da série APM que obtiveram inibição na concentração de $1024 \mu\text{g.mL}^{-1}$ que são derivados da malonitrila, há estudos indicando que estes compostos que os contém apresentam-se como sendo promissores antibacterianos (ABDELMONIEM et al., 2019). É válido enfatizar que esta análise de CIM possui caráter meramente presuntivo sendo necessária a realização deste estudo seguindo outras técnicas e normas a fim de validar o mesmo além de testes adicionais com outros microrganismos.

Todos compostos preditos e sintetizados apresentaram-se em intervalos desejáveis para os critérios de *druglikeness*. A farmacodinâmica *in silico* testada por *docking* molecular para diferentes alvos indicaram uma boa energia livre de ligação quando comparado com o respectivo ligante co-cristalizado, neste ponto destaca-se a série APB. A toxicidade preliminar para eritrócitos humanos foi branda com exceção do APB-02, houve também um CIM favorável para o APM-1 e APM-3. As predições farmacocinéticas, toxicidade e eco-toxicidade apontaram para uma maior precaução nos testes para as séries principalmente a APB.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Visando contribuir para a busca de novos antibacterianos e adjuvantes no tratamento de infecções, doze compostos α , β -insaturados com diferentes substituintes puderam ser planejados e sintetizados, sendo destas sete inéditas. Para planejar os compostos, estudos *in silico* puderam ser realizados para predizer as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas destes. O *docking* molecular mostrou as possíveis interações com os resíduos de aminoácido dos alvos ESBL, Oxacilinase, PBP e 16S rRNA bem como as energias livre e constantes de inibição na maior parte dos casos mais favoráveis em relação ao composto co-cristalizado. Os resultados sugeriram valores favoráveis para os compostos sendo os melhores resultados apresentados pelos da série APB.

Dos doze compostos sintetizados foram realizadas espectroscopias de RMN ^1H e ^{13}C de cinco, que indicaram a presença de picos característicos de compostos vinílicos, validando a rota sintética destas moléculas.

As predições farmacocinéticas apontaram uma boa absorção dos compostos no organismo a partir de sua lipofilicidade, bem como há altas chances de permeação da BHE concomitantemente a AIH. Os compostos se apresentaram como não substratos do P-gp, o que é um bom indicativo de não excreção a partir da bomba de efluxo pelas bactérias. Os resultados de Log Kp indicaram que os compostos possuem baixa permeação e, portanto, poderiam ser utilizados para tratamento infeccioso ocular e tópico, principalmente a série APB que de acordo com a sua BOH não seriam indicados para administração via oral. A distribuição *in silico* dos compostos indicou que estes precisam ser adjuvantes de β -lactâmicos com forte LPP como por exemplo a cefazolina.

Para os estudos *in silico* de toxicidade, os APMs mostraram-se capazes de serem carcinogênicos binários e para nenhum deles houve probabilidade de atuarem como carcinógenos ternários. Houve a tendência de os compostos formarem adutos de DNA mais elevada para os APBs, seguido dos ALs, APMs e APCs. A maioria dos compostos apresentou-se como oticamente irritáveis com exceção dos APBs, corroborando com a ideia de sua utilização para o uso ocular. Ao avaliar a toxicidade oral aguda boa parte das moléculas apresentou-se como possíveis não tóxicos, o APB-02, APM-02 e APM-03 foram classificados como Tipo II enquanto os demais são de Tipo III. Os compostos são não mutagênicos (AMES), e com exceção do AL-15 e APB não inibem o hERG, em sua maioria não são hepatotóxicas. A eco-toxicidade indicou que deve haver um melhor cuidado e manuseio para o descarte destas substâncias.

Os testes de hemólise para as moléculas indicaram uma baixa toxicidade aos eritrócitos humanos *in vitro* para a maior parte dos compostos sintetizados, sendo elevada apenas para a molécula APB-02, estes dados corroboram os testes de toxicidade *in silico*. O ensaio presuntivo de CIM indicou o APM-01 e APM-03 como inibidores na maior concentração analisada de modo a inferir um possível efeito modulador quando aplicado com um β -lactâmico.

A série APB foi a mais promissora para o estudo em questão, enfatizando-se o de substituinte halogenado, os resultados apresentados indicaram que pode haver uma melhor resposta deste para o uso tópico e principalmente ocular devido sua permeação, lipofilicidade, toxicidade e não corrosão ou irritação ocular. Estudos posteriores poderão ser realizados para avaliar a capacidade moduladora bem como o sinergismo de todos os compostos frente a cepas produtoras de β -lactamase.

Apesar dos resultados da avaliação da atividade antimicrobiana não terem sido expressivos, até o presente momento não foi possível investigar a capacidade de reversão de resistência microbiana. Portanto, não se pode descartar a possibilidade das moléculas sintetizadas atuarem sobre β -lactamases como indicado nos estudos de *docking* molecular.

PERSPECTIVAS

- a) Finalizar a caracterização estrutural por meio das Espectroscopias de RMN ^1H e ^{13}C para as demais moléculas bem como, Infra Vermelho (IV) e massas;
- b) Avaliar CIM dos compostos frente a diferentes cepas resistente aos antibióticos β -lactâmicos;
- c) Para os compostos que apresentarem inibição realizar o *Checkerboard*;
- d) Testar a modulação frente às cepas anteriormente testadas para todos os compostos;
- e) Publicar artigos científicos.
- f) Continuidade da pesquisa

REFERÊNCIAS

- ABDELMONIEM, Amr M. et al. 2-Cyano-N-(thiophen-2-yl) acetamide in Heterocyclic Synthesis: Synthesis and Antibacterial Screening of Novel Pyrido [1, 2-a] thieno [3, 2-e] pyrimidine-2-carboxylate Moieties. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 2637-2643, 2019.
- ABDI, Milad; MIRKALANTARI, Shiva; AMIRMOZAFARI, Nour. Bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Journal of Peptide Science**, v. 25, n. 11, p. e3210, 2019.
- AGHAMALI, Mina et al. Carbapenemase inhibitors. Reviews in **Medical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 104-113, 2017.
- AGRAWAL, Piyush et al. Benchmarking of different molecular docking methods for protein-peptide docking. **BMC bioinformatics**, v. 19, n. 13, p. 426, 2019.
- AKBAR, Ghulam et al. Mahpara qamar, Mohsin Raza and Shahneela Nusrat. Review on- Genome editing tool to combat with multidrug resistant bacteria: Challenges and future perspectives. **Pure and Applied Biology**. Vol. 9, Issue 4, pp2441-2455. 2020.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. The Shape and Structure of Proteins. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: **Garland Science**; 2002.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26>)
- ALI, J., CAMILLERI, P., BROWN, M. B., HUTT, A. J. & KIRTON, S. B. **Revisiting the general solubility equation:** in silico prediction of aqueous solubility incorporating the effect of topographical polar surface area. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 420–428, 2012.
- ALMEIDA, Ana Rita et al. The impact of antibiotic exposure in water and zebrafish gut microbiomes: A 16S rRNA gene-based metagenomic analysis. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 186, p. 109771, 2019.
- AL-SHAKLIAH, Nasser S. et al. Identification and characterization of in silico, in vivo, in vitro, and reactive metabolites of infigratinib using LC-ITMS: bioactivation pathway elucidation and in silico toxicity studies of its metabolites. **RSC Advances**, v. 10, n. 28, p. 16231-16244, 2020.

- ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, Francisco Javier et al. Antimicrobial capacity of plant polyphenols against gram-positive bacteria: A comprehensive review. **Current Medicinal Chemistry**, 2019.
- AMARAL, Antonia Tavares do et al. MEDICINAL CHEMISTRY PROGRESS IN BRAZIL: ADVANCES IN THE 40 YEARS OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 694-700, 2017.
- AMARANTE, Jarbas Freitas et al. ANTIMICROBIAL DRUGS RESISTANCE OF BACTERIA FROM CARP (*Cyprinus Carpio*) RAISED IN A SEMI-INTENSIVE SYSTEM. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, 2018.
- AMINI, Akram; NAMVAR, Amirmorteza Ebrahimzadeh. Antimicrobial Resistance Pattern and Presence of Beta-Lactamase Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Hospitalized Patients, Babol-Iran. **Journal of Medical Bacteriology**, v. 8, n. 1, 2), p. 45-50, 2019.
- AMMETER, Derek et al. Development of a nebramine-cyclam conjugate as an antibacterial adjuvant to potentiate β -lactam antibiotics against multidrug-resistant *P. aeruginosa*. **The Journal of antibiotics**, v. 72, n. 11, p. 816-826, 2019.
- ANDRADE, E. L. et al. Non-clinical studies in the process of new drug development-Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 49, n. 12, 2016.
- ANDRADE, Leonardo Neves; DARINI, Ana Lúcia Costa. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse. **Journal of Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 16-25, 2017.
- ARBITRIO, Mariamena et al. Pharmacogenomic Profiling of ADME Gene Variants: Current Challenges and Validation Perspectives. **High-throughput**, v. 7, n. 4, p. 40, 2018.
- ARJOMANDI, Omid Khalili; KAVOOSI, Mahboubeh; ADIBI, Hadi. Synthesis and investigation of inhibitory activities of imidazole derivatives against the metallo- β -lactamase IMP-1. **Bioorganic Chemistry**, v. 92, p. 103277, 2019.
- ATTIA, Mohamed H. et al. Synthesis and in-vitro anti-proliferative evaluation of some pyrazolo [1, 5-a] pyrimidines as novel larotrectinib analogs. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, p. 103458, 2020.

AVDEEF, Alex; KANSY, Manfred. Can small drugs predict the intrinsic aqueous solubility of 'beyond Rule of 5' big drugs?. **ADMET and DMPK**, v. 8, n. 3, p. 180-206, 2020.

AWOONOR-WILLIAMS, Ernest; WALSH, Andrew G.; ROWLEY, Christopher N. Modeling covalent-modifier drugs. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 11, p. 1664-1675, 2017.

BARBOSA, Victor Lucas de Holanda et al. O uso da drogabilidade no desenvolvimento de medicamentos específicos: revisão de literatura. 2017.

BAYLAY, Alison J.; PIDDOCK, Laura JV; WEBBER, Mark A. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance—Part I. **Bacterial Resistance to Antibiotics—From Molecules to Man**, p. 1-26, 2019.

BEZERRA, W. G. A. et al. Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. **Archivos de zootecnia**, v. 66, n. 254, p. 301-307, 2017.

BIAGI, M. et al. Exploring Aztreonam in Combination with Ceftazidime-Avibactam or Meropenem-Vaborbactam as Potential Treatments for Metallo- and Serine- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 12, 2019.

BLUM, Claudine Angela et al. Adjunct prednisone therapy for patients with community-acquired pneumonia: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 385, n. 9977, p. 1511-1518, 2015.

BOGOMOLNAYA, L. M. et al. Linearized Siderophore Products Secreted via MacAB Efflux Pump Protect *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium from Oxidative Stress. **mBio**, v. 11, n. 3, 2020.

BOLLA, Jani Reddy et al. Assembly and regulation of the chlorhexidine-specific efflux pump AceI. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 29, p. 17011-17018, 2020.

BONNOT, Lea et al. Divinylglycol, a Glycerol-Based Monomer: Valorization, Properties, and Applications. In: *Green Polymer Chemistry: New Products, Processes, and Applications*. **American Chemical Society**, 2018. p. 299-330.

BRADDOCK, Alexander A.; THEODORAKIS, Emmanuel A. Marine Spirotetronates: Biosynthetic Edifices That Inspire Drug Discovery. **Marine drugs**, v. 17, n. 4, p. 232, 2019.

BRAZ, Cyntia de Lima et al. Medicamentos com atividade sobre o citocromo P450 utilizados por idosos em domicílio. 2018.

BRINK, Adrian J. et al. From guidelines to practice: a pharmacist-driven prospective audit and feedback improvement model for peri-operative antibiotic prophylaxis in 34 South African hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 1227-1234, 2017.

BURNS, Christopher J. et al. **Beta-lactamase inhibitors**. U.S. Patent Application n. 10/125,152, 13 nov. 2018.

CAHILL, Samuel T. et al. Studies on the inhibition of AmpC and other β -lactamases by cyclic boronates. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1863, n. 4, p. 742-748, 2019.

CARO, Raffaele Dante Caposiena et al. Clindamycin versus clindamycin plus rifampicin in hidradenitis suppurativa treatment: Clinical and ultrasound observations. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 5, p. 1314-1321, 2019.

CARVALHO, Camila Braatz et al. Avaliação de sinergismo entre bacteriocina e antibióticos beta-lactamicos para enterobacterias pela técnica de checkerboard. **Clinical and biomedical research**. Porto Alegre, 2015.

CARVALHO, Camila Braatz et al. Avaliação de sinergismo entre bacteriocina e antibióticos beta-lactamicos para enterobacterias pela técnica de checkerboard. **Clinical and biomedical research**. Porto Alegre, 2015.

CASTANHEIRA, Sónia et al. An alternative penicillin-binding protein involved in Salmonella relapses following ceftriaxone therapy. **EBioMedicine**, v. 55, p. 102771, 2020.

CATÃO, Raissa Mayer Ramalho et al. Infecções por Acinetobacter spp. Um oportunista nosocomial multirresistente. **Tópicos em Ciências da Saúde Volume 3**, p. 27.

CHANG, Tein-Yao et al. In vitro activities of imipenem, vancomycin, and rifampicin against clinical Elizabethkingia species producing BlaB and GOB metallo-beta-lactamases. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 38, n. 11, p. 2045-2052, 2019.

CHAUDHARY, Kamal Kumar; MISHRA, Nidhi. A review on molecular docking: novel tool for drug discovery. **databases**, v. 3, n. 4, 2016.

- CHEN, Chunyang et al. Capillary Electrophoresis-Based Enzyme Assays for β -Lactamase Enzymes. **Electrophoresis**, 2019.
- CHILINGARYAN, Zorik et al. Fragment-based discovery of inhibitors of the bacterial DnaG-SSB interaction. **Antibiotics**, v. 7, n. 1, p. 14, 2018.
- CINAR, Gule et al. Carbapenemase-Producing Bacterial Infections in Patients with Liver Transplant. In: **Transplantation proceedings**. Elsevier, 2019. p. 2461-2465.
- CLEMENTINO, Leandro Costa et al. BIOPROSPECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DA CAATINGA. **Evidência**, v. 15, n. 1, 2015.
- COLSON, Philippe et al. A metallo-beta-lactamase with both beta-lactamase and ribonuclease activity is linked with traduction in giant viruses. **BioRxiv**, p. 819797, 2019.
- COUTINHO, Elita Rosa de Souza et al. Infecções do trato urinário: etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana em pacientes não hospitalizados. **REVISTA UNINGÁ**, v. 56, n. 3, p. 68-79, 2019.
- CRUSCO, Alessandra et al. Antischistosomal Properties of Sclareol and Its Heck-Coupled Derivatives: Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Untargeted Metabolomics. **ACS infectious diseases**, v. 5, n. 7, p. 1188-1199, 2019.
- CUI, Tiantian et al. Piperine is a Mechanism-based inactivator of CYP3A. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 48, n. 2, p. 123-134, 2020.
- DA SILVA, Francisco Ivan. Explorando a Química Computacional. **Simplissimo Livros Ltda**, 2019.
- DANG, Na Le et al. The Metabolic Rainbow: Deep Learning Phase I Metabolism in Five Colors. **Journal of chemical information and modeling**, v. 60, n. 3, p. 1146-1164, 2020.
- DELANNÉE, Victorien et al. In silico prediction of Heterocyclic Aromatic Amines metabolism susceptible to form DNA adducts in humans. **Toxicology Letters**, v. 300, p. 18-30, 2019.
- DELIGIA, Francesco et al. Design of novel 3, 6-diazabicyclo [3.1. 1] heptane derivatives with potent and selective affinities for $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 103, p. 429-437, 2015.

- DESAI, Priti et al. Immunoinformatic Identification of Potential Epitopes. In: Immunoinformatics. **Humana**, New York, NY, 2020. p. 265-275.
- DI, Peiwen et al. Prediction of the skin sensitising potential and potency of compounds via mechanism-based binary and ternary classification models. **Toxicology in Vitro**, v. 59, p. 204-214, 2019.
- DINIZ, Alena Mileo Monteiro; SANTOS, Rose Mary Corrêa. Escherichia coli e Klebsiella spp. ESBL em Hospital Universitário, na cidade de Manaus, AM. **Rev. epidemiol. controle infecç**, p. 129-133, 2019.
- DOKI, Kosuke et al. Involvement of Renal Efflux Transporter MATE1 in Renal Excretion of Flecainide. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 7, p. 1226-1229, 2019.
- DOLABELA, Maria Fâni et al. Estudo in silico das atividades de triterpenos e iridoides isolados de Himatanthus articulatus (Vahl) Woodson. 2018.
- DOMALAON, Ronald et al. Antibiotic hybrids: the next generation of agents and adjuvants against gram-negative pathogens?. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 2, p. e00077-17, 2018.
- DOU, Mengmeng, et al. Photocatalytic difference of amoxicillin and cefotaxime under visible light by mesoporous g-C₃N₄: Mechanism, degradation pathway and DFT calculation. **Chemical Engineering Journal**, 2020, 383: 123134.
- DOUAFER, Hana et al. Antibiotic adjuvants: make antibiotics great again!. **Journal of medicinal chemistry**, v. 62, n. 19, p. 8665-8681, 2019.
- DROZDZIK, Marek et al. Protein abundance of clinically relevant drug transporters in the human liver and intestine: a comparative analysis in paired tissue specimens. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 105, n. 5, p. 1204-1212, 2019.
- DUARTE, Suzane Meriely da Silva et al. Revisão Sistemática da Resistência e Farmacodinâmica de Antibióticos/Systematic Review of Resistance and Pharmacodynamics of Antibiotics. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 21476-21489, 2019.
- EKICI, Özlem Doğan et al. Design, synthesis, and evaluation of aza-peptide Michael acceptors as selective and potent inhibitors of caspases-2,-3,-6,-7,-8,-9, and-10. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 19, p. 5728-5749, 2006.

- ELIWA, Essam M. et al. New naturally occurring phenolic derivatives from marine *Nocardioopsis* sp. AS23C: Structural elucidation and in silico computational studies. **Vietnam Journal of Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 164-174, 2019.
- EMYINUMARU, Fernanda et al. Profile and appropriate use of antibiotics among children in a general hospital in southern Brazil. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 37, n. 1, p. 27-33, 2019.
- ESAKI, Tsuyoshi et al. Constructing an In Silico Three-Class Predictor of Human Intestinal Absorption With Caco-2 Permeability and Dried-DMSO Solubility. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 108, n. 11, p. 3630-3639, 2019.
- ESLAHI, Niloofar et al. Processing and properties of nanofibrous bacterial cellulose-containing polymer composites: a review of recent advances for biomedical applications. **Polymer Reviews**, v. 60, n. 1, p. 144-170, 2020.
- FAGERSTRÖM, Anna et al. Comparative distribution of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from urine infections and environmental waters. **PloS one**, v. 14, n. 11, 2019.
- FALCÓN-CANO, Gabriela; MOLINA, Christophe; CABRERA-PÉREZ, Miguel Angel. ADME Prediction with KNIME: Development and Validation of a Publicly Available Workflow for the Prediction of Human Oral Bioavailability. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2020.
- FARASYN, Taleah et al. Preincubation with everolimus and sirolimus reduces organic anion-transporting polypeptide (OATP) 1B1-and 1B3-mediated transport independently of mTOR kinase inhibition: implication in assessing OATP1B1-and OATP1B3-mediated drug-drug interactions. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 108, n. 10, p. 3443-3456, 2019.
- FARIAS, Cayque de Souza. Atividade antimicrobiana de derivados n-acilidrazônicos e fenilacritatos. Trabalho de Conclusão de Curso. **Universidade Estadual da Paraíba**. 2018.
- FELIU, Lidia; PLANAS, Marta. Pèptids terapèutics comercialitzats en el nostre país. **Revista de la Societat Catalana de Química**, n. 17, p. 7-16, 2018.
- FERREIRA, L. G.; DOS SANTOS, R. N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, Basel, v. 20, p. 13384-13421, 2015.

FISK, Lilia; GREENE, Nigel; NAVEN, Russ. Physicochemical properties and structural alerts. In: Drug-Induced Liver Toxicity. **Humana**, New York, NY, 2018. p. 61-76.

FLEMING, Ingrid. The pharmacology of the cytochrome P450 epoxygenase/soluble epoxide hydrolase axis in the vasculature and cardiovascular disease. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 4, p. 1106-1140, 2014.

FLYNN, Noah et al. XenoNet: Inference and Likelihood of Intermediate Metabolite Formation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2020.

FOTOUHI, Lida et al. Electrochemically Induced Michael Addition Reaction: An Overview. **The Chemical Record**, v. 18, n. 11, p. 1633-1657, 2018.

FRANCO, J. M. P. L. et al. O papel do farmacêutico frente à resistência bacteriana ocasionada pelo uso irracional de antimicrobianos. **Semana Acadêmica Revista Científica**, v. 1, n. 72, p. 1-17, 2015.

FREITAS, Cicero LA et al. Enhancement of antibiotic activity by phytochemicals of *Turnera subulata*. **Natural product research**, p. 1-5, 2019.

FU, Yi; MEI, Juan; ZHAO, Ji. Probing molecular docking problem by an improved quantum-behaved particle swarm optimization algorithm. **Journal of Algorithms & Computational Technology**, v. 13, p. 1748302619881121, 2019.

FUJITA, Daichi et al. Organic anion transporting polypeptide (OATP) 2B1 contributes to gastrointestinal toxicity of anticancer drug SN-38, active metabolite of irinotecan hydrochloride. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 44, n. 1, p. 1-7, 2016.

GARCIA, Ana Carolina Hortencio; SANTOS, Vanessa Iris De Medeiros; QUEIROZ, Paulo Roberto. SELEÇÃO DE ATIVOS BIOLÓGICOS DE *Bacillus thuringiensis* COM POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE MICRORGANISMOS. Programa de Iniciação Científica-PIC/UniCEUB-Relatórios de Pesquisa, n. 1, 2018.

GHARBI, Myriam et al. Antibiotic management of urinary tract infection in elderly patients in primary care and its association with bloodstream infections and all cause mortality: population based cohort study. **bmj**, v. 364, 2019.

GHOSH, Subir et al. Performance analysis of grafted poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on additively manufactured titanium substrate for hip implant

applications. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 100, p. 103412, 2019.

GONZALES, Edgar et al. β -lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en el Instituto Nacional de Salud del Niño-Breña, Lima, Perú. **Revista Medica Herediana**, v. 30, n. 4, p. 242-248, 2019.

GOUSKOV, A. et al. Investigation of the influence of centrifugal pump wet part geometry on hemolysis index. In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. 2019. p. 012013.

GRIMSEY, Elizabeth M.; PIDDOCK, Laura JV. Do phenothiazines possess antimicrobial and efflux inhibitory properties?. **FEMS Microbiology Reviews**, 2019.

GRISI, Marco, et al. A single-chip integrated transceiver for high field NMR magnetometry. **Review of Scientific Instruments**, 2019, 90.1: 015001.

GUAN, Longfei et al. ADMET-score—a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. **Medchemcomm**, v. 10, n. 1, p. 148-157, 2019.

GUO, Chao et al. Biocatalytic asymmetric Michael additions of nitromethane to α , β -unsaturated aldehydes via enzyme-bound iminium ion intermediates. **ACS catalysis**, v. 9, n. 5, p. 4369-4373, 2019.

GUZZI, A. F. et al. In silico prediction of the functional and structural consequences of the non-synonymous single nucleotide polymorphism A122V in bovine CXCR2 chemokine receptor type 1. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 1, p. 39-46, 2020.

HAYAKAWA, Ichiro et al. Structure-activity relationship study of gatastatin based on the TOPLISS tree approach. **Heterocycles**, p. 238-247, 2019.

HAYASHI, Shotaro et al. Synthesis of network polymer emitters: tunable detection of chemicals by geometric design. **Polymer Journal**, v. 51, n. 10, p. 1055-1061, 2019.

HEROWATI, Rina, et al. Analisis efektivitas biaya terapi penggunaan antibiotik profilaksis cefazoline dan amoxicillin pada kasus bedah sesar di rsud jombang tahun 2017. **Jurnal Wiyata: Penelitian Sains dan Kesehatan**, 2019, 6.1: 40-53.

HIRVONEN, Viivi HA et al. An efficient computational assay for β -lactam antibiotic breakdown by class A β -lactamases. **Journal of chemical information and modeling**, v. 59, n. 8, p. 3365-3369, 2019.

HIRVONEN, Viivi HA et al. An efficient computational assay for β -lactam antibiotic breakdown by class A β -lactamases. **Journal of chemical information and modeling**, v. 59, n. 8, p. 3365-3369, 2019.

HO, Dawn Ching Wen et al. A review of the role of intravitreal corticosteroids as an adjuvant to antibiotics in infectious endophthalmitis. **Ocular immunology and inflammation**, v. 26, n. 3, p. 461-468, 2018.

