

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E  
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**LAÍSA VILAR CORDEIRO**

**Avaliação do efeito antibacteriano sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* e  
perfil citotóxico da 2-cloro-N-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida**

**João Pessoa – PB,  
2021**

**LAÍSA VILAR CORDEIRO**

**Avaliação do efeito antibacteriano sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* e perfil citotóxico da 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edeltrudes de Oliveira Lima**  
**Coorientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho**

**João Pessoa – PB,  
2021**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

C794a Cordeiro, Laisa Vilar.

Avaliação do efeito antibacteriano sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* e perfil citotóxico da 2-cloro-N-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida / Laisa Vilar Cordeiro. - João Pessoa, 2021.  
182 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.  
Coorientação: Abrahão Alves de Oliveira Filho.  
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Farmacologia. 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. 2-cloro-N-(4-flúor-3 nitrofenil)acetamida. 4. Antibacteriano. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II. Oliveira Filho, Abrahão Alves de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615:579.84(043)

**LAÍSA VILAR CORDEIRO**

**Avaliação do efeito antibacteriano sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* e perfil citotóxico da 2-cloro-N-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida**

Aprovada em: 13/07/2021

**Comissão examinadora**



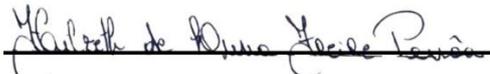
**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edeltrudes de Oliveira Lima**  
(Orientadora)



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francinalva Dantas de Medeiros**  
(Examinadora externa à UFPB)



**Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho**  
(Coorientador)



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hilzeth de Luna Freire Pessoa**  
(Examinadora externa ao PgPNSB)



**Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro**  
(Examinador interno ao PgPNSB)

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Margareth de Fátima F. Melo Diniz**  
(Membro suplente interno ao PgPNSB)



**Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida**  
(Examinador interno ao PgPNSB)

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lindomar de Farias Belém**  
(Membro suplente externo à UFPB)

## AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus pelo milagre da vida e por renovar minha fé todas as vezes que tenho a oportunidade de estudar algum processo biológico elucidado pela ciência e, assim, ser capaz de contemplar a perfeição dos detalhes da Sua criação. Sei que o que conhecemos hoje é uma minúscula parte da vida, mas é o suficiente para garantir-me a certeza de que ela não é orquestrada por acaso.

Agradeço à minha avó, Maria José (*in memoriam*), por todo seu imenso amor e cuidado, por sempre ter sido a maior incentivadora dos meus sonhos, por ter compartilhado comigo todos os seus preciosos ensinamentos (os quais certamente levarei por toda a vida) e por ter me mostrado que o melhor caminho a ser trilhado é através do conhecimento. Todas as minhas conquistas pessoais serão sempre dedicadas a ela.

Agradeço aos meus pais. Neste momento, em especial, por todos os investimentos realizados em meus estudos. Ao meu pai, Gecemar Cordeiro Júnior, por ter me apoiado e dado todo o suporte necessário para que eu tivesse a oportunidade de concentrar meus esforços em seguir minha realização profissional na vida acadêmica. E à minha mãe, Geórgia Gomes Limeira Vilar, por tantas vezes ter me dado forças durante essa trajetória, de extrema importância para conclusão desse processo.

Agradeço à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edeltrudes de Oliveira Lima, pela confiança em mim depositada, por ter aceitado me orientar durante o doutorado e por ter me dado autonomia durante a execução desse projeto. Sou grata pela forma leve e compreensiva com que ela sempre coordenou nosso grupo de pesquisa, fazendo com que os quatro anos de doutorado ocorressem da melhor forma possível. Agradeço também por todas as vezes que ela compartilhou comigo suas experiências de vida, sempre demonstrando muita praticidade, sabedoria, força e bondade. Certamente levarei características dessa orientação durante minha vida pessoal e profissional.