HO, Stephanie et al. Recognizing and Overcoming Resistance to New Beta-Lactam/Beta-Lactamase Inhibitor Combinations. **Current infectious disease reports**, v. 21, n. 10, p. 39, 2019.

HOSSEINGHOLI, Elaheh Zadeh et al. In silico identification and characterization of antineoplastic asparaginase enzyme from endophytic bacteria. **IUBMB life**, v. 72, n. 5, p. 991-1000, 2020.

HRIDYA, Valiamadapally M.; HYNES, James T.; MUKHERJEE, Arnab. Dynamical Recrossing in the Intercalation Process of the Anticancer Agent Proflavine into DNA. **The Journal of Physical Chemistry B**, 2019.

HU, Ye; STUMPFE, Dagmar; BAJORATH, Jürgen. Recent advances in scaffold hopping: miniperspective. **Journal of medicinal chemistry**, v. 60, n. 4, p. 1238-1246, 2016.

HUGHES, Tyler B.; SWAMIDASS, S. Joshua. Deep learning to predict the formation of quinone species in drug metabolism. **Chemical research in toxicology**, v. 30, n. 2, p. 642-656, 2017.

IMAI, Kazuo et al. Endogenous endophthalmitis secondary to septic arthritis caused by group A Streptococcus infection: A case report and literature review. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 26, n. 1, p. 128-131, 2020.

JACKSON, Paul A. et al. Covalent modifiers: A chemical perspective on the reactivity of α , β -unsaturated carbonyls with thiols via hetero-Michael addition reactions. **Journal of medicinal chemistry**, v. 60, n. 3, p. 839-885, 2017.

JAHN, Carolina et al. Caracterização dos Genes de metalo-beta-lactamase blaNDM, blaSPM e blaIMP em *Pseudomonas aeruginosa* Resistentes a Carbapenems. **Journal of Epidemiology and Infection Control**, v. 1, n. 1, p. 165-177, 2016.

JALILI-BALEH, Leili et al. New racemic annulated pyrazolo [1, 2-b] phthalazines as tacrine-like AChE inhibitors with potential use in Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 139, p. 280-289, 2017.

JELINKOVA, Pavlina et al. Nanoparticle-drug conjugates treating bacterial infections. **Journal of Controlled Release**, 2019.

JIA, Wei; XIE, Guoxiang; JIA, Weiping. Bile acid–microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 15, n. 2, p. 111, 2018.

JIN, Stanley, et al. Rational discovery of a highly novel and selective mTOR inhibitor. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, 2019, 29.21: 126659.

JING, Lanlan et al. Contemporary medicinal-chemistry strategies for the discovery of selective butyrylcholinesterase inhibitors. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 2, p. 629-635, 2019.

KALE, Kishor B.; OTTOOR, Divya P. Comprehensive analysis of the atenolol–DNA complex by viscometric, molecular docking and spectroscopic techniques. **Luminescence**, v. 34, n. 1, p. 39-47, 2019.

KALEKO, Michael; CONNELLY, Sheila. CARBAPENEMASES FOR USE WITH ANTIBIOTICS FOR THE PROTECTION OF THE INTESTINAL MICROBIOME. U.S. Patent Application n. 16/720,999, 16 jul. 2020.

KAR, Supratik; LESZCZYNSKI, Jerzy. Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. **Expert Opinion on Drug Discovery**, p. 1-15, 2020.

KÄRPÄNOJA, Pauliina et al. Antimicrobial resistance in the major respiratory tract pathogens: methods and epidemiology. *Dissertationes schola doctoralis scientiae circumiectalis alimentariae, biologicae*. Universitatis Helsinkiensis, 2017.

KAUSHIK, Aditi et al. Recent review on subclass B1 metallo- β -lactamases inhibitors: sword for antimicrobial resistance. **Current drug targets**, v. 20, n. 7, p. 756-762, 2019.

KEIJ, Fleur M. et al. Oral antibiotics for neonatal infections: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 11, p. 3150-3161, 2019.

KHANAL, P. et al. In silico docking study of limonoids from *Azadirachta indica* with pfpk5: A novel target for *Plasmodium falciparum*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, n. 2, p. 326-332, 2019.

KIM, Younchang et al. Structural and Biochemical Analysis of the Metallo Beta-Lactamase L1 from Emerging Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* revealed the subtle but distinct di-metal scaffold for catalytic activity. **Protein Science**, 2019.

Klotz, U. Pathophysiological and Disease-Induced Changes in Drug Distribution Volume: Pharmacokinetic Implications. **Clin-Pharmacokinet** 1, 204–218 (1976).

<https://doi.org/10.2165/00003088-197601030-00003>

KONDO, Jiro; KOGANEI, Mai. Structural Bases for the Fitness Cost of the Antibiotic-Resistance and Lethal Mutations at Position 1408 of 16S rRNA. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 159, 2020.

KRAJNC, Alen et al. Bicyclic boronate VNRX-5133 inhibits metallo- and serine- β -lactamases. **Journal of medicinal chemistry**, v. 62, n. 18, p. 8544-8556, 2019.

KRAMER, Rafael Duarte; AZEVEDO, Júlio César Rodrigues. A ecotoxicologia na gestão dos recursos hídricos. **XX Simpósio Brasileiro de recursos hídricos**, Bento, 2013.

KREWING, Marco et al. Plasma-sensitive *Escherichia coli* mutants reveal plasma resistance mechanisms. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 16, n. 152, p. 20180846, 2019.

KUMAR, A.; JHA, A. Drug Development Strategies. In: KUMAR, A.; JHA, A. Anticandidal Agents. Cambridge: **Academic Press**, 2017. cap. 7.

LEONHART, Pablo Felipe; NARLOCH, Pedro Henrique; DORN, Márcio. A Self-adaptive Local Search Coordination in Multimeme Memetic Algorithm for Molecular Docking. In: **International Conference on Computational Science**. Springer, Cham, 2019. p. 145-159.

LI, Xiao et al. In silico estimation of chemical carcinogenicity with binary and ternary classification methods. **Molecular informatics**, v. 34, n. 4, p. 228-235, 2015.

LIANG, Jing-wei et al. Fragment-based structural optimization of a natural product itampolin A as a p38 α inhibitor for lung cancer. **Marine drugs**, v. 17, n. 1, p. 53, 2019.

- LIM, Carine SQ et al. Identification of a potent small-molecule inhibitor of bacterial DNA repair that potentiates quinolone antibiotic activity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 27, n. 20, p. 114962, 2019.
- LIMA, MAÍRA FERREIRA PINTO et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares—Revisão de Literatura. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, 2018.
- LIU, Bin et al. Discovery of Taniborbactam (VNRX-5133): A Broad-Spectrum Serine-and Metallo- β -Lactamase Inhibitor for Carbapenem-Resistant Bacterial Infections. 2019.
- LIU, Yuan et al. Molecules that inhibit bacterial resistance enzymes. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 43, 2019.
- LIU, Zhengshuai, et al. Application of nuclear magnetic resonance (NMR) in coalbed methane and shale reservoirs: A review. **International Journal of Coal Geology**, 2019, 103261.
- LIZANA, Ignacio et al. Theoretical Evidence for the Nonoccurrence of Tetrahedral Intermediates in the Deacylation Pathway of the Oxacillinase-24/Avibactam Complex. **ACS omega**, 2019.
- LOHANS, Christopher T. et al. Non-Hydrolytic β -Lactam Antibiotic Fragmentation by l, d-Transpeptidases and Serine β -Lactamase Cysteine Variants. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 7, p. 1990-1994, 2019.
- LOHNING, A. E. et al. A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 13, p. 1–18, 2017.
- LONG, Keith et al. Do Zebrafish Obey Lipinski Rules?. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 6, p. 1002-1006, 2019.
- LOOSE, Maria et al. Urinary bactericidal activity of colistin and azidothymidine combinations against mcr-1-positive colistin-resistant *Escherichia coli*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 54, n. 1, p. 55-61, 2019.
- MACHADO, Catrine De Souza et al. Avaliação do efeito sinérgico da amitriptilina e colistina em pacientes com carbapenemase resistentes. In: **6º Congresso Internacional em Saúde**. 2019.

MACLEAN, R. Craig; MILLAN, Alvaro San. The evolution of antibiotic resistance. **Science**, v. 365, n. 6458, p. 1082-1083, 2019.

MACLEAN, R. Craig; SAN MILLAN, Alvaro. The evolution of antibiotic resistance. **Science**, v. 365, n. 6458, p. 1082-1083, 2019.

MAH, Vicky; VANDERKOOI, Otto G.; JOHNSON, David W. Epidemiology of Serious Bacterial Infections in Infants Less Than 90 Days of Age, Presenting to a Tertiary Care Emergency Department, 2010 to 2016. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 38, n. 7, p. e161-e163, 2019.

MAIDEN, Michael M. et al. Triclosan is an aminoglycoside adjuvant for eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. e00146-18, 2018.

MALANDE, Oliver Ombeva et al. A ten-year review of ESBL and non-ESBL *Escherichia coli* bloodstream infections among children at a tertiary referral hospital in South Africa. **PloS one**, v. 14, n. 9, 2019.

MALEKI, Ali et al. Preparation of carbon-14 labeled 2-(2-mercaptoacetamido)-3-phenylpropanoic acid as metallo-beta-lactamases inhibitor (MBLI), for coadministration with beta-lactam antibiotics. **Current Organic Synthesis**, v. 16, n. 5, p. 765-771, 2019.

MANAP, Abdul et al. Synergistic Effects of Curcumin and Piperine as Potent Acetylcholine and Amyloidogenic Inhibitors With Significant Neuroprotective Activity in SH-SY5Y Cells via Computational Molecular Modeling and in vitro Assay. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 11, p. 206, 2019.

MANGES, Ameer R. et al. Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 3, p. e00135-18, 2019.

MANO, Erica CC; SCOTT, Ana L.; HONORIO, Kathia M. UDP-glucuronosyltransferases: structure, function and drug design studies. **Current medicinal chemistry**, v. 25, n. 27, p. 3247-3255, 2018.

MARTÍNEZ, María Mayda Oliva; GÓMEZ, Ana Lina Báez. Epidemia silente del siglo XXI. Resistencia microbiana a los antibióticos. **Medimay**, v. 26, n. 2, 2019.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, Nelson Leonel; TAVÁREZ, Sara; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, Zaira Isabel. In vitro toxicity assessment of zinc and nickel ferrite nanoparticles in human

erythrocytes and peripheral blood mononuclear cell. **Toxicology in Vitro**, v. 57, p. 54-61, 2019.

MARTINS, Diego et al. O Papel dos Modelos Computacionais e das Analogias na Aprendizagem do Processo de Interação Fármaco-Enzima no Ensino Fundamentado em Modelagem. **Revista Brasileira de Pesquisa em Educação em Ciências**, p. 823-854, 2020.

MAYER, Felix P. et al. Stereochemistry of phase-1 metabolites of mephedrone determines their effectiveness as releasers at the serotonin transporter. **Neuropharmacology**, v. 148, p. 199-209, 2019.

MCGEARY, Ross P.; TAN, Daniel TC; SCHENK, Gerhard. Progress toward inhibitors of metallo- β -lactamases. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 7, p. 673-691, 2017.

MELO, SEBASTIÃO et al. Heterociclos pirimidínicos potencialmente bioativos e respectivo processo de obtenção e elucidação estrutural. 2019.

MERCIECA, Karl et al. Trabeculectomy bleb needling and antimetabolite administration practices in the UK: a glaucoma specialist national survey. **British Journal of Ophthalmology**, v. 102, n. 9, p. 1244-1247, 2018.

MIKOVSKI, Daniele et al. Química Medicinal E A Sua Importância No Desenvolvimento De Novos Fármacos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 12, n. 13, p. 29-43, 2019.

MIRYALA, Sravan Kumar; ANBARASU, Anand; RAMAIAH, Sudha. Evolutionary relationship of penicillin-binding protein 2 coding penA gene and understanding the role in drug-resistance mechanism using gene interaction network analysis. In: **Emerging Technologies for Agriculture and Environment**. Springer, Singapore, 2020. p. 9-25.

MITTAL, Ayushi et al. Exploring the Zika Genome to Design a Potential Multiepitope Vaccine Using an Immunoinformatics Approach. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, p. 1-10, 2020.

MOFFATT, Jennifer H.; HARPER, Marina; BOYCE, John D. Mechanisms of Polymyxin Resistance. In: **Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside**. Springer, Cham, 2019. p. 55-71.

MOHAMMED, Sulaiman A.; SINGH, Suman P. MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF METALLO BETA LACTAMASES IN ACINETOBACTER BAUMANNII AT A

TERTIARY CARE HOSPITAL. **International Journal of Medical and Biomedical Studies**, v. 3, n. 8, 2019.

MOMBINI, Sara et al. Diversity and metallo- β -lactamase-producing genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from filters of household water treatment systems. **Journal of environmental management**, v. 231, p. 413-418, 2019.

MONTERROSO, Michelle et al. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* aisladas de infecciones entéricas de porcinos provenientes de granjas de producción tecnificada. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 30, n. 1, p. 455-464, 2019.

MORGAN, Radwa N., et al. Prevalence and pathologic effects of colibactin and cytotoxic necrotizing factor-1 (Cnf 1) in *Escherichia coli*: experimental and bioinformatics analyses. **Gut pathogens**, 2019, 11.1: 22.

MORTELÉ, Olivier et al. In vitro Phase I and Phase II metabolism of the new designer benzodiazepine cloniprazepam using liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 153, p. 158-167, 2018.

MUKESH, Bachwani; RAKESH, Kumar. Molecular docking: a review. **International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**, v. 2, n. 6, p. 1746-1751, 2011.

MURRAY, Christopher W.; REES, David C. Opportunity knocks: organic chemistry for fragment-based drug discovery (FBDD). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 2, p. 488-492, 2016.

NAAS, Thierry et al. Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 32, n. 1, p. 917-919, 2017.

NAKADOMARI, Giovana Hashimoto et al. MULTIPLEX-PCR FOR DETECTION OF β -LACTAM RESISTANCE IN *Staphylococcus* spp. **Revista De Ciência Veterinária E Saúde Pública**, v. 6, n. 2, p. 262-275, 2019.

NATHAN, Vinod Kumar et al. Antioxidant and antimicrobial potential of natural colouring pigment derived from *Bixa orellana* L. Seed Aril. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, India Section B: Biological Sciences, v. 89, n. 1, p. 137-143, 2019.

NEOCHORITIS, Constantinos G.; ZHAO, Ting; DÖMLING, Alexander. Tetrazoles via multicomponent reactions. **Chemical reviews**, v. 119, n. 3, p. 1970-2042, 2019.

NEVILLE, Nolan; JIA, Zongchao. Approaches to the structure-based design of antivirulence drugs: therapeutics for the post-antibiotic era. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 378, 2019.

OGAWA, Hiroaki et al. Sputum Gram stain for diagnosing causative bacterial pathogens and guiding antimicrobial therapies in community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis protocol. **Fujita Medical Journal**, p. 2018-019, 2019.

OKAMOTO, Adriano Sakai et al. Avaliação do mecanismo de quorum sensing entre lactobacillus spp. Contra salmonella heidelberg em frangos de corte. 2019.

OLIVEIRA, Jaine HH et al. Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2142-2150, 2009.

OLIVEIRAL, V. F. et al. Análise farmacológica e toxicológica in silico do flavonoide 5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona. **Journal of Medicine and Health Promotion**, v. 3, n. 1, p. 913-921, 2018.

PAL, Arijit; TRIPATHI, Anusri. Quercetin inhibits carbapenemase and efflux pump activities among carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. **Apmis**, v. 128, n. 3, p. 251-259, 2020.

PALMEIRA, Júlia Tavares et al. ANÁLISE FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA IN SILICO DO ÁCIDO UNDECILÊNICO APLICADA A ODONTOLOGIA. **Journal of medicine and Health Promotion**. v.4, n3,p. 1219-1230,2019.

PANG, Xin et al. Sono-Immunotherapeutic Nanocapturer to Combat Multidrug-Resistant Bacterial Infections. **Advanced Materials**, p. 1902530, 2019.

PARAMARTA, Adlina; WEBSTER, Dean C. The exploration of Michael-addition reaction chemistry to create high performance, ambient cure thermoset coatings based on soybean oil. **Progress in Organic Coatings**, v. 108, p. 59-67, 2017.

PAREEK, Chandresh et al. An Efficient Combinatorial Approach for Beta-Lactam Antibiotics with Novel Adjuvants against Gram-Negative Organisms to Combat Multi-Drug Resistance. Int. Acade. Con. Appl. Res. Eng. Sci. Tech., Brussels, Belgium. **Diamond Scientific Publication**: Lithuania, p. 134-43, 2018.

- PARK, Yumi et al. Emergence and transmission of New Delhi metallo-beta-lactamase-5-producing *Escherichia coli* Sequence Type 361 in a Tertiary Hospital in South Korea. **Journal of clinical laboratory analysis**, p. e23041, 2019.
- PASCOINI, Ana L. et al. In silico development of new acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 4, p. 1007-1021, 2019.
- PATEL, Kinjal D. et al. Synthesis of N'-(Quinazolin-4-yl) isonicotinohydrazides and their biological screening, docking and ADME studies. **Arabian Journal of Chemistry**, 2018.
- PATEL, Rushika et al. Structure prediction and molecular docking studies of aromatic hydrocarbon sensing proteins TbuT, HbpR and PhnR to detect priority pollutants. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 55, n. 2, p. 126-141, 2020.
- PEREIRA, Denise Nascimento. Avaliação preliminar da atividade antibacteriana de derivados fenilacrilatos substituídos. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual da Paraíba. 2016.
- PEREIRA, Paulo Ricardo Moraes et al. Exploring chloride selectivity and halogenase regioselectivity of the SalL enzyme through QM/MM modeling. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2020.
- PHILIPPON, Alain et al. Structure-based classification of class A beta-lactamases, an update. **Current research in translational medicine**, 2019.
- PHILLIPS, M. A., STEWART, M. A., WOODLING, D. L., E XIE, Z. R. 2018. Has Molecular Docking Ever Brought us a Medicine?. **Molecular Docking**, p. 141, 2018.
- PICARD, Matthieu et al. Cross-reactivity to cephalosporins and carbapenems in penicillin-allergic patients: two systematic reviews and meta-analyses. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 7, n. 8, p. 2722-2738. e5, 2019.
- POGAKU, Vinay et al. Design, synthesis, molecular modelling, ADME prediction and anti-hyperglycemic evaluation of new pyrazole-triazolopyrimidine hybrids as potent α -glucosidase inhibitors. **Bioorganic chemistry**, v. 93, p. 103307, 2019.
- PRICE, Amanda J.; HOWARD, Steven; CONS, Benjamin D. Fragment-based drug discovery and its application to challenging drug targets. **Essays in biochemistry**, v. 61, n. 5, p. 475-484, 2017.

- RAGAB, Hanan M. et al. Chlorinated tacrine analogs: Design, synthesis and biological evaluation of their anti-cholinesterase activity as potential treatment for Alzheimer's disease. **Bioorganic chemistry**, v. 86, p. 557-568, 2019.
- RAJAN, Vijisha K.; RAGI, C.; MURALEEDHARAN, K. A computational exploration into the structure, antioxidant capacity, toxicity and drug-like activity of the anthocyanidin "Petunidin". **Heliyon**, v. 5, n. 7, p. e02115, 2019.
- RAMBABU, Darsi et al. Mn-MOF@ Pi composite: synthesis, characterisation and an efficient catalyst for the Knoevenagel condensation reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 50, p. 4691-4694, 2017.
- RAMU, Dandugudumula et al. Design and synthesis of imidazolidinone derivatives as potent anti-leishmanial agents by bioisosterism. **Archiv der Pharmazie**, v. 352, n. 4, p. 1800290, 2019.
- RAY, Sneha; MURKIN, Andrew S. New Electrophiles and Strategies for Mechanism-Based and Targeted Covalent Inhibitor Design. **Biochemistry**, v. 58, n. 52, p. 5234-5244, 2019.
- REDDY, Nakita et al. A 2018-2019 patent review of metallo beta-lactamase inhibitors. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, n. just-accepted, 2020.
- REDDYRAJULA, Rajkumar; DALIMBA, Udayakumar. The bioisosteric modification of pyrazinamide derivatives led to potent antitubercular agents: Synthesis via click approach and molecular docking of pyrazine-1, 2, 3-triazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 2, p. 126846, 2020.
- REHMAN, Kanwal; KAMRAN, Saira Hafeez; AKASH, Muhammad Sajid Hamid. Toxicity of antibiotics. In: *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment*. Elsevier, 2020. p. 234-252.
- REN, Hong-Can; SAI, Yang; CHEN, Tao. Evaluation of generic methods to predict human pharmacokinetics using physiologically based pharmacokinetic model for early drug discovery of tyrosine kinase inhibitors. **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 44, n. 1, p. 121-132, 2019.
- REZA, Akif; SUTTON, J. Mark; RAHMAN, Khondaker Miraz. Effectiveness of efflux pump inhibitors as biofilm disruptors and resistance breakers in gram-negative (ESKAPEE) bacteria. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 229, 2019.

ROMAN, Diana Larisa et al. Computational assessment of the pharmacological profiles of degradation products of chitosan. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 7, p. 214, 2019.

ROSA, Tacieli Fagundes da et al. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA IN VITRO DE CLONAZEPAM FRENTE A MICRORGANISMOS MULTIRRESISTENTES E ESTUDO DO EFEITO SINÉRGICO COM COLISTINA. In: **6º Congresso Internacional em Saúde**. 2019.

RUDI, A. V. et al. Prediction of metabolites of epoxidation reaction in MetaTox. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 28, n. 10, p. 833-842, 2017.

RUDI, Anastasiya et al. Metatox-Web application for generation of metabolic pathways and toxicity estimation. **Journal of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 17, n. 01, p. 1940001, 2019.

RUPAINWAR, Ruchi et al. The importance and applications of Knoevenagel reaction (brief review). **Oriental Journal of Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 423-429, 2019.

SAFADEL, Parviz; WHITE, David. Facilitating molecular biology teaching by using augmented reality (AR) and protein data bank (PDB). **TechTrends**, v. 63, n. 2, p. 188-193, 2019.

SAKTHIVEL, Balasubramanian; DHAKSHINAMOORTHY, Amarajothi. Chitosan as a reusable solid base catalyst for Knoevenagel condensation reaction. **Journal of colloid and interface science**, v. 485, p. 75-80, 2017.

SANO, Seigo et al. Predictability of human pharmacokinetics of drugs that undergo hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP)-mediated transport using single-species allometric scaling in chimeric mice with humanized liver: Integration with hepatic drug metabolism. *Xenobiotica*, n. just-accepted, p. 1-43, 2020.

SANTOS, Danielle Vieira de Assis et al. ANTIBIÓTICOS ATRAVÉS DA ABORDAGEM DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA. **Ciência Atual–Revista Científica Multidisciplinar das Faculdades São José**, v. 12, n. 2, 2018.

SANTOS, Edvania Emannelle Pinheiro. Síntese e avaliação da atividade antibacteriana de derivados de 2-cianoacetamida. Trabalho de Conclusão de Curso. **Universidade Estadual da Paraíba**. 2017.

SARAGIH, Mutiara et al. Discovery of novel DNMT-1 inhibitor by fragment-based drug design as a potential breast cancer treatment. **International Journal**, v. 17, n. 62, p. 41-46, 2019.

SCHWÖBEL, Johannes AH et al. Prediction of Michael-type acceptor reactivity toward glutathione. **Chemical research in toxicology**, v. 23, n. 10, p. 1576-1585, 2010.

SERAFIM, Vilson Junior; RUIZ, Leonardo Guizilini Plazas. GENES BACTERIANOS DE RESISTÊNCIA NO MEIO AMBIENTE. **Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2018.

SERAFIM, Vilson Junior; RUIZ, Leonardo Guizilini Plazas. GENES BACTERIANOS DE RESISTÊNCIA NO MEIO AMBIENTE. **Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2018.

SHARMA, Neha et al. Quantitative structure activity relationship and molecular simulations for the exploration of natural potent VEGFR-2 inhibitors: an in silico anti-angiogenic study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-18, 2020.

SHI, Cheng et al. Approaches for the discovery of metallo- β -lactamase inhibitors: A review. **Chemical biology & drug design**, v. 94, n. 2, p. 1427-1440, 2019.

SHI, Cheng et al. Approaches for the discovery of metallo- β -lactamase inhibitors: A review. **Chemical biology & drug design**, v. 94, n. 2, p. 1427-1440, 2019.

SHI, Yiping; KAMER, Paul CJ; COLE-HAMILTON, David J. Synthesis of pharmaceutical drugs from cardanol derived from cashew nut shell liquid. **Green chemistry**, v. 21, n. 5, p. 1043-1053, 2019.

SHIhi, C., CHENhen, J., KANGang, X., SHENhen, X., LAOao, X., & ZHENGheng, H. (2019). Approaches for the discovery of metallo- β -lactamase inhibitors: A review. **Chemical biology & drug design**, 94(2), 1427-1440.

SIERRA-DÍAZ, Erick; HERNÁNDEZ-RÍOS, Cesar J.; BRAVO-CUELLAR, Alejandro. Resistencia a antibióticos: Perfil microbiológico de las infecciones de vías urinarias en México. **Cirugía y Cirujanos**, v. 87, n. 2, p. 176-182, 2019.

SILVA, Natália Cristina Sousa et al. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E A IMPLEMENTAÇÃO DA RDC 20/2011. **ÚNICA Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 1, 2017.

- SILVA, Vinícius Barros Ribeiro et al. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n. 13, p. 3259-3277, 2017.
- SINGH, Sumit Kumar et al. Ascitic fluid infection in children with liver disease: time to change empirical antibiotic policy. **Hepatology international**, v. 14, n. 1, p. 138-144, 2020.
- SKARIYACHAN, Sinosh; MANJUNATH, Meghna; BACHAPPANAVAR, Nikhil. Screening of potential lead molecules against prioritised targets of multi-drug-resistant-*Acinetobacter baumannii*—insights from molecular docking, molecular dynamic simulations and in vitro assays. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 5, p. 1146-1169, 2019.
- SMART, Oliver S. et al. Validation of ligands in macromolecular structures determined by X-ray crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. 74, n. 3, p. 228-236, 2018.
- SOBOLEV, Oleg V. et al. A global Ramachandran score identifies protein structures with unlikely stereochemistry. **bioRxiv**, 2020.
- SOMBORO, Anou M. et al. Diversity and proliferation of metallo- β -lactamases: a clarion call for clinically effective metallo- β -lactamase inhibitors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 18, p. e00698-18, 2018.
- STEFANIAK, LUCIANO APARECIDO et al. Resistência bacteriana: a importância das beta-lactamases. **REVISTA UNINGÁ**, v. 4, n. 1, 2017.
- SUENAGA, Mitsukuni et al. Potential role of polymorphisms in the transporter genes ENT1 and MATE1/OCT2 in predicting TAS-102 efficacy and toxicity in patients with refractory metastatic colorectal cancer. **European journal of cancer**, v. 86, p. 197-206, 2017.
- SUN, Lixia et al. In silico prediction of compounds binding to human plasma proteins by QSAR models. **ChemMedChem**, v. 13, n. 6, p. 572-581, 2018.
- SUN, Mengying et al. Graph convolutional networks for computational drug development and discovery. **Briefings in bioinformatics**, 2019.
- SWIMBERGHE, R. C. D. et al. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. **International endodontic journal**, v. 52, n. 5, p. 604-628, 2019.

TAHA, Duha E.; RAAUF, Ayad MR; ALI, Karima F. Design, Synthesis, Characterization, Biological Activity and ADME Study of New 5-arylidene-4-Thiazolidinones Derivatives Having. **Al-Mustansiriyah Journal of Pharmaceutical Sciences (AJPS)**, v. 19, n. 4, p. 77-88, 2019.

TAHA, Muhammad et al. Synthesis, α -glucosidase inhibition and molecular docking study of coumarin based derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 77, p. 586-592, 2018.

TAKAHASHI, Yoshiaki; IGARASHI, Masayuki. Destination of aminoglycoside antibiotics in the 'post-antibiotic era'. **The Journal of antibiotics**, v. 71, n. 1, p. 4-14, 2018.

TAKEHARA, Issey et al. Investigation of glycochenodeoxycholate sulfate and chenodeoxycholate glucuronide as surrogate endogenous probes for drug interaction studies of OATP1B1 and OATP1B3 in healthy Japanese volunteers. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 8, p. 1601-1614, 2017.

THAKKAR, Disha; KATE, Abhijeet S. Update on metabolism of abemaciclib: In silico, in vitro, and in vivo metabolite identification and characterization using high resolution mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, v. 12, n. 3, p. 331-342, 2020.

THOMFORD, Nicholas Ekow et al. In vitro reversible and time-dependent cyp450 inhibition profiles of medicinal herbal plant extracts *Newbouldia laevis* and *Cassia abbreviata*: Implications for herb-drug interactions. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 891, 2016.

TOMIĆ PARADŽIĆ, Maja et al. Hidden Carbapenem Resistance in OXA-48 and Extended-Spectrum β -Lactamase-Positive *Escherichia coli*. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 5, p. 696-702, 2019.

TOOKE, Catherine L. et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, 2019.

TRIPATHI, Puja; GHOSH, Subhasis; TALAPATRA, Soumendra Nath. Bioavailability prediction of phytochemicals present in *Calotropis procera* (Aiton) R. Br. by using Swiss-ADME tool. **World Scientific News**, v. 131, p. 147-163, 2019.

URBINA-DAZA, Adrian et al. Theoretical study of compounds derived from cephalosporins with inhibitory activity potential front to penicillin binding proteins (PBP) and resistance to Extended spectrum Beta-lactamase (ESBL) produced by *Escherichia coli*. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 48, n. 1, p. 44-60, 2019.

VAN DEN ANKER, John et al. Developmental changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, p. S10-S25, 2018.

VAN HOEK, Angela HAM et al. Transmission of ESBL-producing Escherichia coli between broilers and humans on broiler farms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2019.

VENA, Antonio; CASTALDO, Nadia; BASSETTI, Matteo. The role of new β -lactamase inhibitors in gram-negative infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p. 638-646, 2019.

VIEIRA, Tatiana F. et al. Evaluation of Scoring Functions for Large Scale Application of Virtual Screening in the Identification of Novel Beta-Lactamase Inhibitors. In: 2019 IEEE 6th Portuguese Meeting on Bioengineering (ENBENG). **IEEE**, 2019. p. 1-4.

VINAL, Kellie; CONN, Graeme L. Substrate recognition and modification by a pathogen-associated aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 5, 2017.

WANG, Haoqi et al. A non-beta-lactam antibiotic inhibitor for enterohemorrhagic Escherichia coli O104: H4. **Journal of Molecular Medicine**, v. 97, n. 9, p. 1285-1297, 2019.

WANG, Yuchen et al. In Silico Prediction of Human Intravenous Pharmacokinetic Parameters with Improved Accuracy. **Journal of chemical information and modeling**, v. 59, n. 9, p. 3968-3980, 2019.

WANGKHEIMAYUM, Jayalaxmi et al. Occurrence of acquired 16S rRNA methyltransferase-mediated aminoglycoside resistance in clinical isolates of Enterobacteriaceae within a tertiary referral hospital of Northeast India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, 2017.

WEI, Wen-Long et al. Venenum bufonis: an overview of its traditional use, natural product chemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology. **Journal of ethnopharmacology**, v. 237, p. 215-235, 2019.

WESTBROOK, John D.; BURLEY, Stephen K. How structural biologists and the protein data bank contributed to recent FDA new drug approvals. **Structure**, v. 27, n. 2, p. 211-217, 2019.

WESTPHAL, Christina; KONKEL, Anne; SCHUNCK, Wolf-Hagen. CYP-eicosanoids—a new link between omega-3 fatty acids and cardiac disease?. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 96, n. 1-4, p. 99-108, 2011.

WOLNY-KOŁADKA, Katarzyna; LENART-BOROŃ, Anna. Phenotypic and molecular assessment of drug resistance profile and genetic diversity of waterborne *Escherichia coli*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 5, p. 146, 2016.

WONNER, Patrick et al. Chalcogen Bonding Catalysis of a Nitro-Michael Reaction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 47, p. 16923-16927, 2019.

WUNGWATTANA, Minkey; SAVIC, Marizela. Tacrolimus interaction with nafcillin resulting in significant decreases in tacrolimus concentrations: A case report. **Transplant Infectious Disease**, v. 19, n. 2, p. e12662, 2017.

XAVIER, J. C. et al. Evaluation of the microbial diversity and heavy metal resistance genes of a microbial community on contaminated environment. **Applied Geochemistry**, v. 105, p. 1-6, 2019.

XIAO, Shun-Li et al. The Metabolism and Pharmacokinetics of Rhein and Aurantio-Obtusin. **Current Drug Metabolism**, 2020.

XIONG, Weiping et al. Adsorption of tetracycline antibiotics from aqueous solutions on nanocomposite multi-walled carbon nanotube functionalized MIL-53 (Fe) as new adsorbent. **Science of the Total Environment**, v. 627, p. 235-244, 2018.

XU, Hao et al. Knoevenagel condensation catalyzed by novel Nmm-based ionic liquids in water. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 24, p. 2360-2365, 2017.

YANG, Gabsik et al. Potentiation of skin TSLP production by a cosmetic colorant leads to aggravation of dermatitis symptoms. **Chemico-biological interactions**, v. 284, p. 41-47, 2018.

YOOU, Myoung-Schook; CHO, Sungjoon; CHOI, Youngjin. Molecular Docking-assisted Protein Chip Screening of Inhibitors for Bcl-2 Family Protein-protein Interaction to Discover Anticancer Agents by Fragment-based Approach. **BioChip Journal**, v. 13, n. 3, p. 260-268, 2019.

YOUSIF, Omar A.; MAHDI, Monther F.; RAAUF, Ayad MR. Design, synthesis, preliminary pharmacological evaluation, molecular docking and ADME studies of some new pyrazoline,

isoxazoline and pyrimidine derivatives bearing nabumetone moiety targeting cyclooxygenase enzyme. **Journal of Contemporary Medical Sciences**, v. 5, n. 1, 2019.

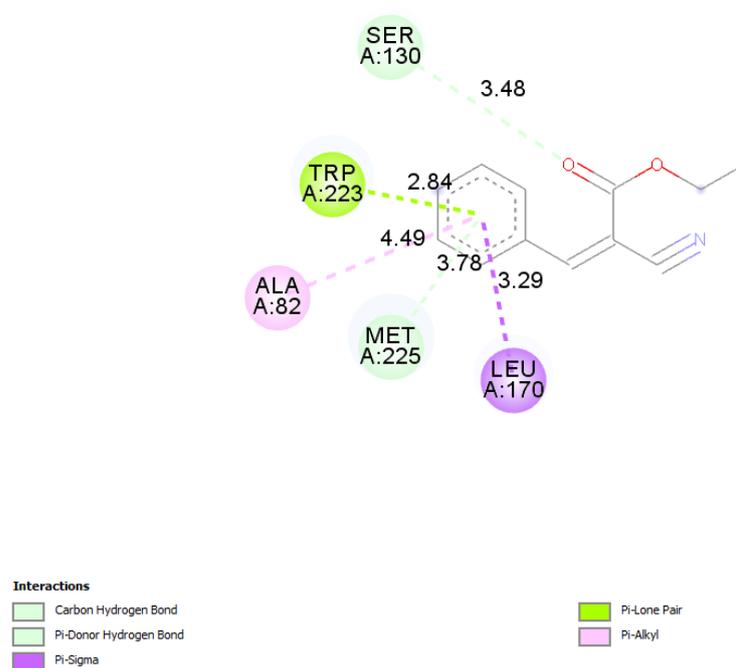
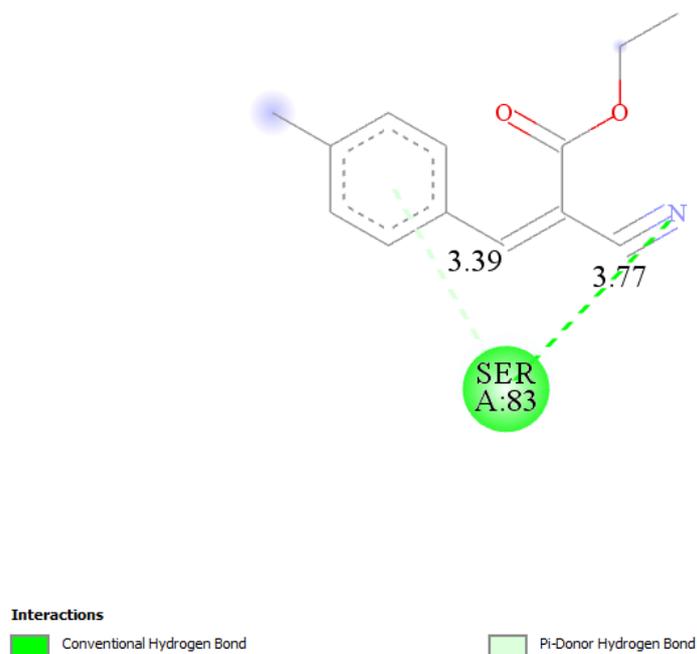
YUAN, Chen et al. Discovery of [1, 2, 4] triazole derivatives as new metallo- β -lactamase inhibitors. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 56, 2020.

ZHANG, Xiang et al. System Bioinformatic Approach through Molecular Docking, Network Pharmacology and Microarray Data Analysis to Determine the Molecular Mechanism Underlying the Effects of *Rehmanniae Radix Praeparata* on Cardiovascular Diseases. **Current Protein and Peptide Science**, v. 20, n. 10, p. 964-975, 2019.

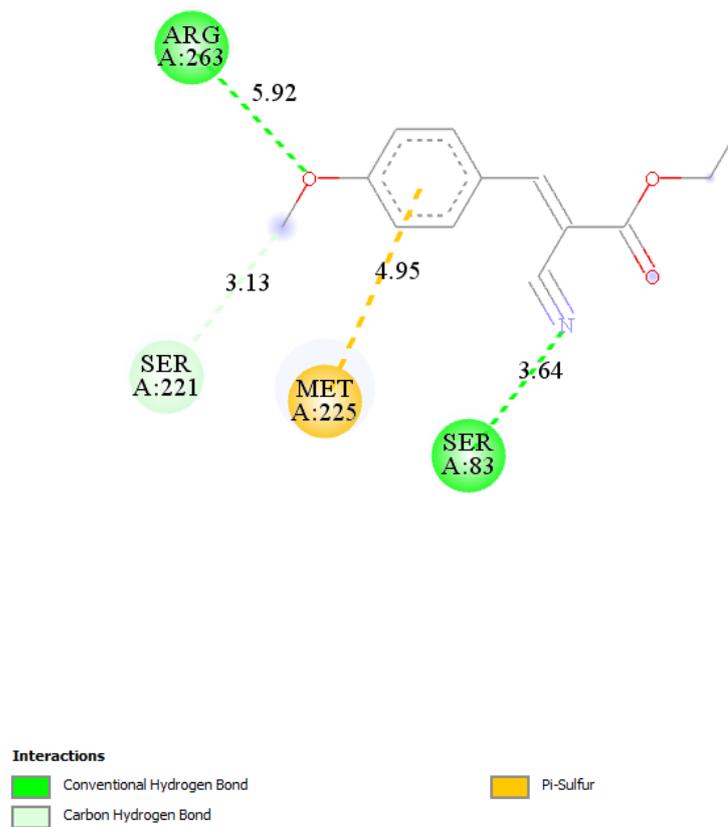
ZHANG, Yueping et al. Dissecting the contribution of OATP1B1 to hepatic uptake of statins using the OATP1B1 selective inhibitor estropipate. **Molecular pharmaceutics**, v. 16, n. 6, p. 2342-2353, 2019.

ZHAO, Yanfang et al. Magnetic solid-phase extraction of sulfonamide antibiotics in water and animal-derived food samples using core-shell magnetite and molybdenum disulfide nanocomposite adsorbent. **Journal of Chromatography A**, v. 1610, p. 460543, 2020.

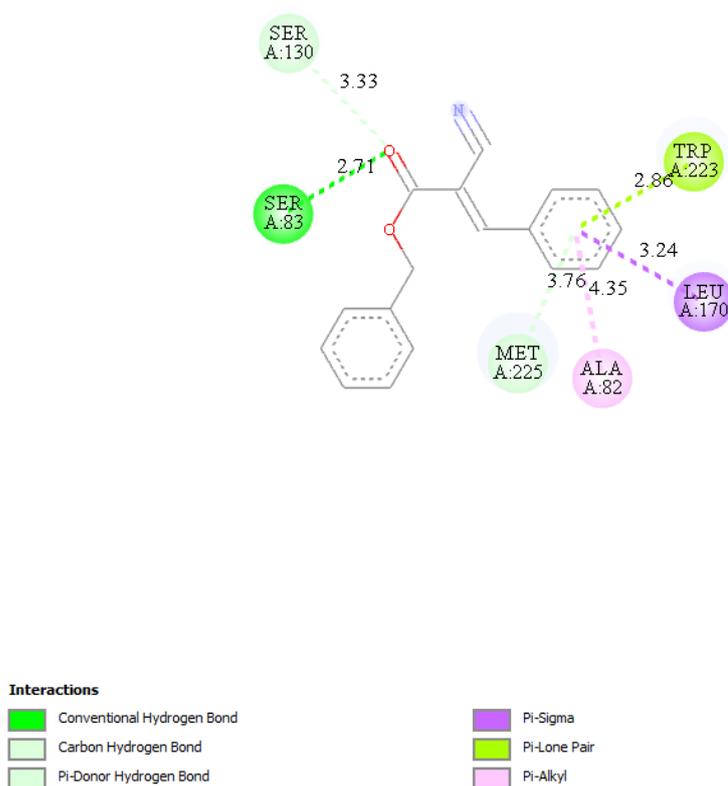
APÊNDICE A – *DOCKING* MOLECULAR

APÊNDICE A.1 – Docking molecular: interação AL-01 com 4Y0U.**APÊNDICE A.2 – Docking molecular: interação AL-02 com 4Y0U.**

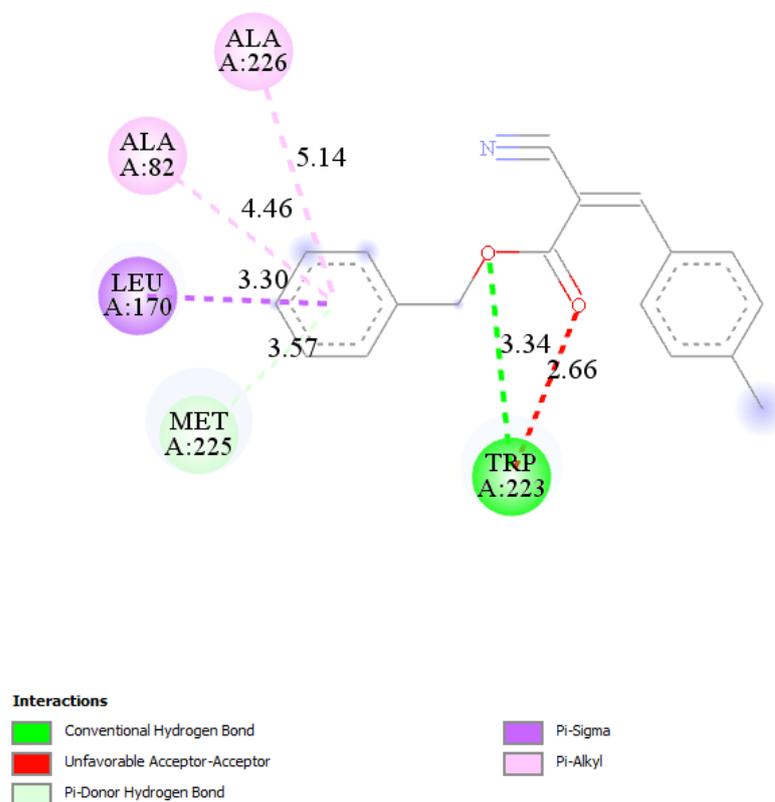
APÊNDICE A.3 – Docking molecular: interação AL-15 com 4Y0U.



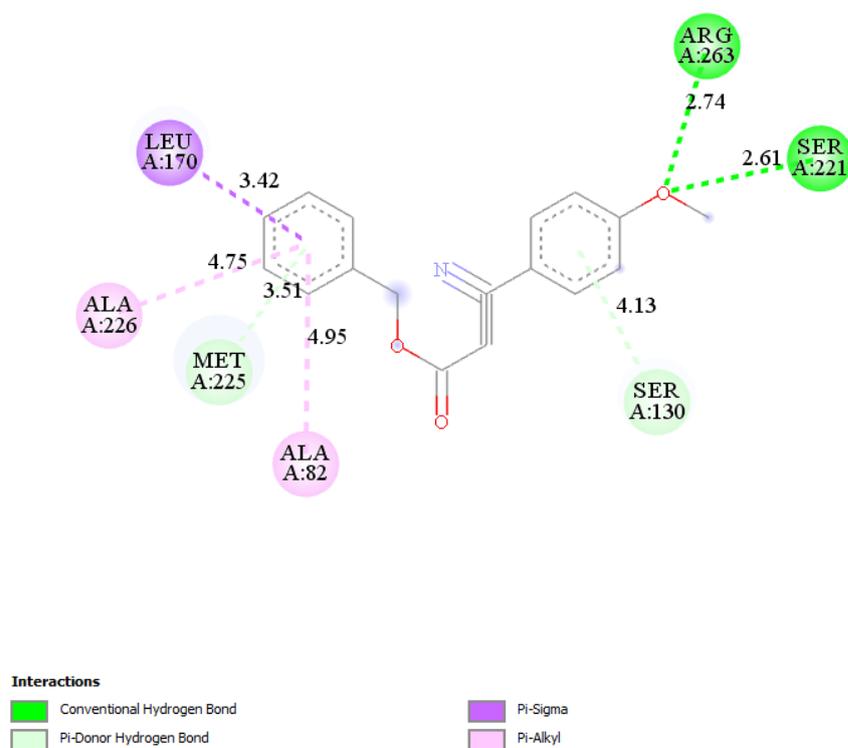
APÊNDICE A.4 – Docking molecular: interação APB-01 com 4Y0U.



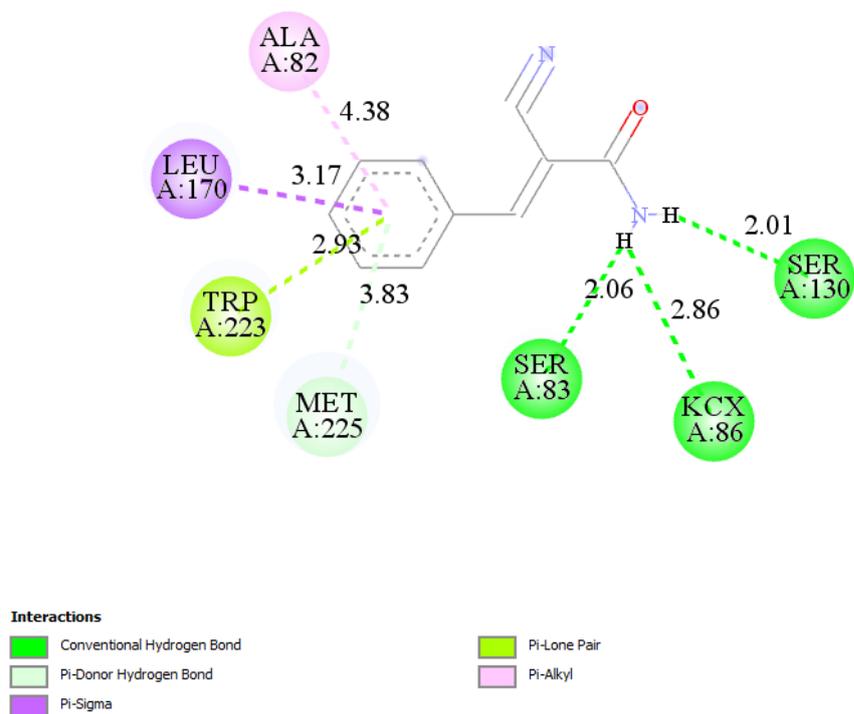
APÊNDICE A.5 – Docking molecular: interação APB-02 com 4Y0U.



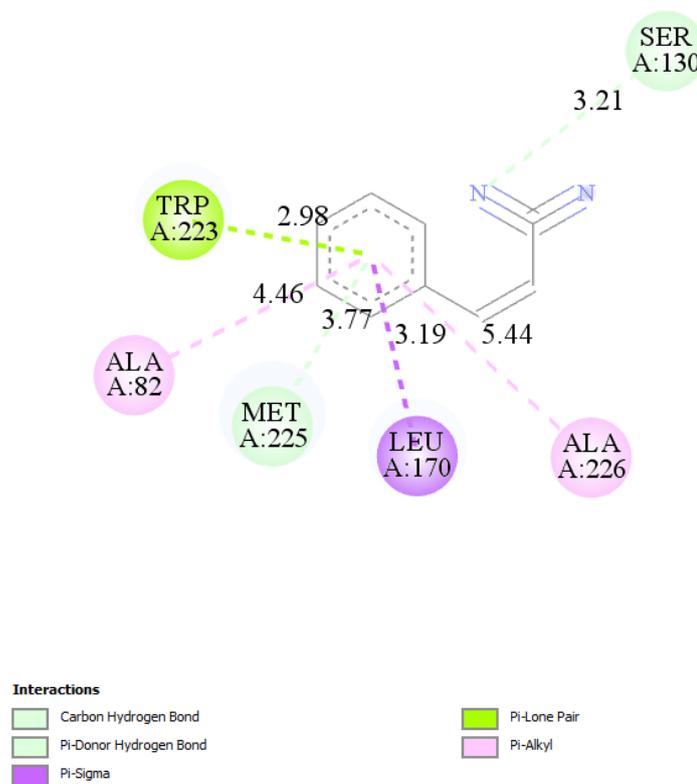
APÊNDICE A.6 – Docking molecular: interação APB-03 com 4Y0U.