Agradeço ao Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho pela coorientação neste trabalho, por todo o auxílio prestado e por ter cedido o Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) para realização dos ensaios de análise de citotoxicidade. Agradeço também a todos os alunos de iniciação científica

por ele orientados, por toda ajuda na execução das análises e pela companhia nos dias dos experimentos.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Rosa de Oliveira, por toda a base sobre pesquisa científica que ela gentilmente me ajudou a construir durante o mestrado, a qual, sem dúvidas, fez toda diferença na minha formação. Por desenvolver em mim o raciocínio crítico para pesquisa e a atenção aos detalhes. Sou também imensamente grata por todos os ensinamentos de vida que ela compartilhou comigo, sempre de forma muito acalentadora e sábia. Principalmente, agradeço por todo suporte que me foi dado por ela quando passei por problemas delicados de saúde. Sem o auxílio dela eu certamente não estaria concluindo a etapa de doutorado hoje.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Priscila Marchi Salvador, pois foi minha primeira orientadora, durante a iniciação científica. Guiou-me pelos passos básicos (e extremamente importantes) na bancada e na escrita acadêmica, de forma que levo comigo até hoje.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Naila Francis Paulo de Oliveira pela orientação no estágio docência, por todos os conselhos e por tantos ensinamentos compartilhados comigo desde o mestrado, os quais foram de imensa importância para minha formação.

Agradeço ao Prof. Ulrich, pelo auxílio na padronização do experimento de biofilme.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para minha formação, nos mais diferentes níveis, das mais diferentes formas. Sempre fui uma grande admiradora dos meus professores, os tendo como verdadeiros heróis. E, a cada passo que dou no caminho da realização do meu sonho na docência, os admiro ainda mais. Sou grata por terem compartilhado comigo o “bem” mais precioso, que é o conhecimento, e espero que em breve possamos ser uma sociedade que valoriza verdadeiramente seus mestres.

Agradeço de forma especial a Helivaldo Diógenes pela parceria ao longo do doutorado, a qual sei que permanecerá para a vida. Sem dúvidas, essa tese não seria possível sem a ajuda dele. Por todas as incontáveis vezes que ele pacientemente sanou todas as minhas dúvidas, me auxiliou na parte escrita dos artigos, cedeu substâncias para teste e topou embarcar em todas as ideias de experimentos e artigos. Pelas noites viradas em claro para finalizar os trabalhos com prazo apertado, pelos congressos que ele me possibilitou levar materiais e por todo o apoio no

processo de pós-doutorado. Helivaldo é uma das pessoas mais generosas que eu já tive a honra de conhecer e sou muito grata pela oportunidade de tê-lo como amigo.

Agradeço a Aleson Pereira de Sousa, por ser um dos melhores amigos que eu poderia ter e pela fundamental importância dele durante a minha trajetória acadêmica. Não seria capaz de descrever em apenas um parágrafo todos os pontos pelos quais sou grata. De modo breve, agradeço por ele ser um parceiro científico incrível, que sempre me ajudou prontamente em todas as inúmeras situações em que precisei, ainda que fosse necessário abdicar de seus próprios afazeres para me auxiliar nos artigos, trabalhos e experimentos. Por todas as preciosas conversas e conselhos, por tantas vezes ouvir pacientemente meus desabaços, acalmar meu coração e me mostrar uma saída, não importando qual fosse o problema. Por sempre me incentivar e apoiar, contribuindo imensamente pro meu desenvolvimento. Aleson é, sem dúvidas, uma das pessoas que serve de inspiração diária para mim.

Agradeço profundamente a Lísia Fernandes, minha terapeuta e amiga, a qual me ajudou no momento mais delicado durante o doutorado e continua sendo peça fundamental na minha evolução pessoal. Sou grata por toda escuta, acolhimento, por todos os ensinamentos, conselhos e conversas transformadores. E, principalmente, por me fazer enxergar a vida sob um novo ângulo.

Agradeço a Pedro Thiago, pela companhia durante esses anos, por toda ajuda nos experimentos e na escrita, por ter me apoiado em todos os momentos difíceis e me escutado nas horas que mais precisei, por me incentivar a seguir na vida acadêmica e por acreditar em mim.