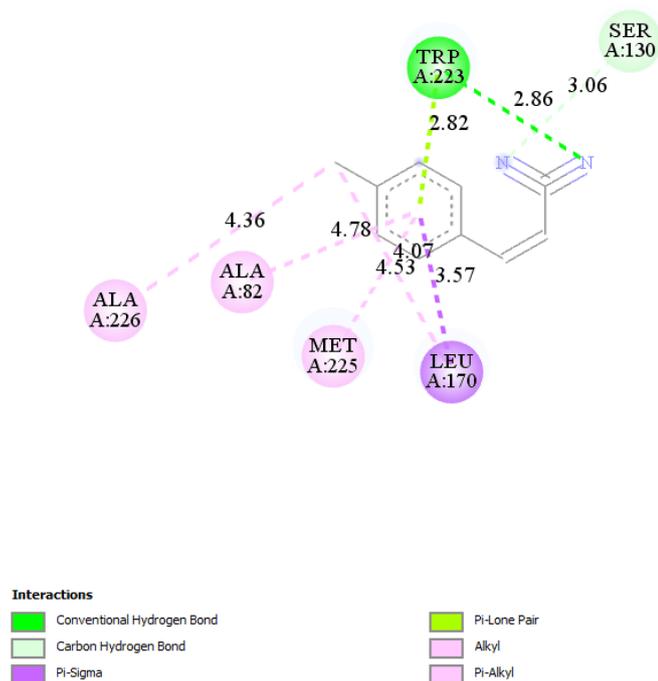
APÊNDICE A.7 – *Docking* molecular: interação APC-01 com 4Y0U.



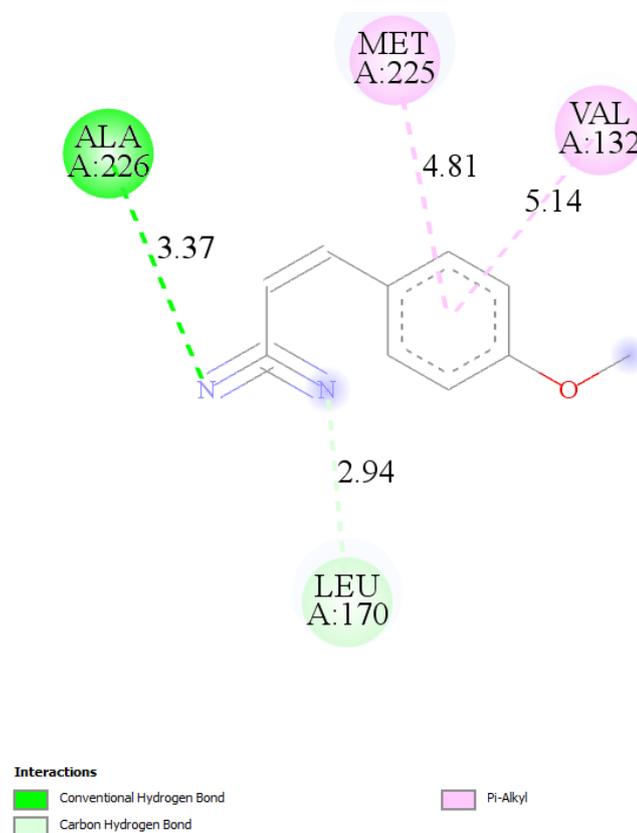
APÊNDICE A.8 – *Docking* molecular: interação APM-01 com 4Y0U.



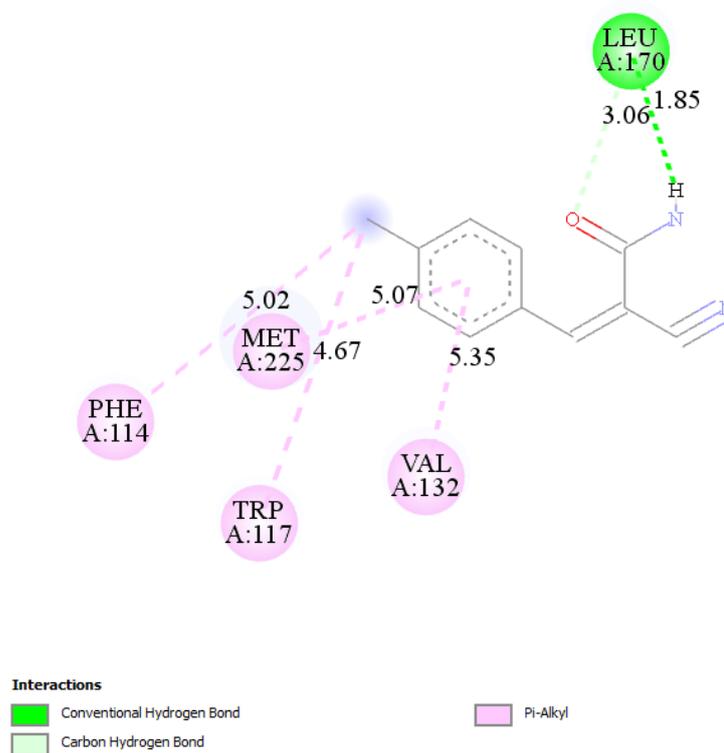
APÊNDICE A.9 – *Docking* molecular: interação APM-02 com 4Y0U.



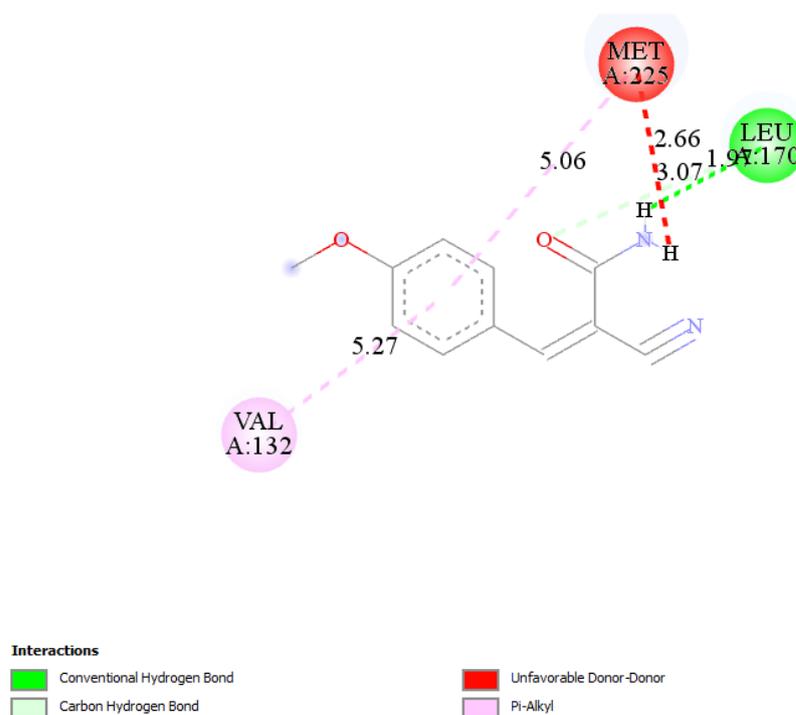
APÊNDICE A.10 – *Docking* molecular: interação APM-03 com 4Y0U.



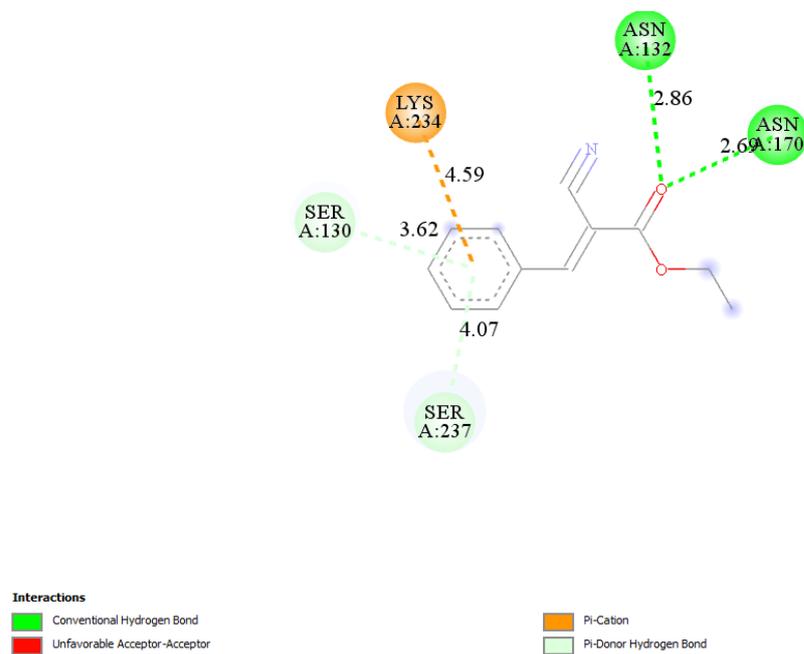
APÊNDICE A.11 – *Docking* molecular: interação EE-03 com 4Y0U.



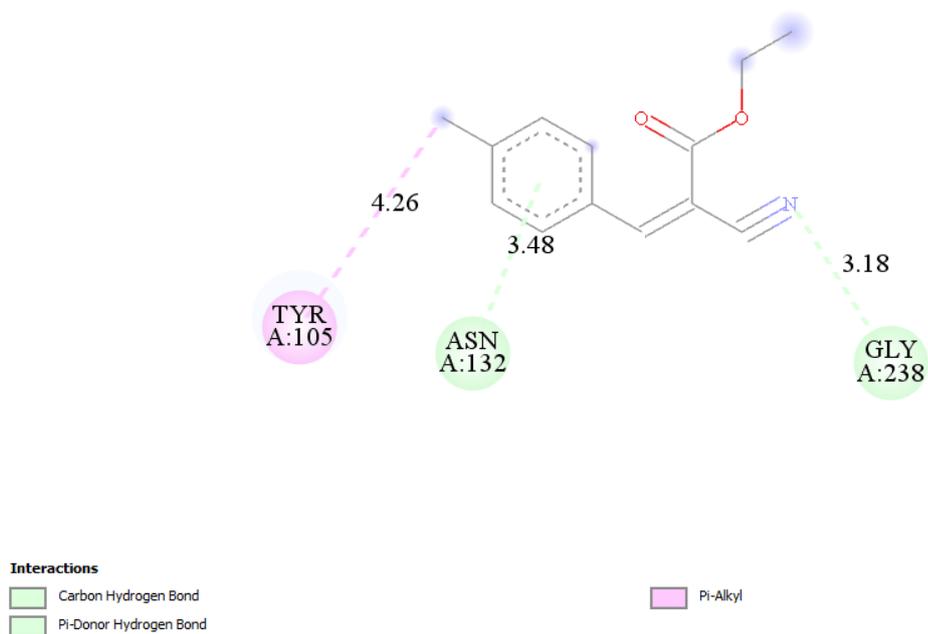
APÊNDICE A.12 – *Docking* molecular: interação EE-06 com 4Y0U.



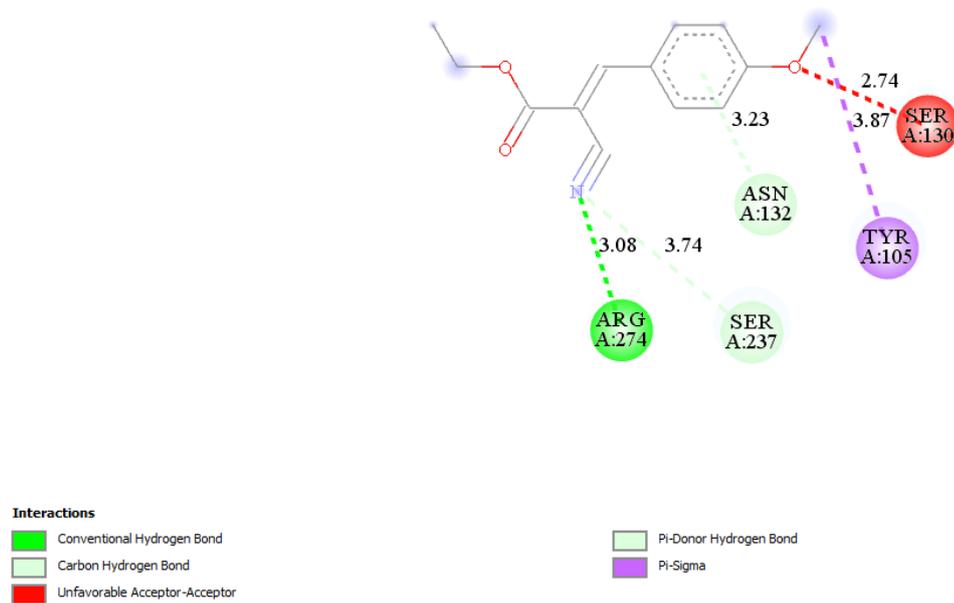
APÊNDICE A.13 – Docking molecular: interação AL-01 com 1IYO.



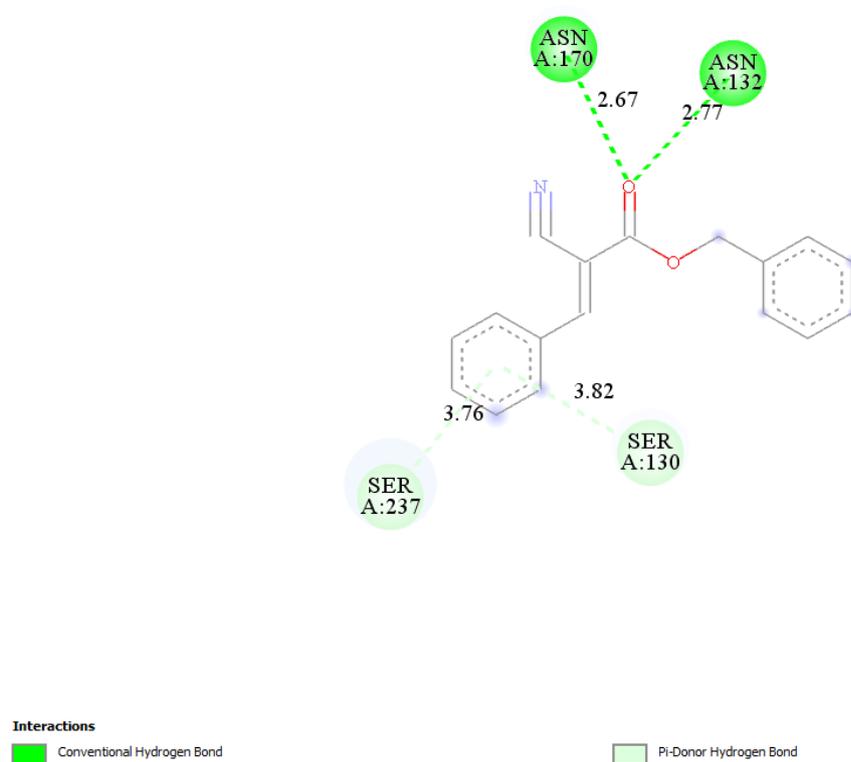
APÊNDICE A.14 – Docking molecular: interação AL-02 com 1IYO.

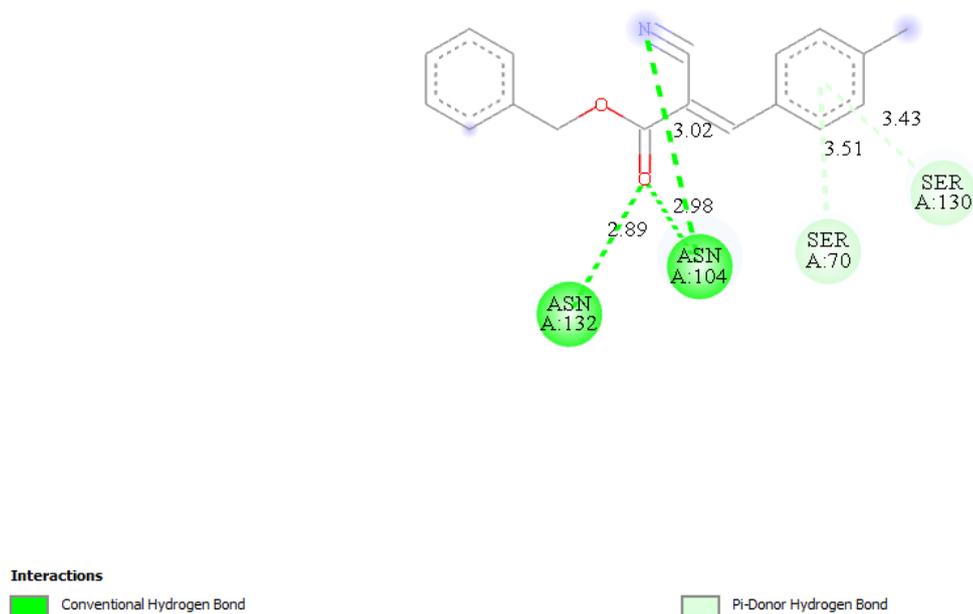
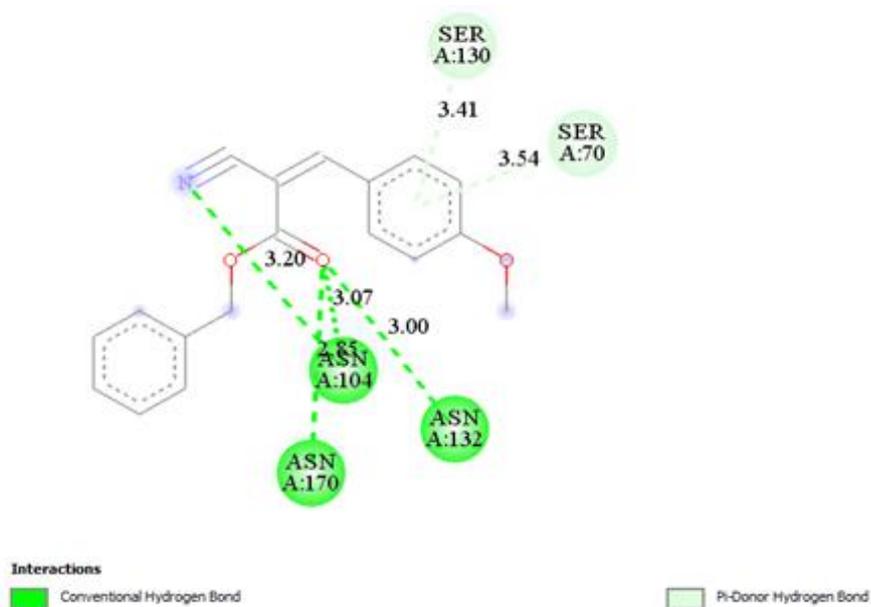


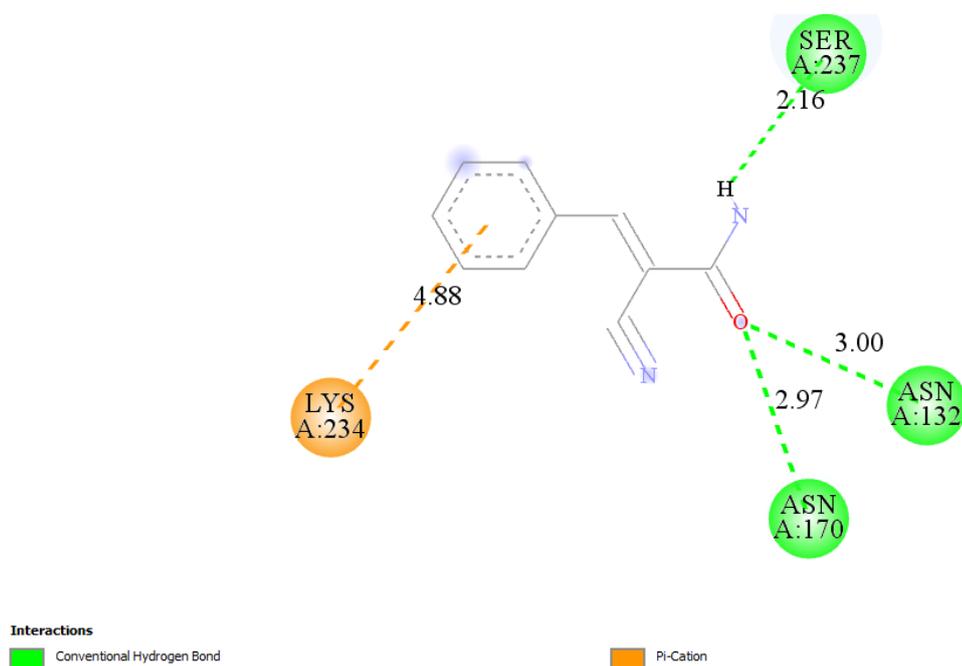
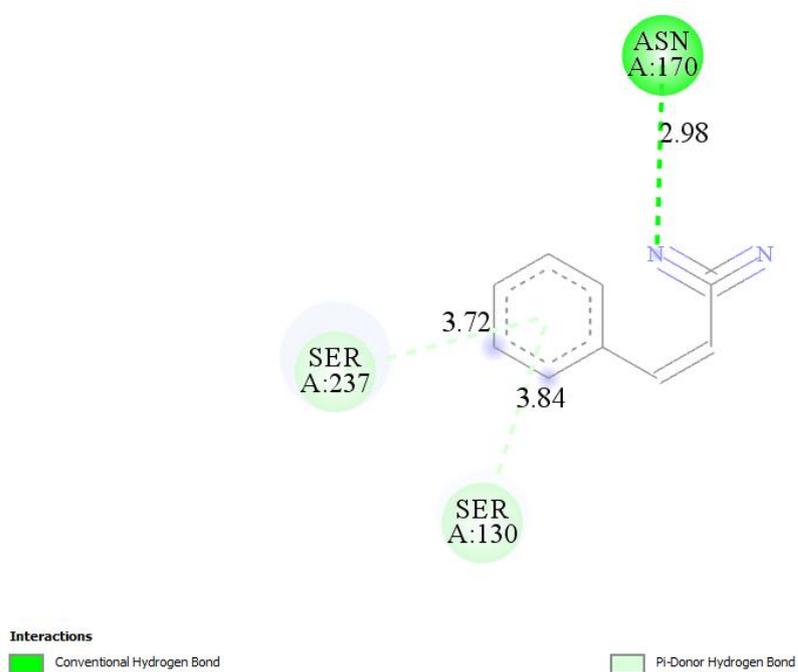
APÊNDICE A.15 – Docking molecular: interação AL-15 com 1IYO.

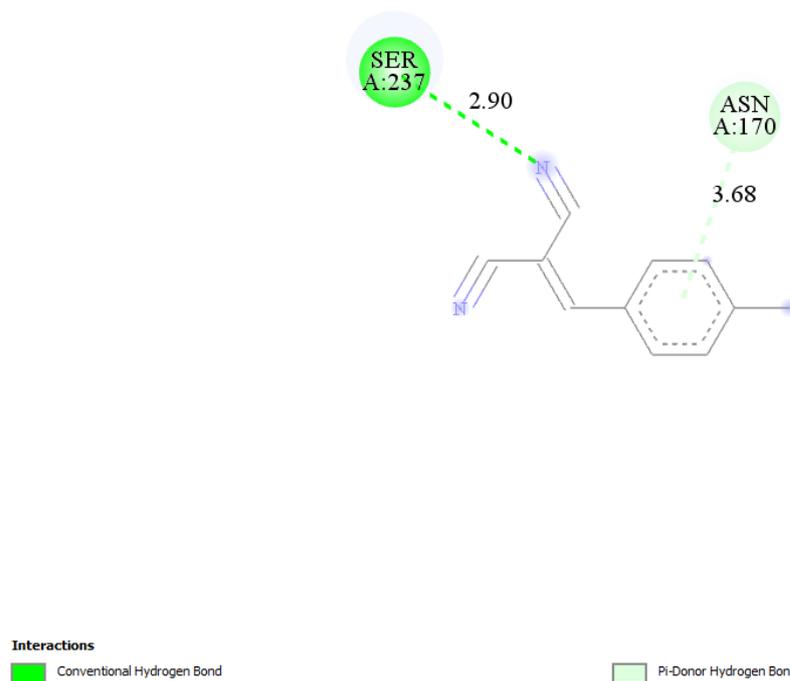
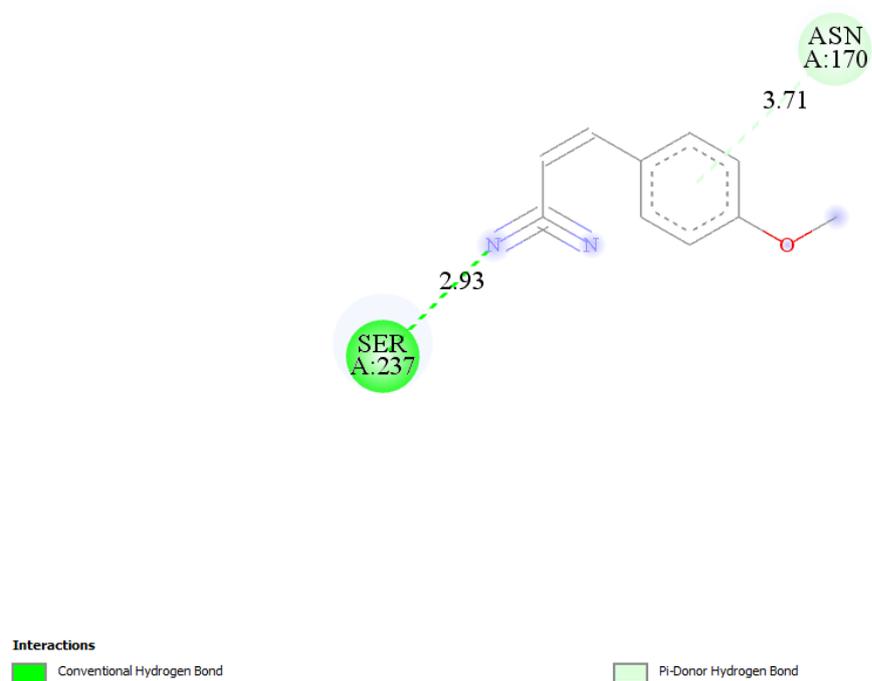


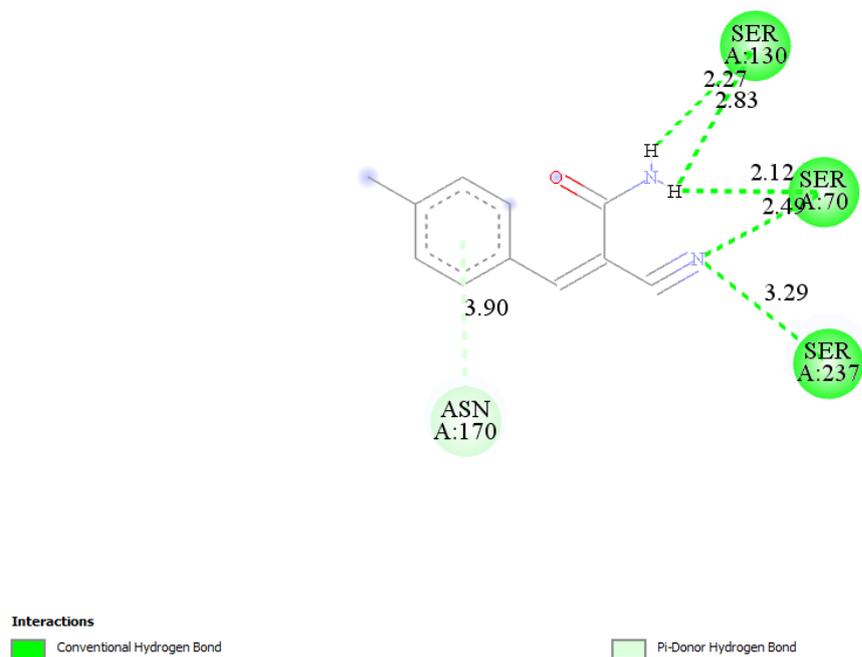
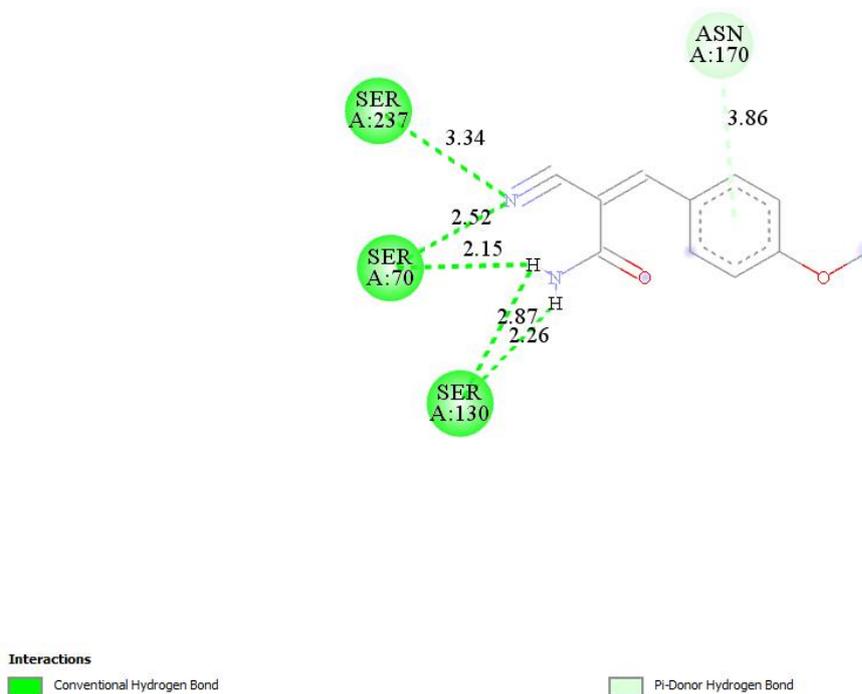
APÊNDICE A.16 – Docking molecular: interação APB-01 com 1IYO.



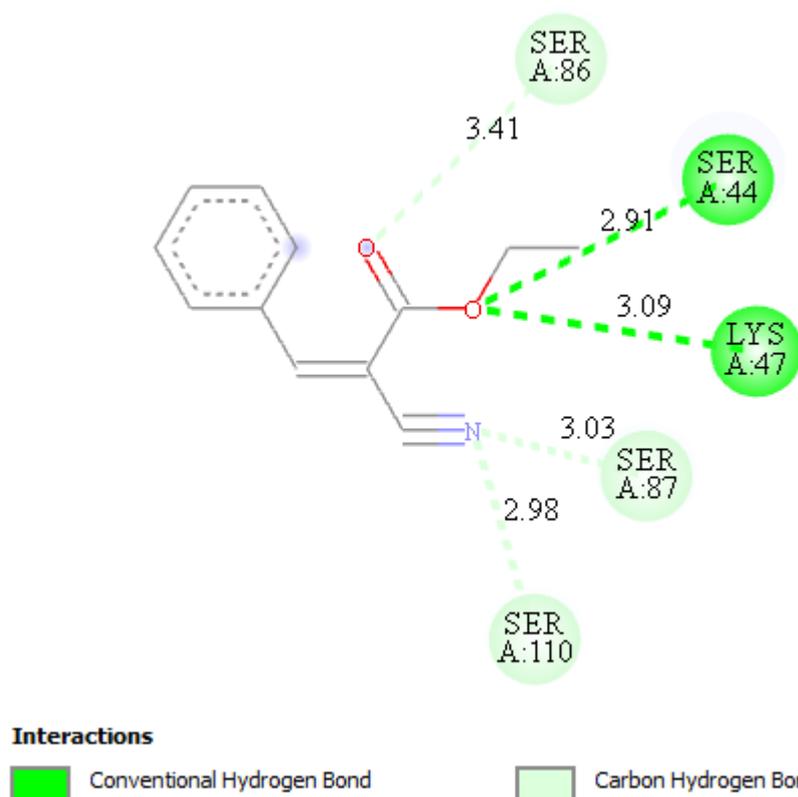
APÊNDICE A.17 – Docking molecular: interação APB-02 com 1IYO.**APÊNDICE A.18 – Docking molecular: interação APB-03 com 1IYO.**

APÊNDICE A.19 – Docking molecular: interação APC-01 com 1IYO.**APÊNDICE A.20 – Docking molecular: interação APM-01 com 1IYO.**

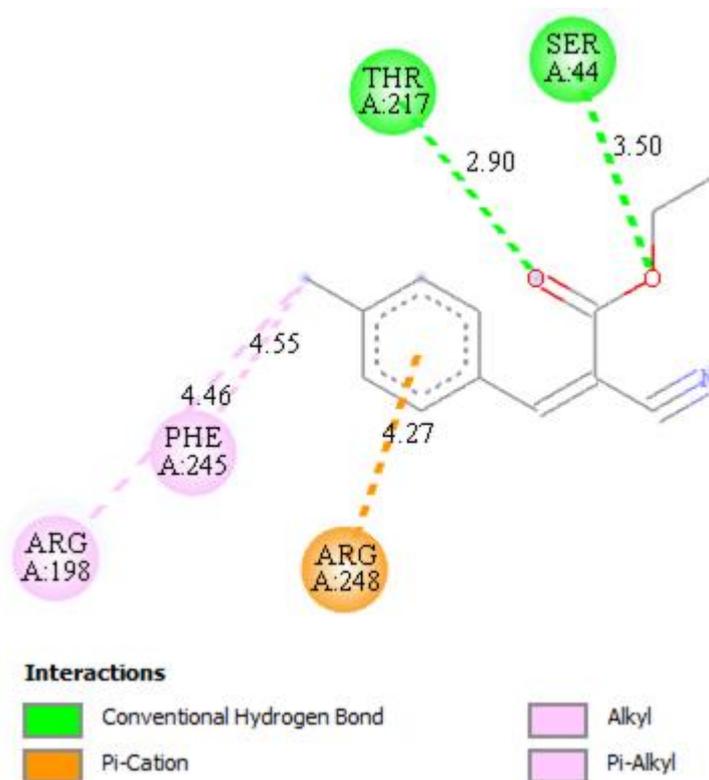
APÊNDICE A.21 – Docking molecular: interação APM-02 com 1IYO.**APÊNDICE A.22 – Docking molecular: interação APM-03 com 1IYO.**

APÊNDICE A.23 – Docking molecular: interação EE-03 com 1IYO.**APÊNDICE A.24 – Docking molecular: interação EE-06 com 1IYO.**

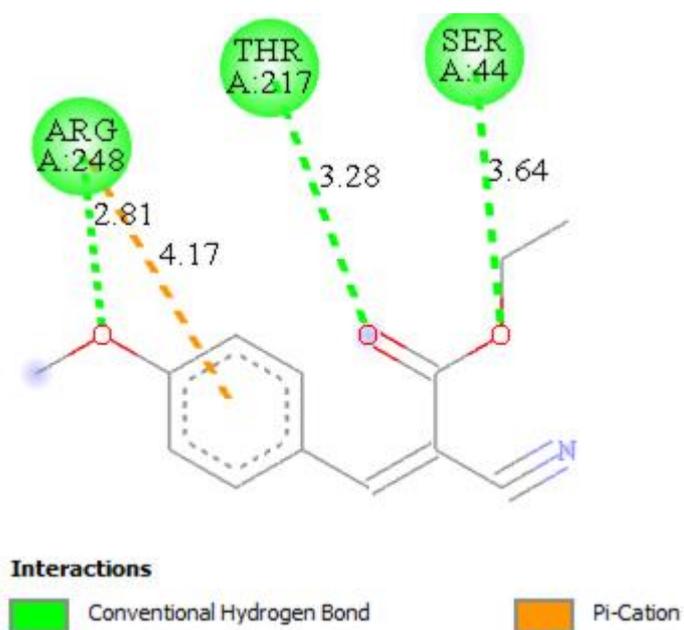
APÊNDICE A.25 – *Docking* molecular: interação AL-01 com 3MZE.



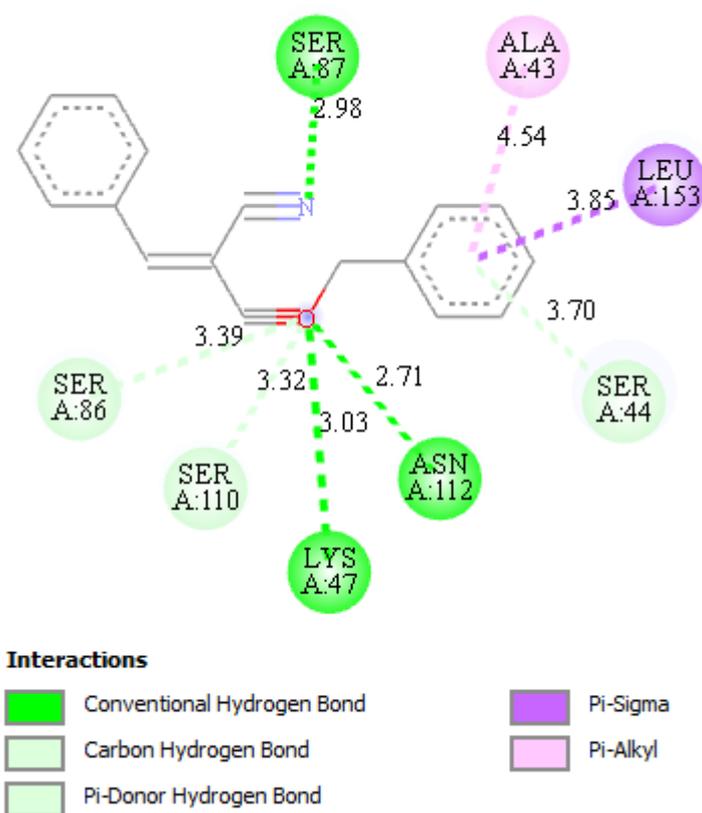
APÊNDICE A.26 – *Docking* molecular: interação AL-02 com 3MZE.



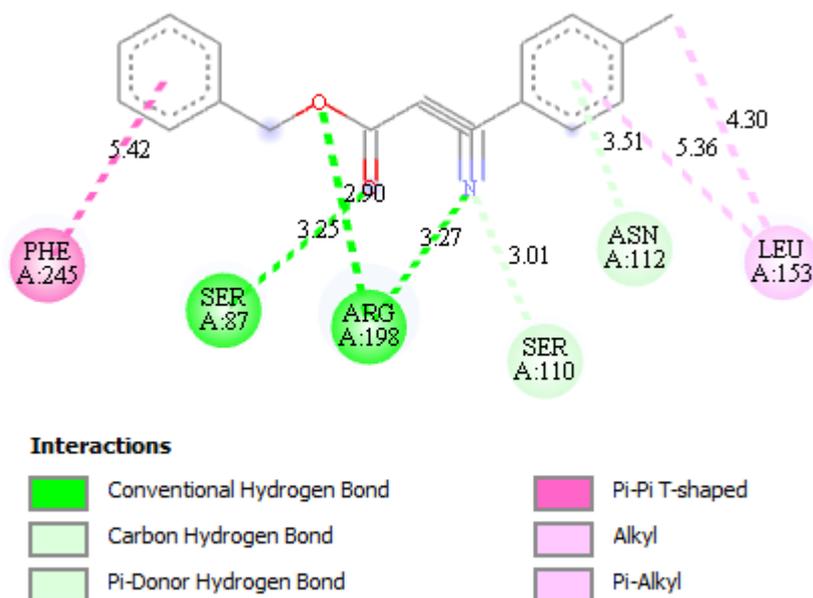
APÊNDICE A.27 – *Docking* molecular: interação AL-15 com 3MZE.



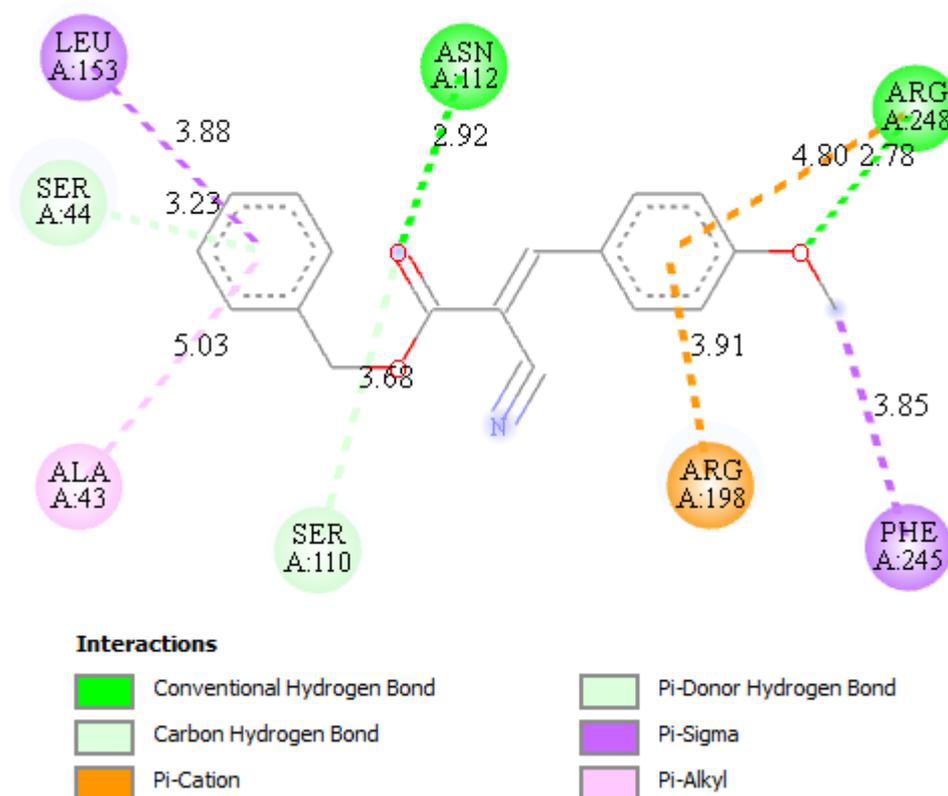
APÊNDICE A.28 – *Docking* molecular: interação APB-01 com 3MZE.



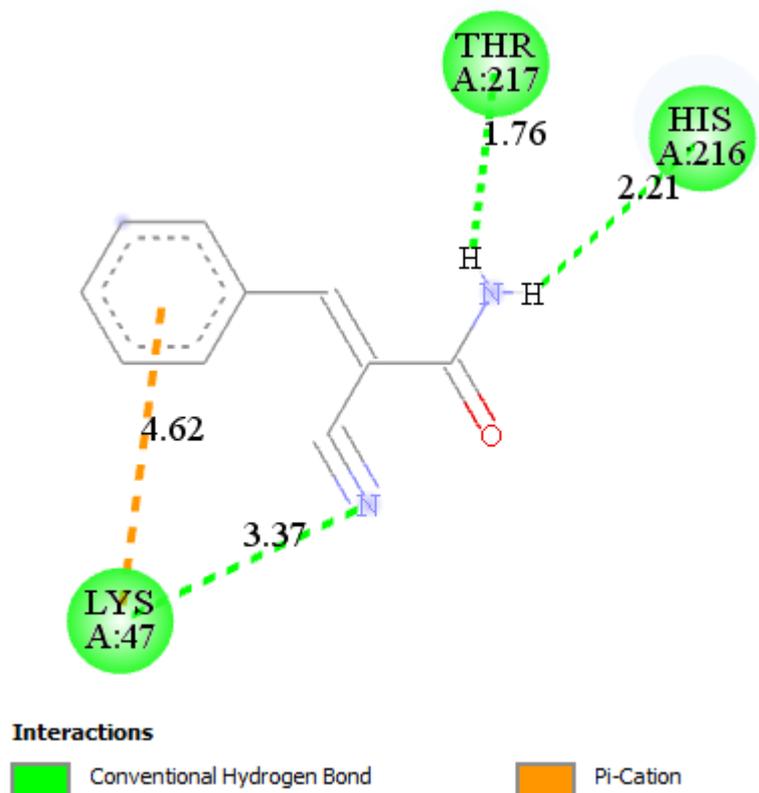
APÊNDICE A.29 – *Docking* molecular: interação APB-02 com 3MZE.



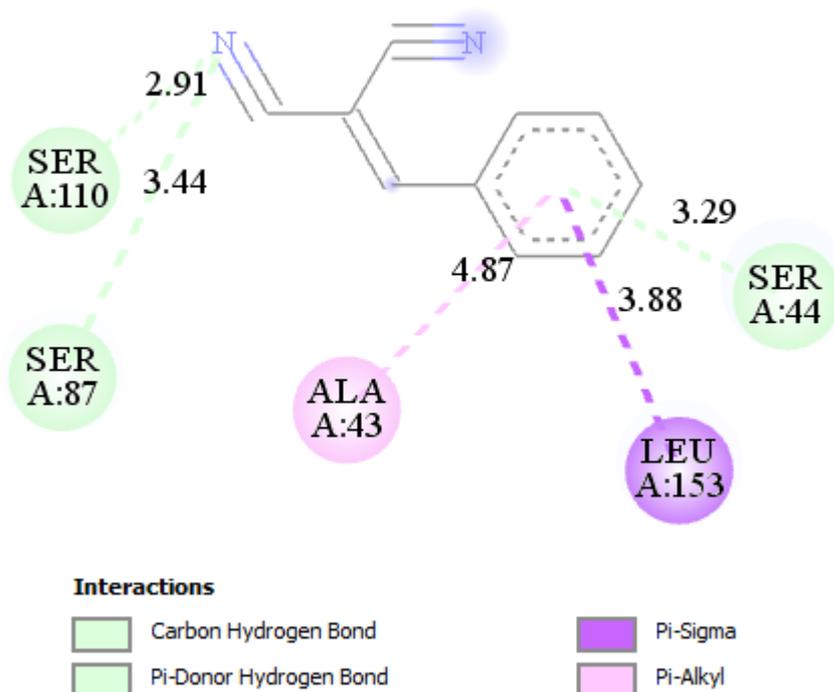
APÊNDICE A.30 – *Docking* molecular: interação APB-03 com 3MZE.



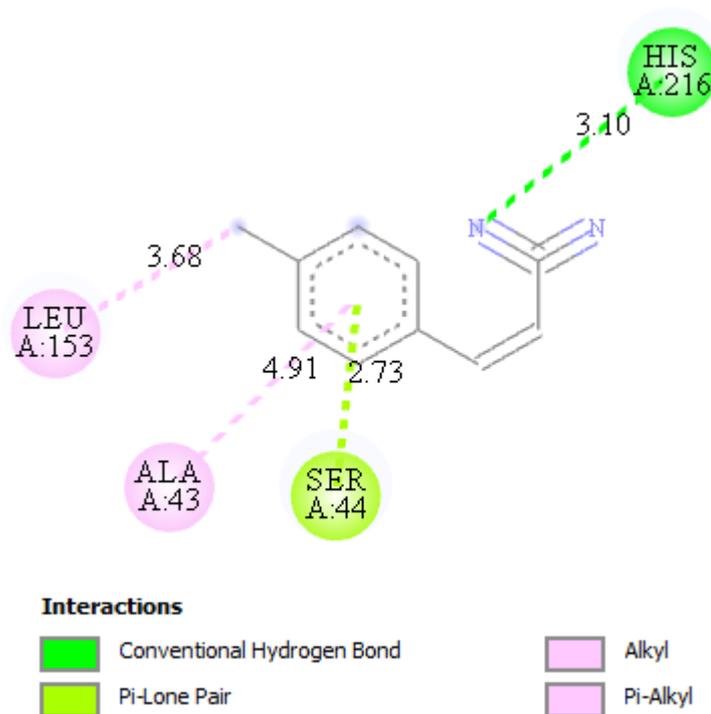
APÊNDICE A.31 – *Docking* molecular: interação APC-01 com 3MZE.



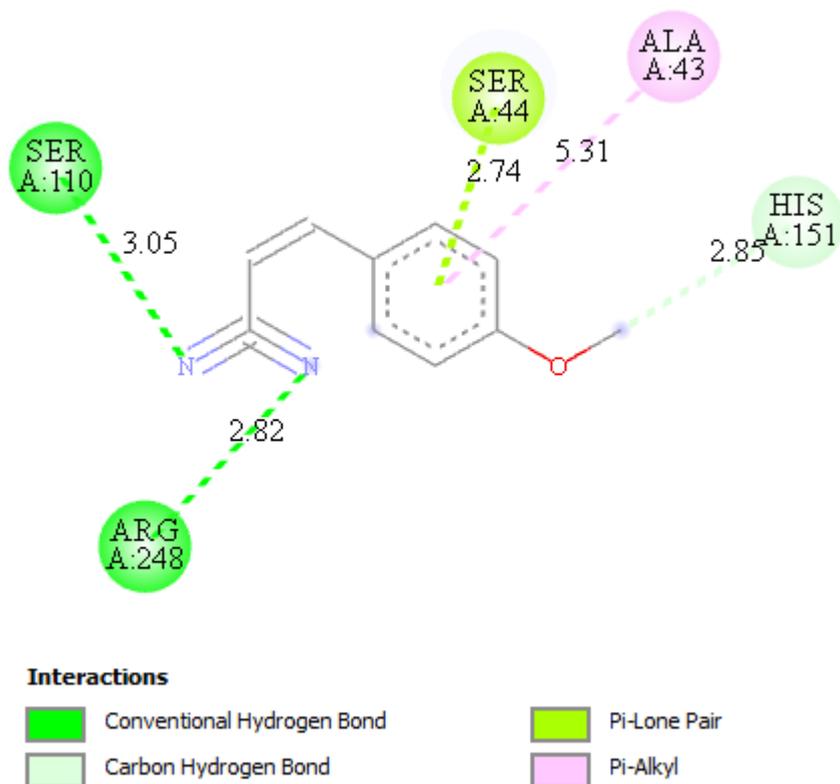
APÊNDICE A.32 – *Docking* molecular: interação APM-01 com 3MZE.



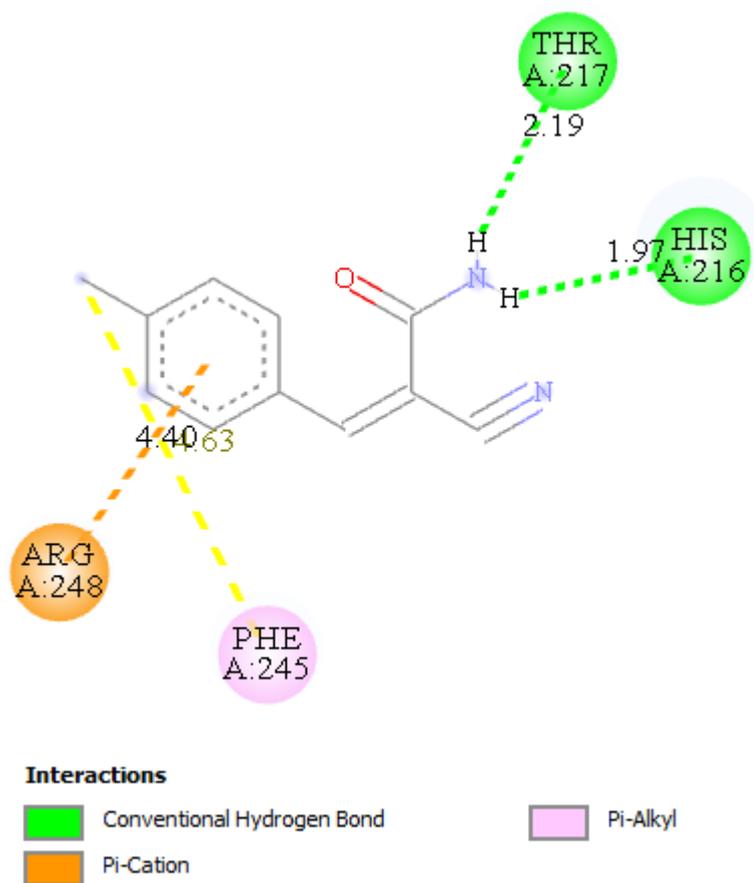
APÊNDICE A.33 – *Docking* molecular: interação APM-02 com 3MZE.



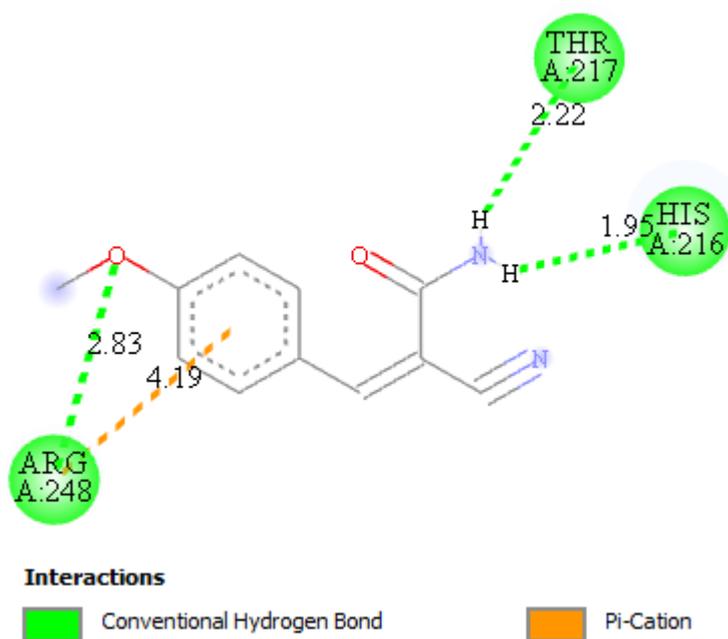
APÊNDICE A.34 – *Docking* molecular: interação APM-03 com 3MZE.



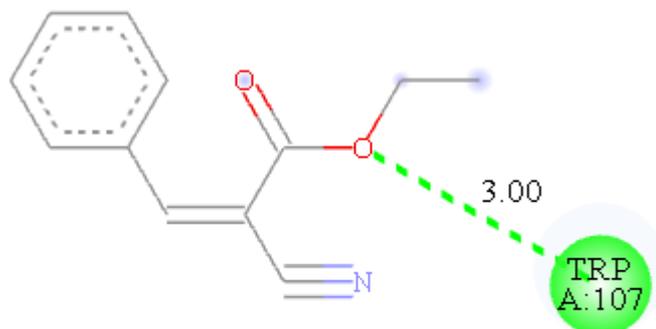
APÊNDICE A.35 – Docking molecular: interação EE-03 com 3MZE.



APÊNDICE A.36 – Docking molecular: interação EE-06 com 3MZE.



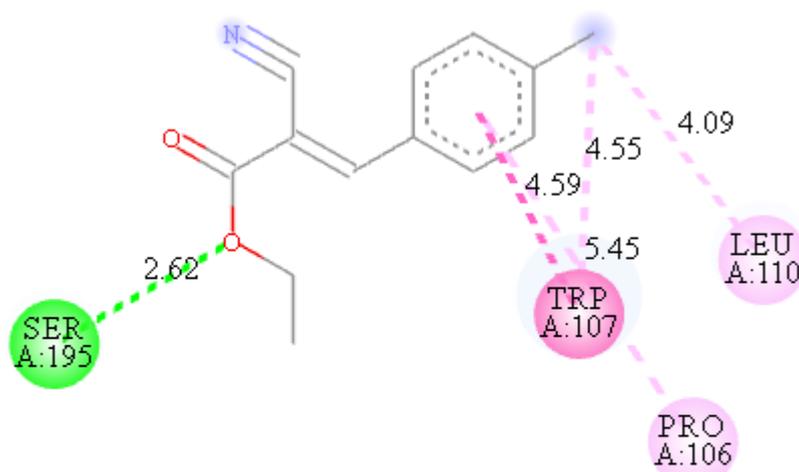
APÊNDICE A.37 – *Docking* molecular: interação AL-01 com 3MTE.



Interactions

 Conventional Hydrogen Bond

APÊNDICE A.38 – *Docking* molecular: interação AL-02 com 3MTE.



Interactions

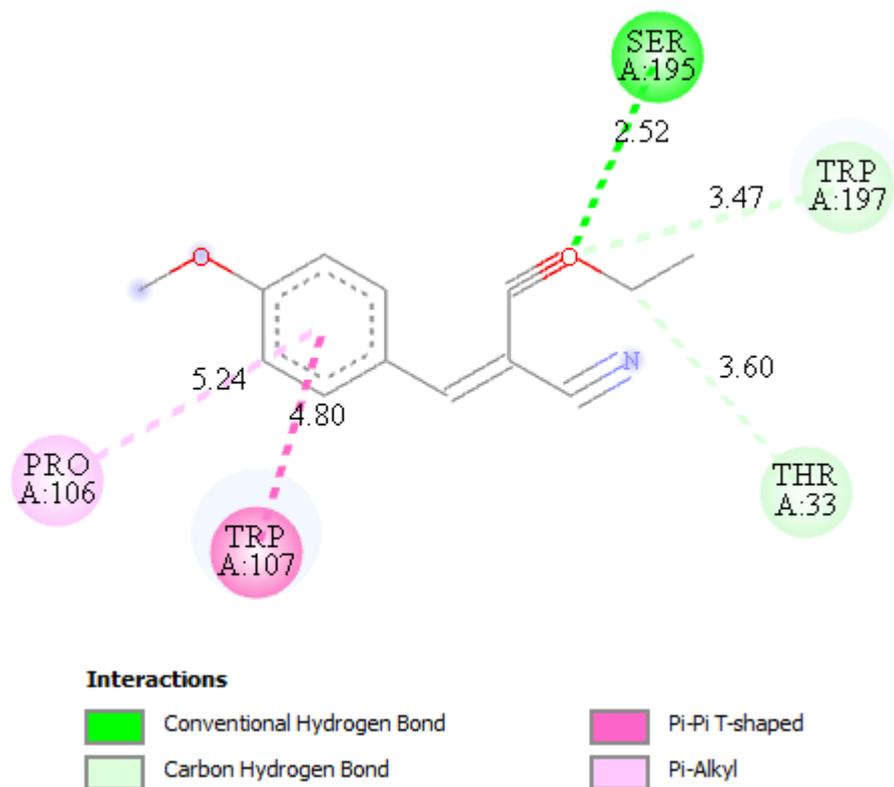
 Conventional Hydrogen Bond

 Pi-Pi T-shaped

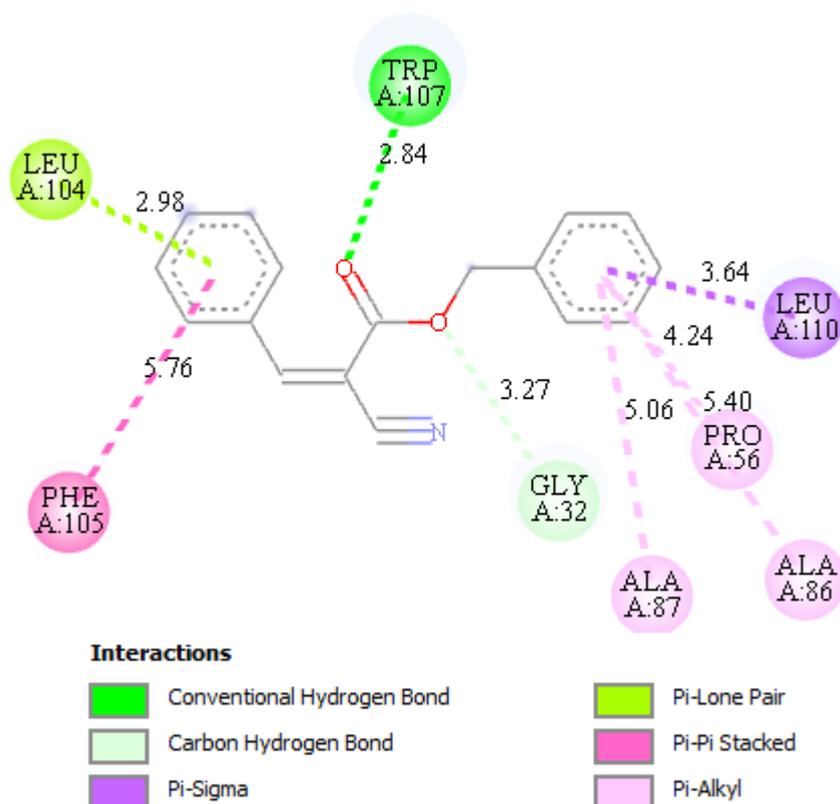
 Alkyl

 Pi-Alkyl

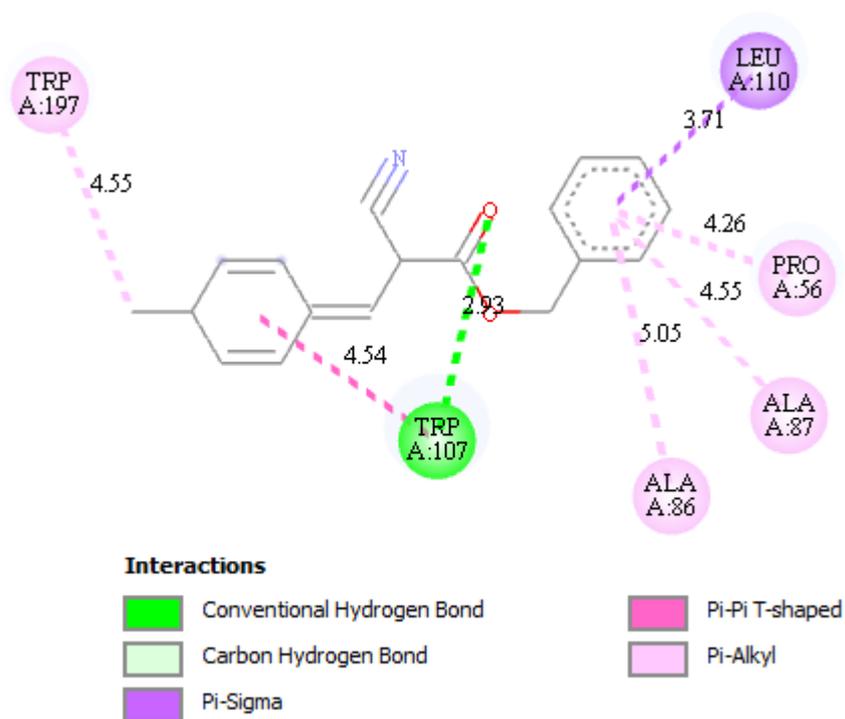
APÊNDICE A.39 – Docking molecular: interação AL-15 com 3MTE.



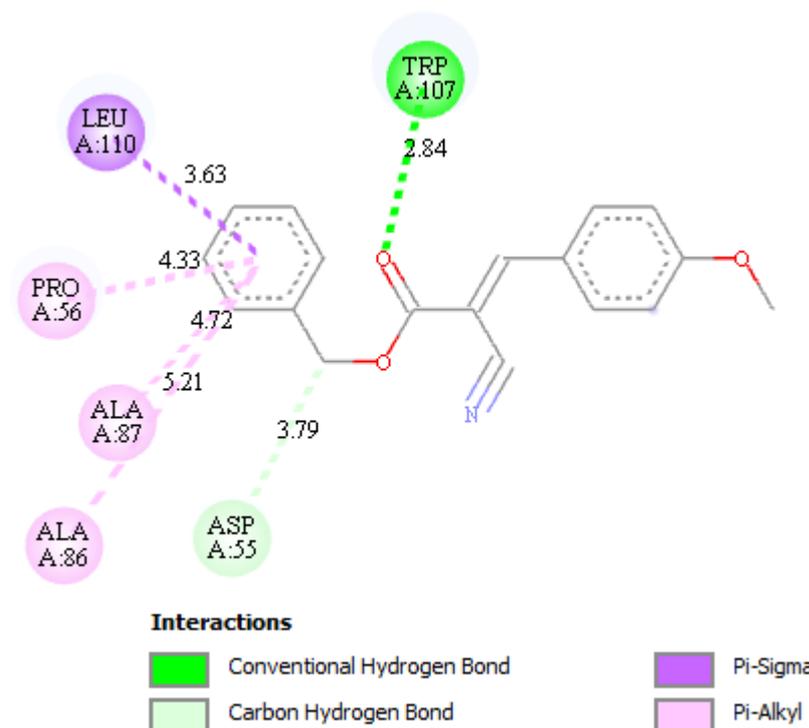
APÊNDICE A.40 – Docking molecular: interação APB-01 com 3MTE.



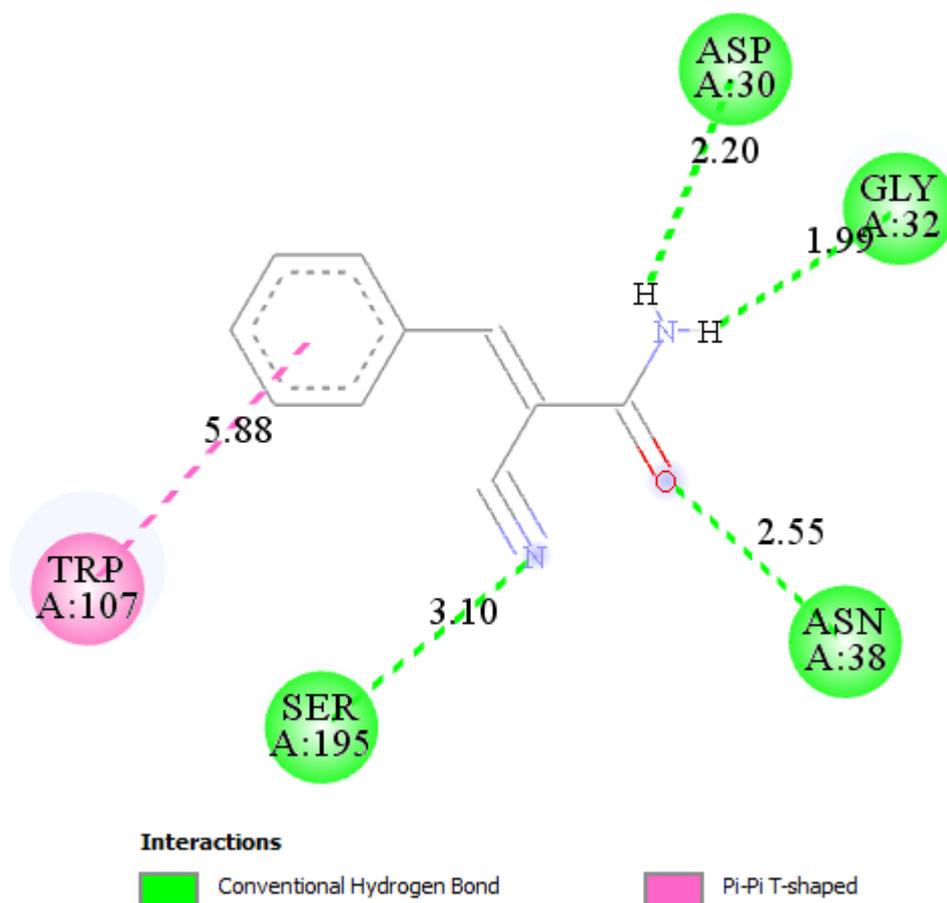
APÊNDICE A.41 – *Docking* molecular: interação APB-02 com 3MTE.



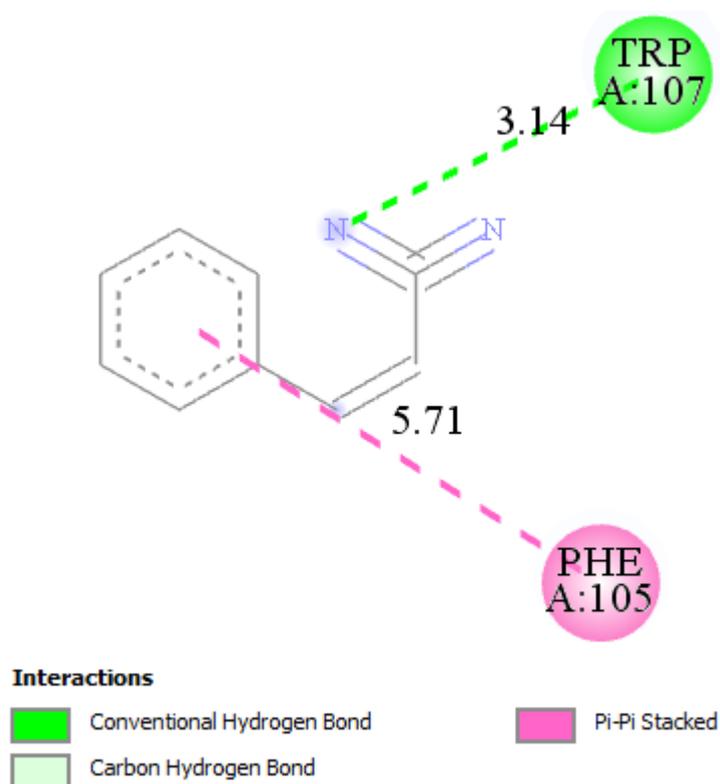
APÊNDICE A.42 – *Docking* molecular: interação APB-03 com 3MTE.



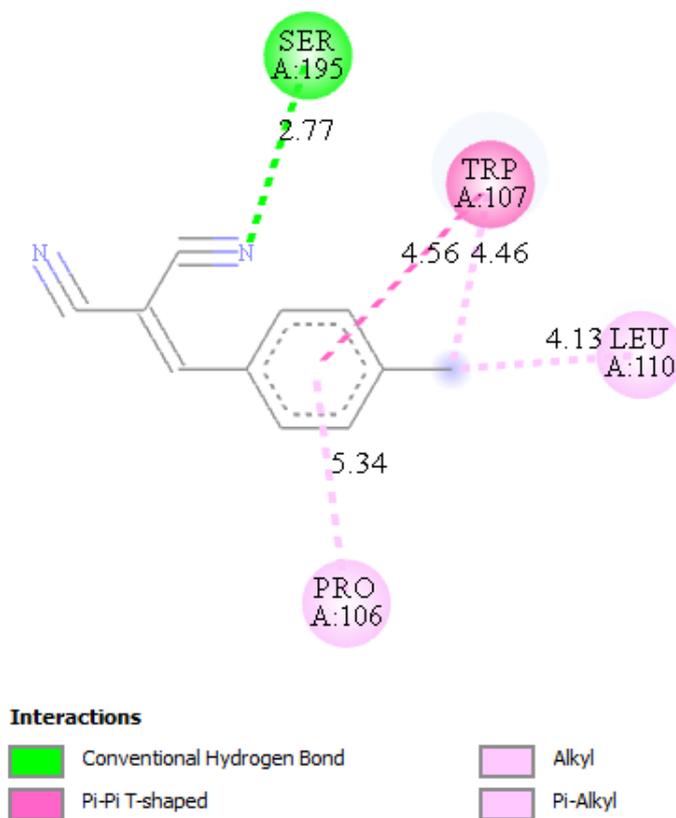
APÊNDICE A.43 – *Docking* molecular: interação APC-01 com 3MTE.



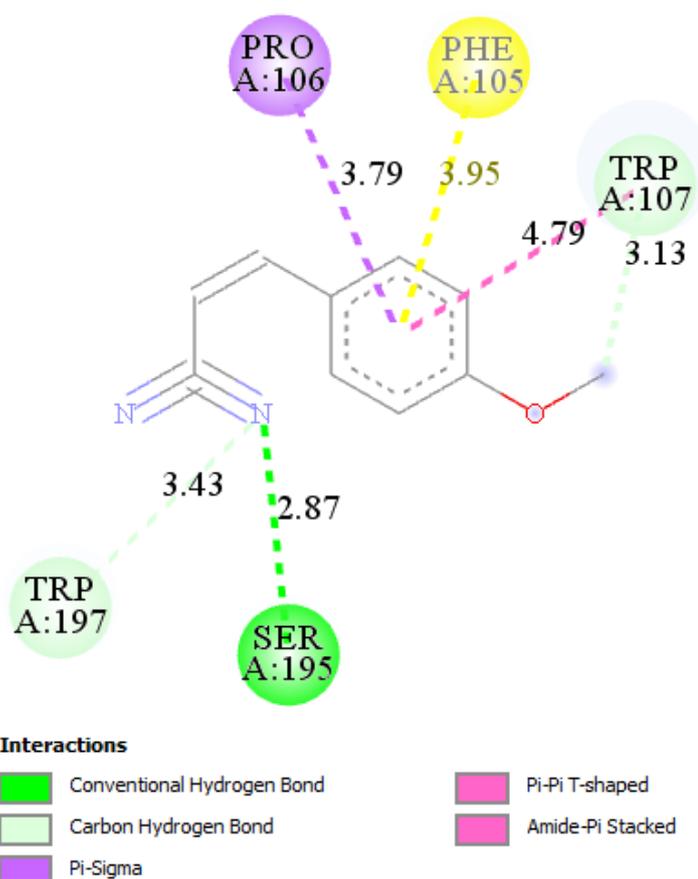
APÊNDICE A.44 – *Docking* molecular: interação APM-01 com 3MTE.



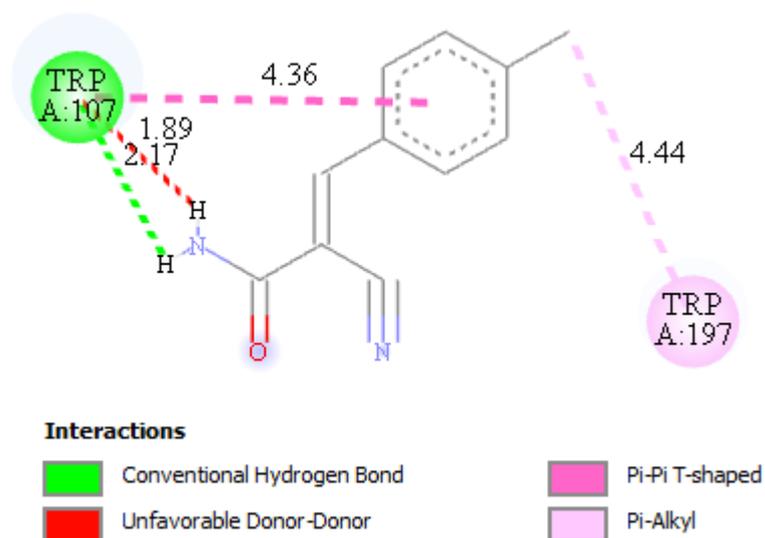
APÊNDICE A.45 – *Docking* molecular: interação APM-02 com 3MTE.



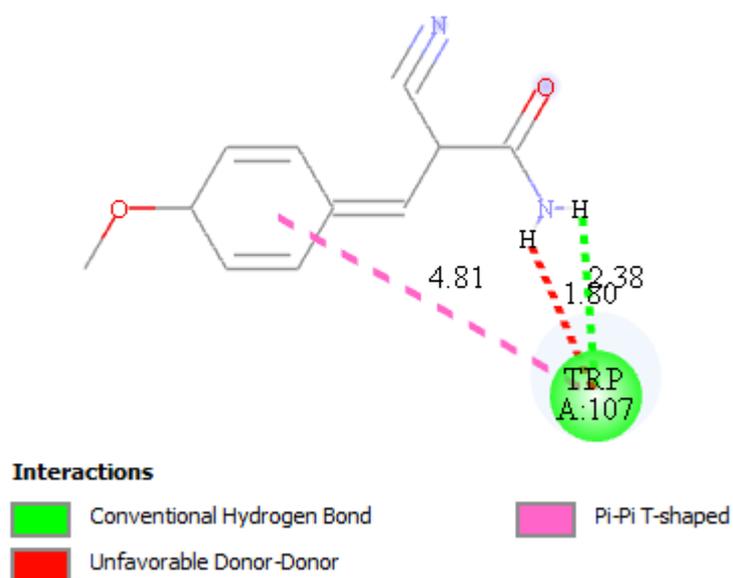
APÊNDICE A.46 – *Docking* molecular: interação APM-03 com 3MTE.



APÊNDICE A.47 – *Docking* molecular: interação EE-03 com 3MTE.

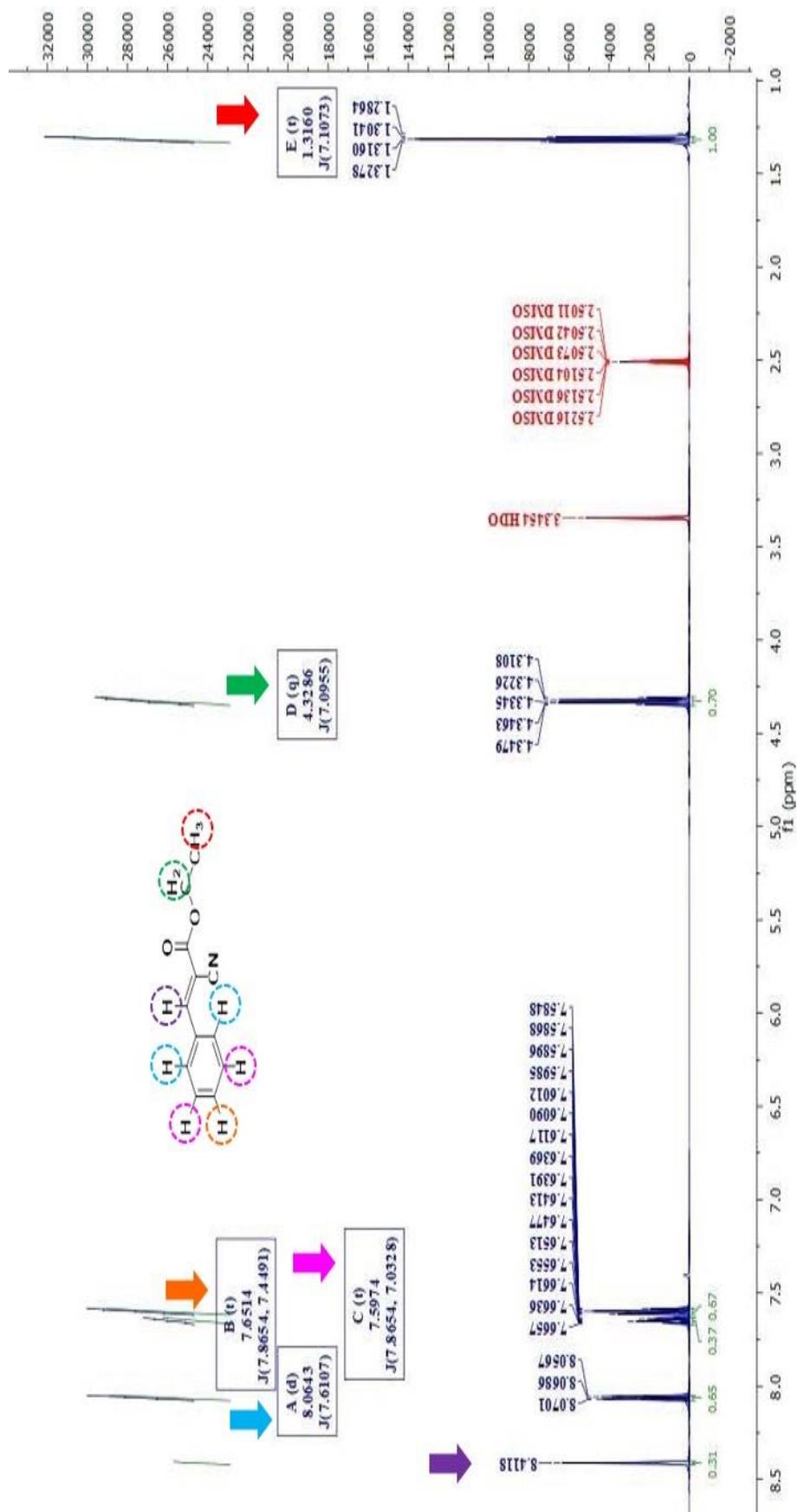


APÊNDICE A.48 – *Docking* molecular: interação EE-06 com 3MTE.

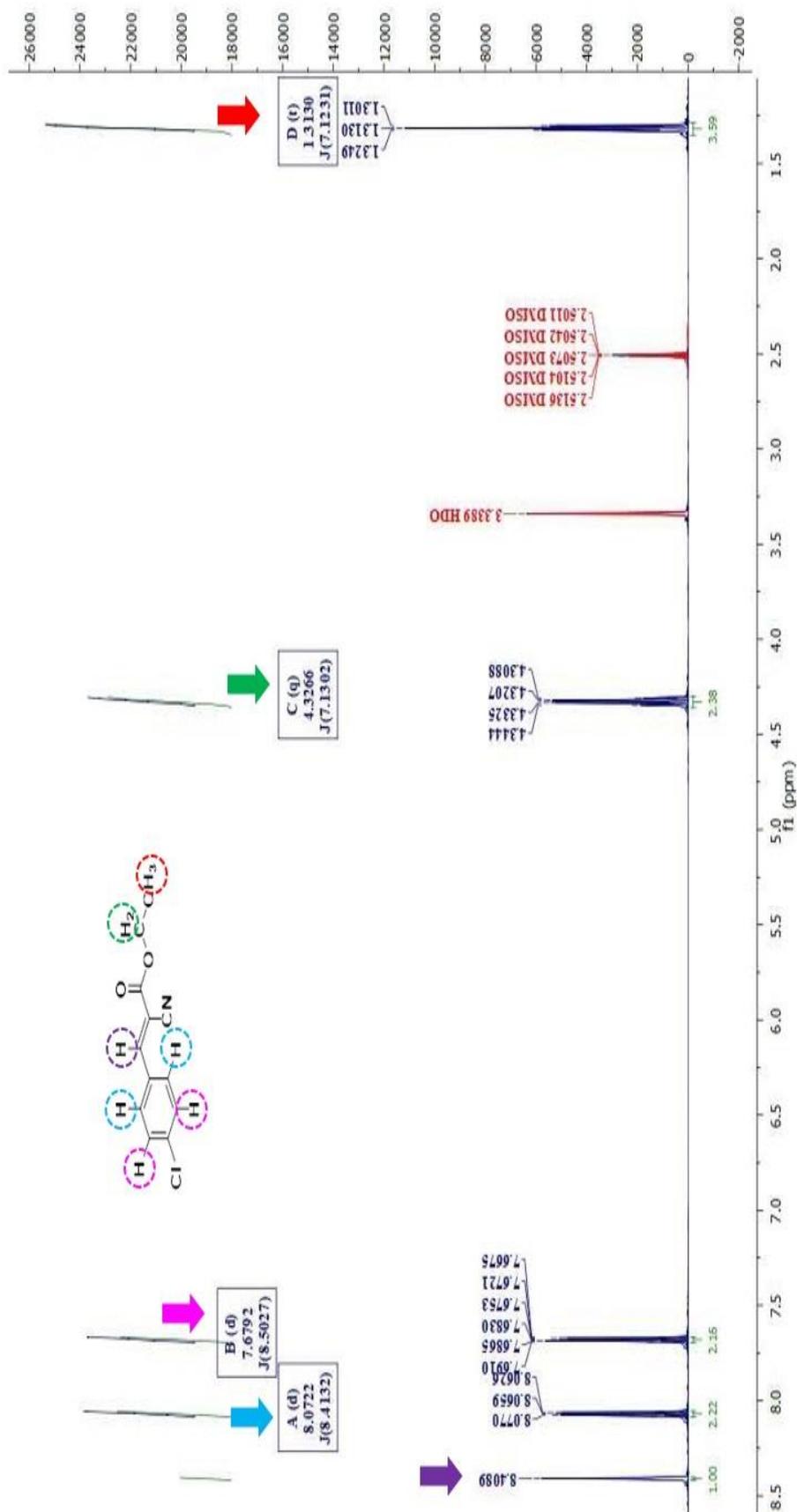


APÊNDICE B – ESPECTROS DE RMN

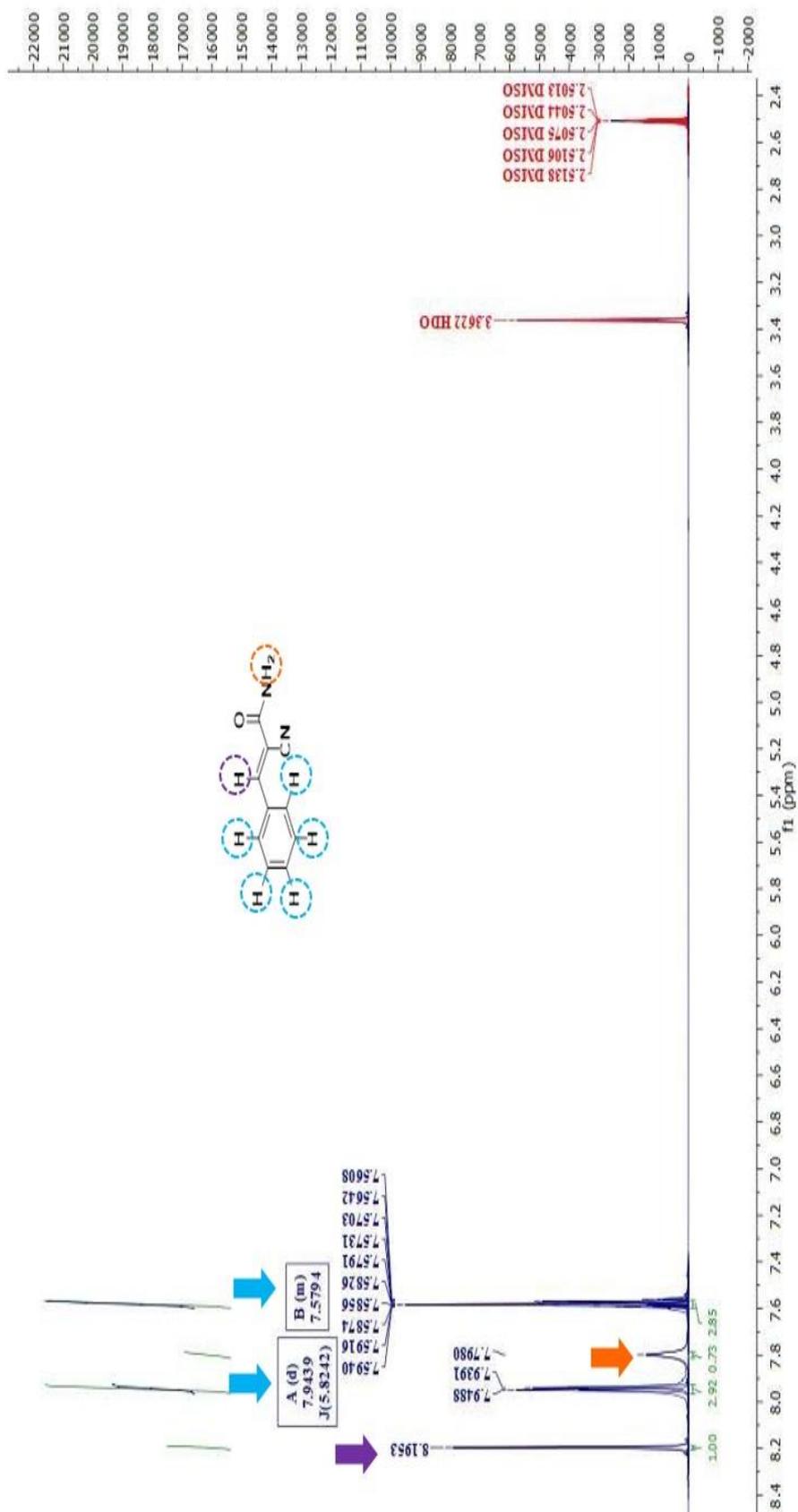
APÊNDICE B.1 – Espectros de RMN – ^1H do AL-01.



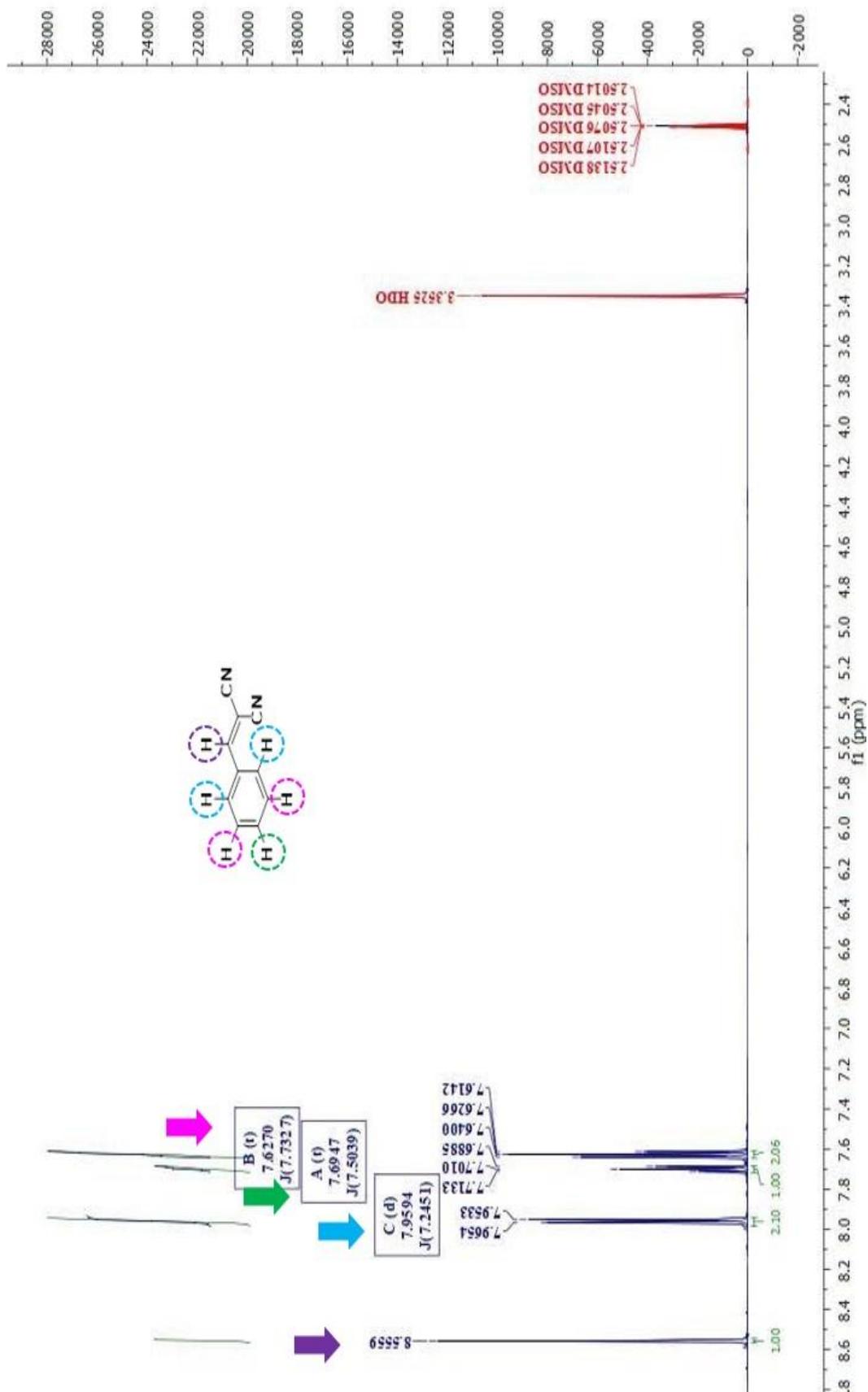
APÊNDICE B.2 – Espectros de RMN – ^1H do AL-02.



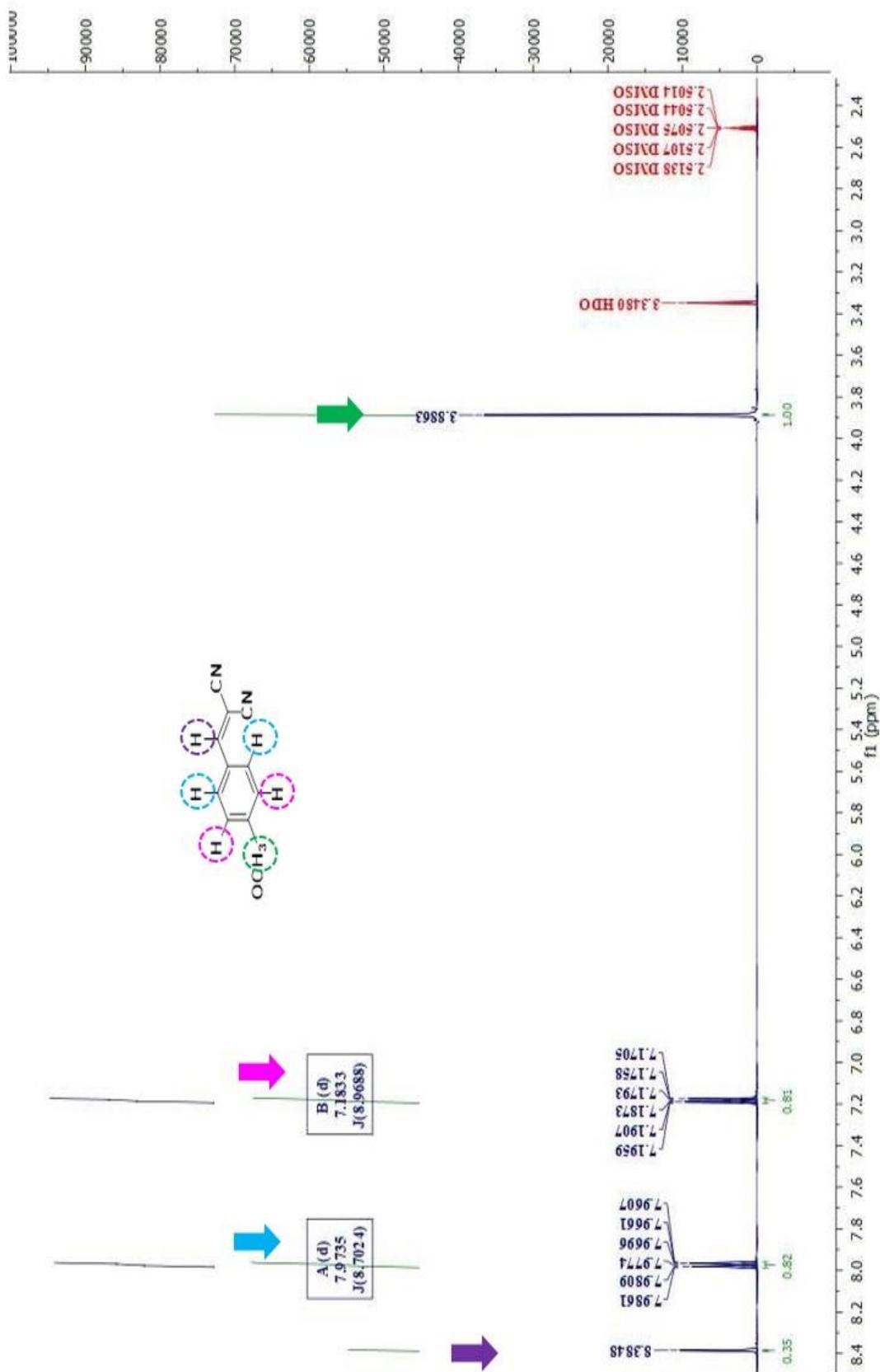
APÊNDICE B.3 – Espectros de RMN – ^1H do APC-01.



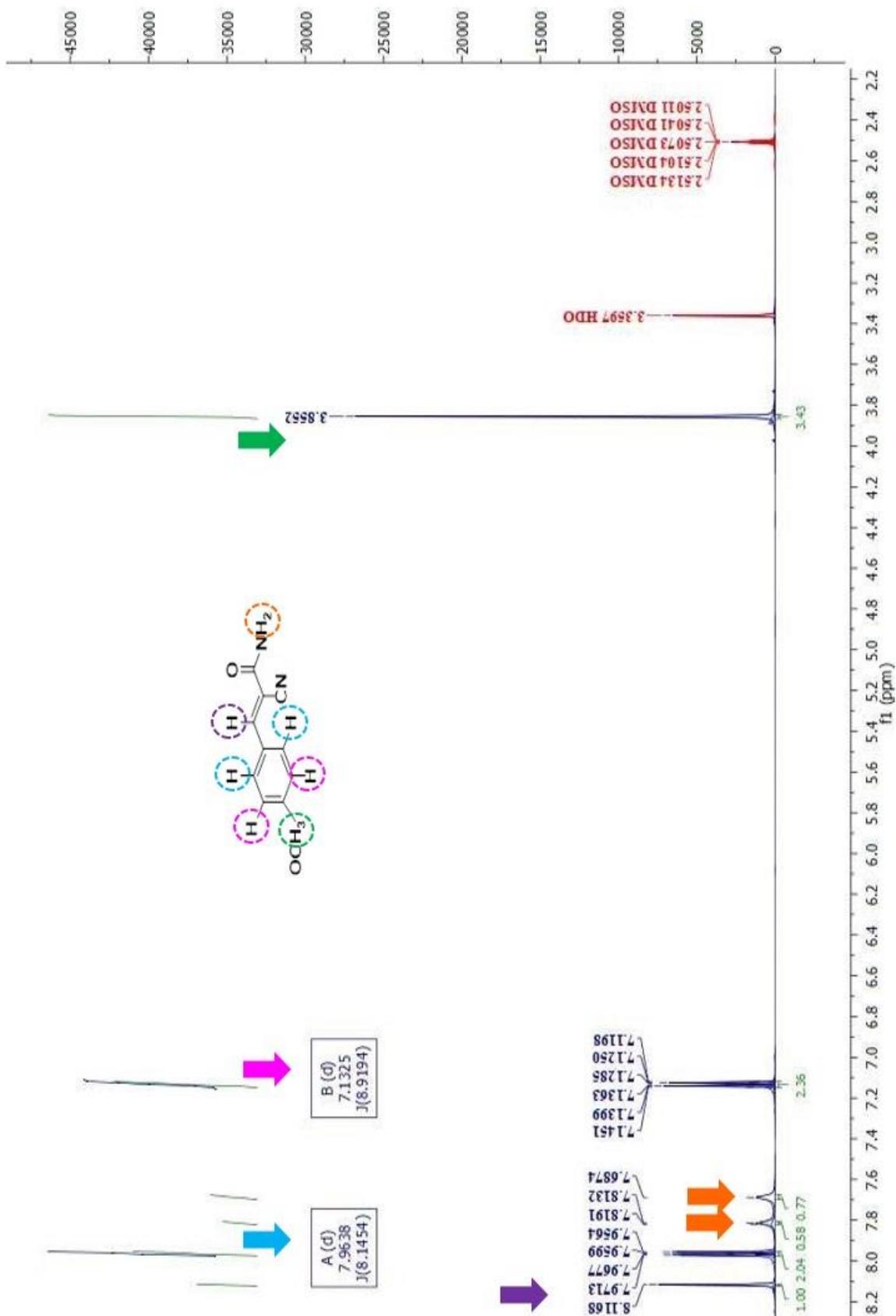
APÊNDICE B.4 – Espectros de RMN – ^1H do APM-01.



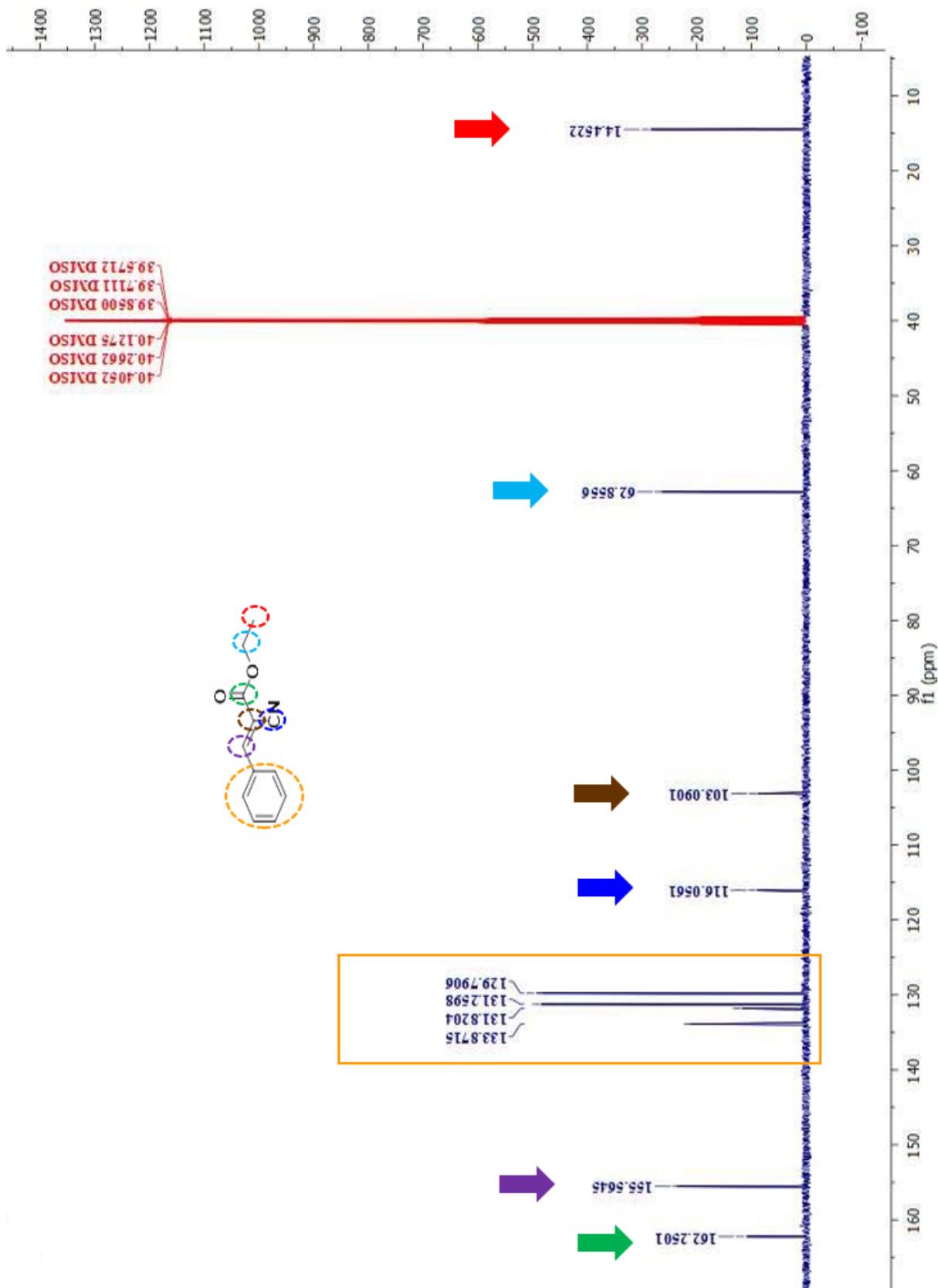
APÊNDICE B.5 – Espectros de RMN – ^1H do APM-03.

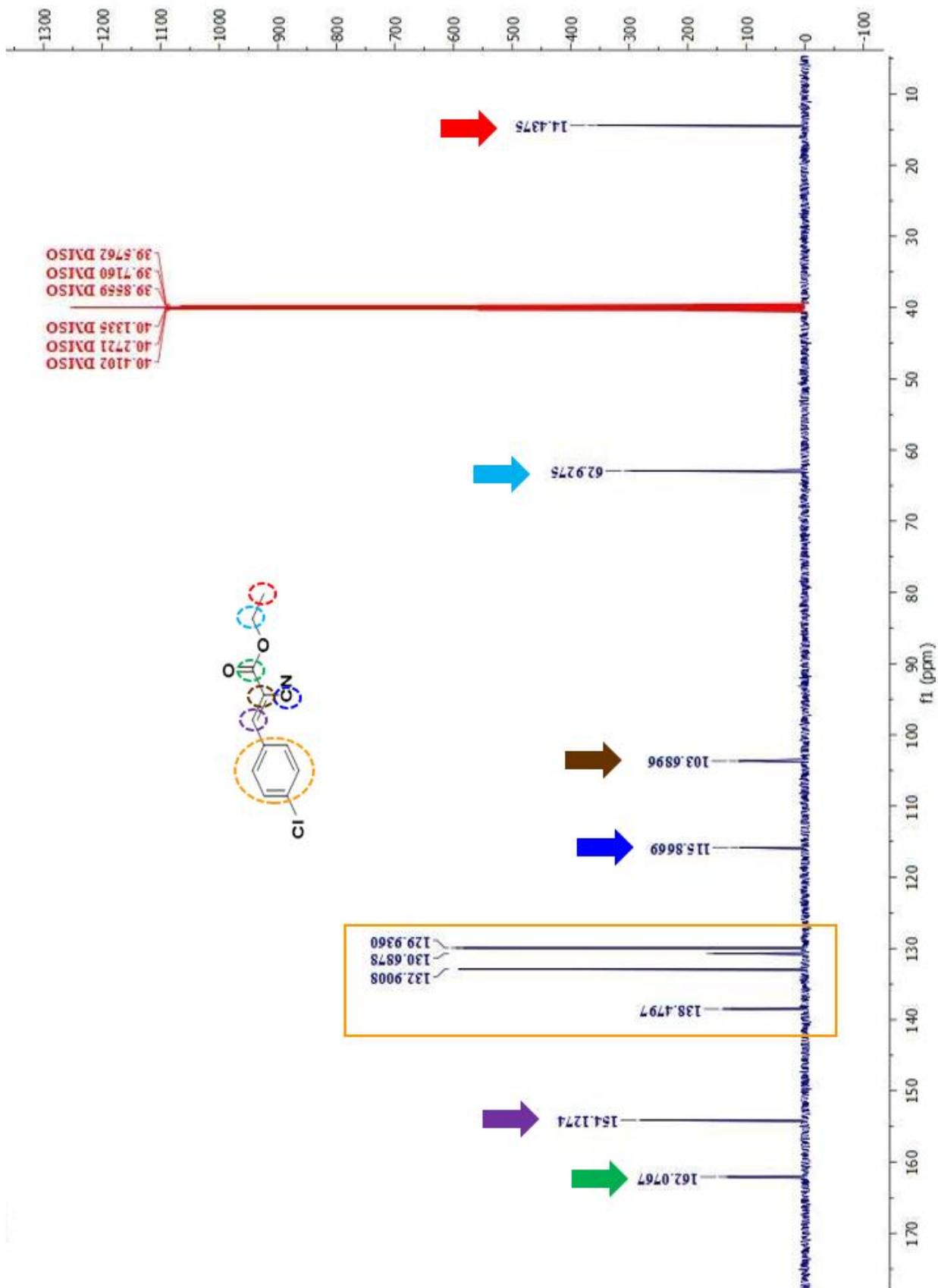


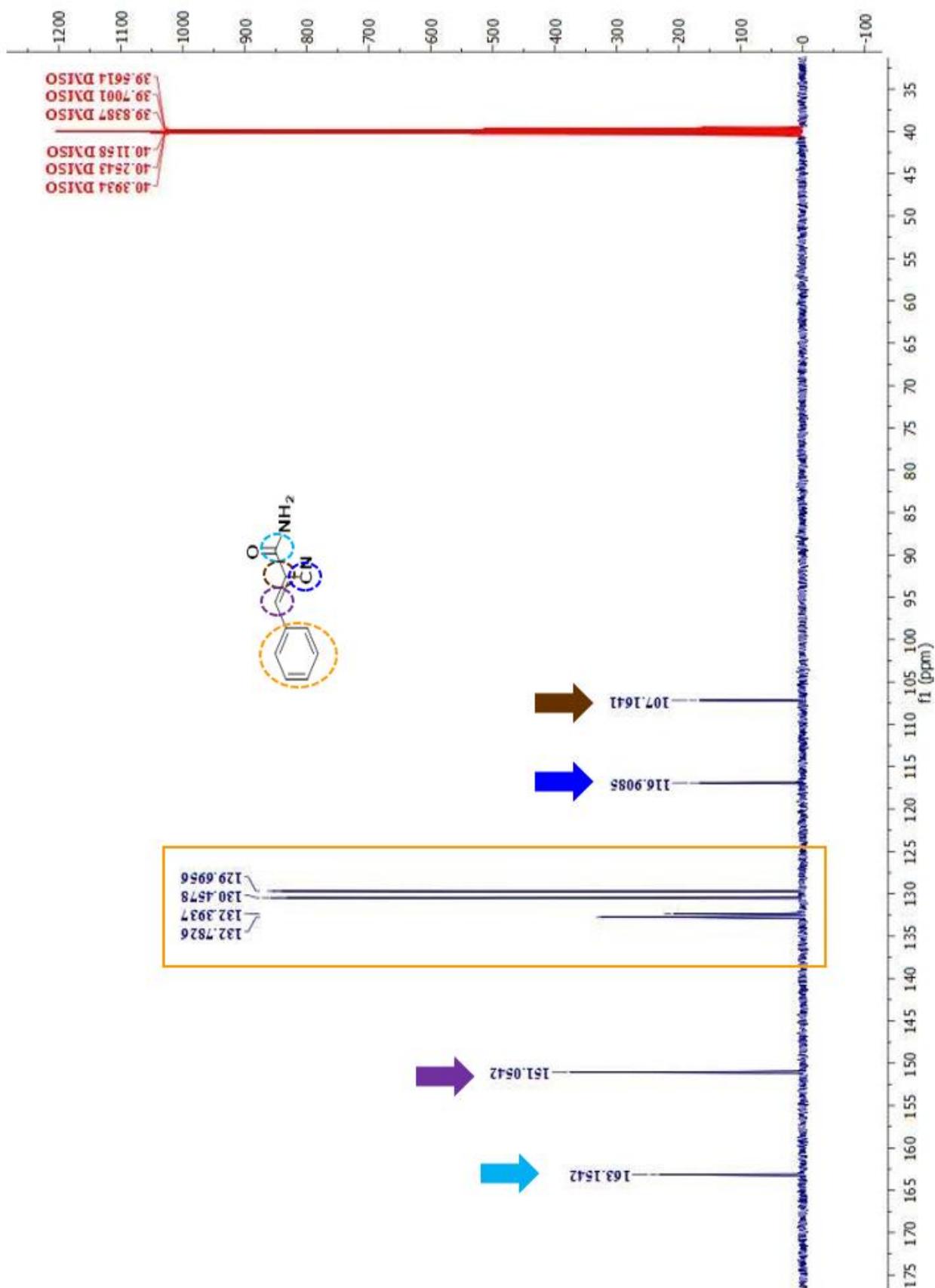
APÊNDICE B.6 – Espectros de RMN – ^1H do EE-06

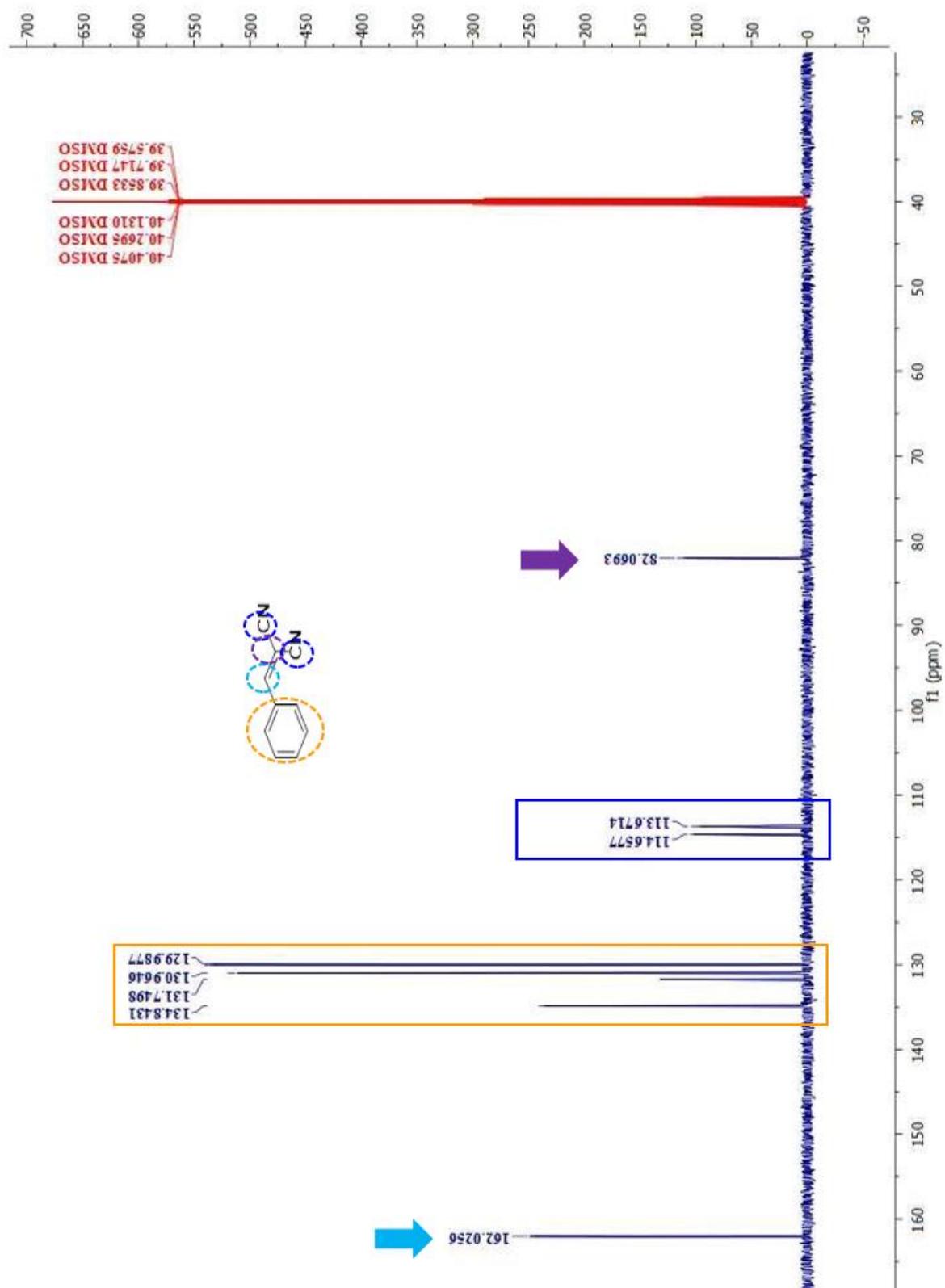


APÊNDICE B.7 – Espectros de RMN – ^{13}C do AL-01

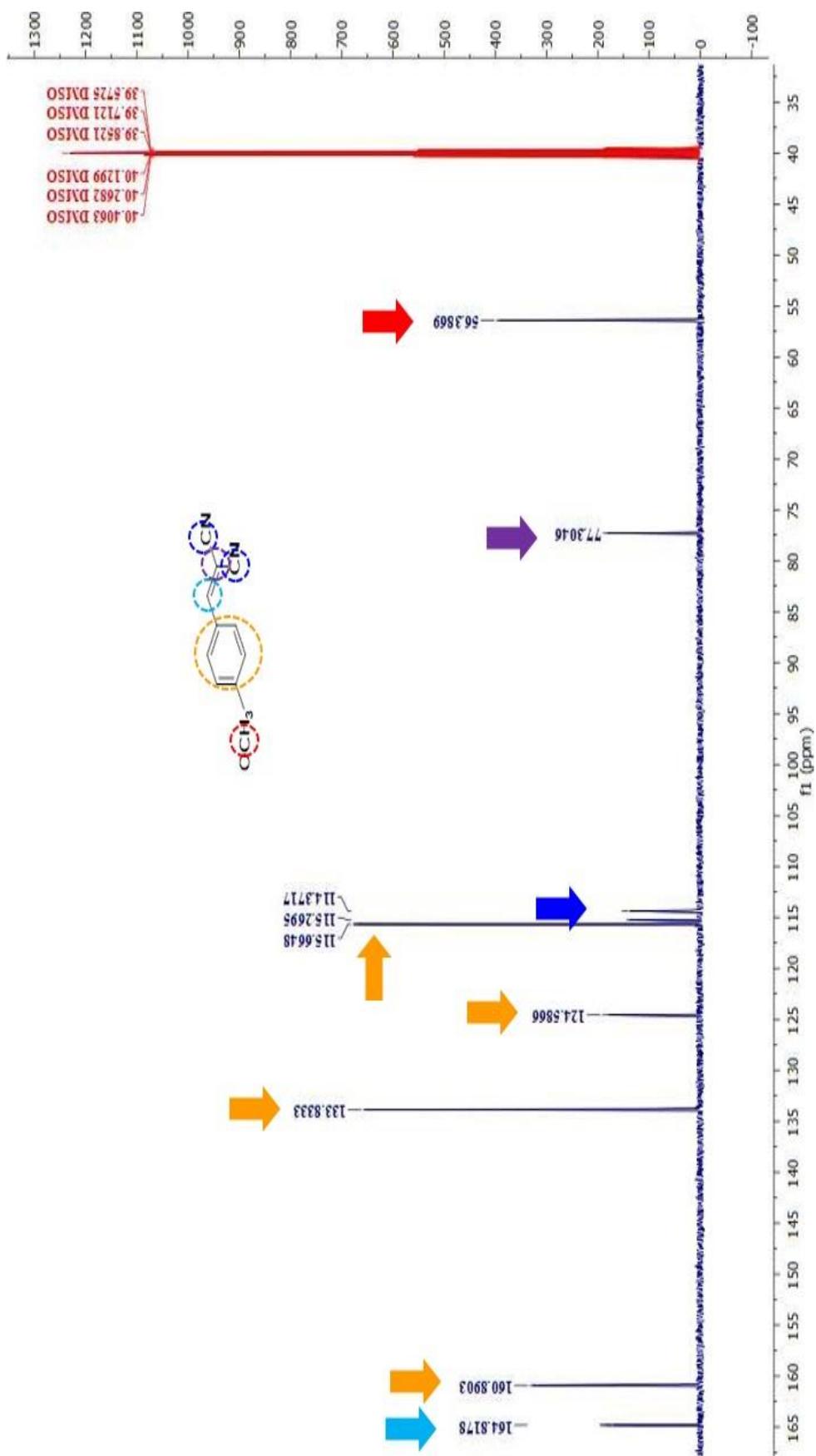


APÊNDICE B.8 – Espectros de RMN – ^{13}C do AL-02

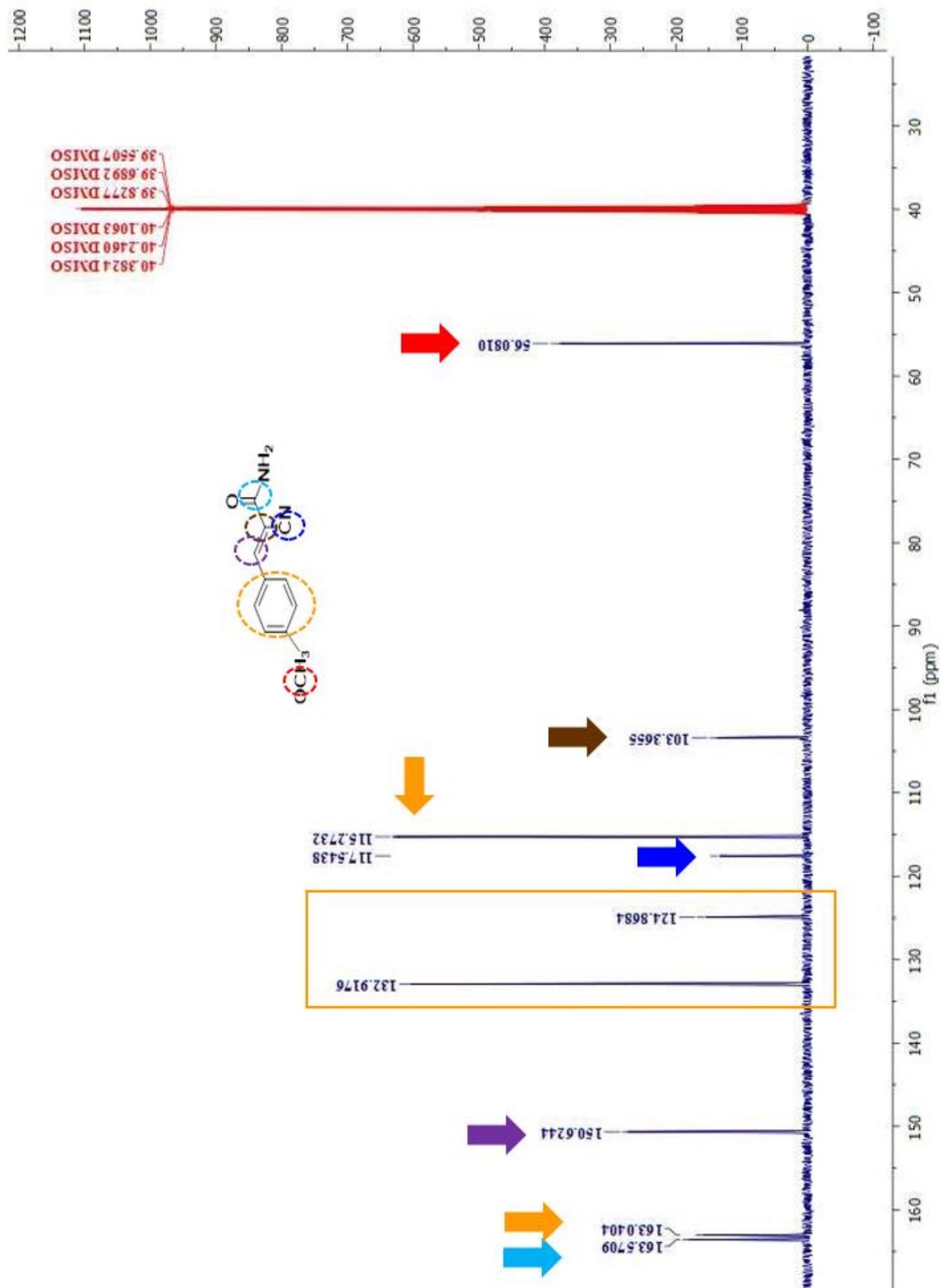
APÊNDICE B.9 – Espectros de RMN – ^{13}C do APC-01

APÊNDICE B.10 – Espectros de RMN – ^{13}C do APM-01

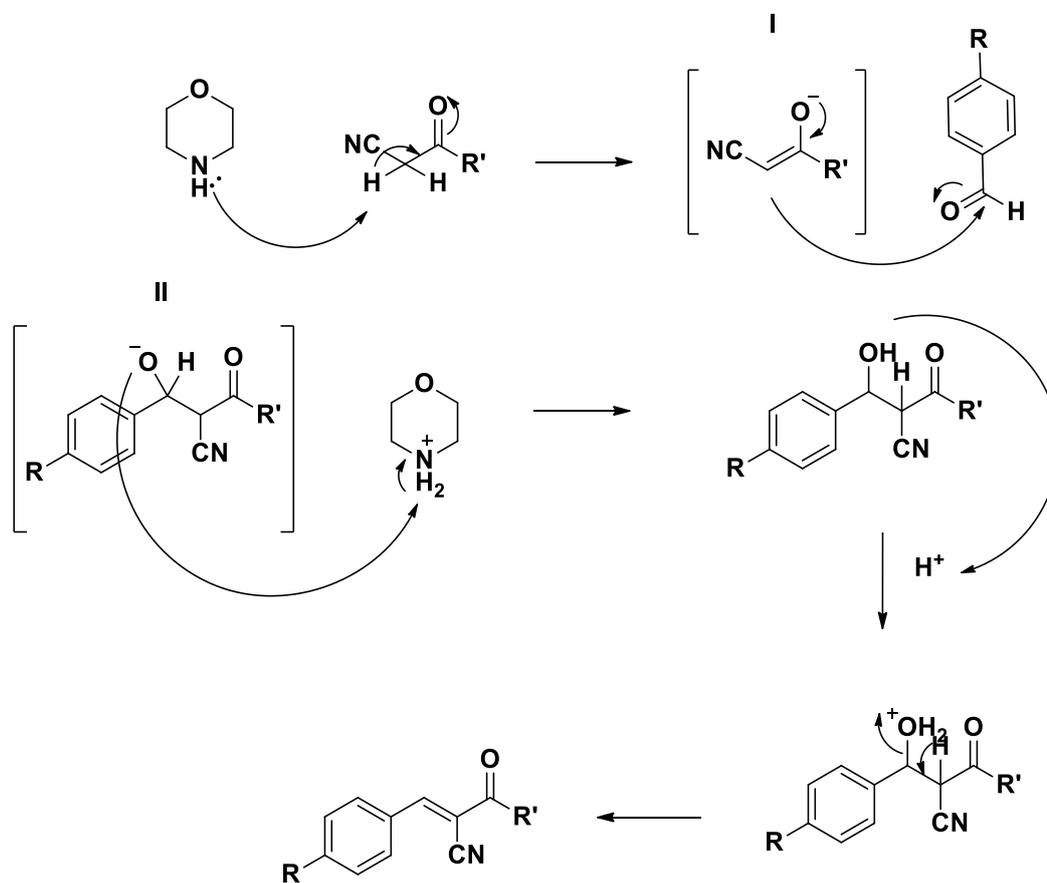
APÊNDICE B.11 – Espectros de RMN – ^{13}C do APM-03



APÊNDICE B.12 – Espectros de RMN – ^{13}C do EE-06



ANEXO C – MECANISMO REACIONAL PARA MORFOLINA



R= H, Cl, OCH₃

R'= OH, NH₂, OCH₃, OCH₂Ar