Agradeço a todos os meus familiares que de alguma forma contribuíram para realização dessa etapa em minha vida. Principalmente, agradeço aos meus irmãos, Lucas e Gabriel, pela convivência diária e, conseqüentemente, por lidarem com meus momentos de estresse durante muitas vezes. Certamente não posso deixar de agradecer também a Aquiles, meu “cãopanheiro” de inúmeras madrugadas estudando. A presença dele foi um divisor de águas em meu ambiente familiar e despertou em mim o amor de uma forma que eu ainda não conhecia. Todos os dias aprendo novas lições com ele e serei sempre muito grata por sua existência se traduzir em alegria em minha vida.

Agradeço a todos os meus amigos que verdadeiramente torcem pela minha felicidade e realização pessoal. MUITÍSSIMO obrigada por contribuírem para minha formação. Não citarei nomes específicos neste parágrafo, mas deixo aqui clara a

minha gratidão profunda por todos os diferentes tipos de engrandecimento que uma verdadeira amizade é capaz de trazer.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório. Em especial, a Francisco Júnior, pela amizade, por me incentivar nos processos de publicação e ter me incluído em novos grupos de trabalho. Além disso, agradeço por todas as vezes em que conversamos e ele me fez enxergar situações que sozinha eu não teria percebido. Por todas as escutas e pelos conselhos. Por me mostrar um novo modo de pensar. Ele foi parte fundamental do meu processo de desenvolvimento pessoal durante o doutorado, e serei sempre muito grata por isso.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular e ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, por terem me dado todo suporte para obtenção do título de Mestre e Doutora, respectivamente. Agradeço a todos os docentes e funcionários que compõem esses Programas, mantendo a ciência acontecendo nas Universidades Federais, mesmo em tempos tão difíceis.

Agradeço imensamente a Nilmar Nincia Neves de Medeiros e Caroline Medeiros Mangueira, secretárias do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, por todas as vezes que elas pacientemente sanaram todas as dúvidas e prestaram todos os auxílios necessários, estando sempre disponíveis para ajudar os alunos e professores da melhor forma possível. Carol é, em minha opinião, um exemplo de servidora pública, na qual muito me inspiro.

Agradeço à Regina Emy Sales de Miranda, secretária do Departamento de Biologia Molecular da UFPB, por todo o auxílio prestado durante as vezes que precisei. Sempre de forma muito rápida, eficaz e gentil.

Agradeço ao Departamento de Biologia Molecular da UFPB e ao Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima, por terem disponibilizado o laboratório multiusuário e seus equipamentos, para execução desta pesquisa.

Agradeço à Pró-reitoria de Pesquisa (Propesq) da UFPB, em especial ao Luan Ribeiro Mattos, por toda paciência e ajuda que ele forneceu nos processos de publicação dos artigos científicos.

Agradeço a todos os servidores da UFPB, que mantêm o funcionamento da Universidade com muito zelo e compromisso. Em especial, agradeço à Renata, Bernadete, Rayane e Fátima, vinculadas ao Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) da UFPB, que me auxiliaram durante a execução desta pesquisa. Agradeço

também à Dona Fátima e todo o pessoal responsável pela limpeza do DCF, por toda a ajuda sempre que foi necessário e por manterem nosso ambiente diário impecavelmente limpo e organizado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por concederem os recursos financeiros necessários para execução deste trabalho.

À Universidade Federal da Paraíba, por ter sido minha segunda casa durante esses 11 anos de jornada acadêmica. Sou grata pela minha formação na instituição e serei uma eterna defensora do ensino público, gratuito e de qualidade.

Agradeço à banca examinadora por aceitarem o convite para avaliação desta pesquisa e pelas contribuições realizadas. Sou grata por participarem deste momento tão especial em minha vida e colaborarem para o meu desenvolvimento profissional.

Acredito veementemente que ninguém é capaz de alcançar uma conquista, como a conclusão de um doutorado, sozinho. Sou imensamente grata a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para essa etapa em minha vida. A todos aqueles cujos nomes faltaram-me à memória, mas que passaram por mim deixando marcas que colaboram para o meu desenvolvimento, o meu muito obrigada.

## RESUMO

As bactérias da espécie *Klebsiella pneumoniae* estão entre os patógenos oportunistas de maior relevância clínica. Estima-se que essa espécie, sozinha, seja responsável por aproximadamente um terço do total das infecções causadas por bactérias Gram-negativas em geral. É também uma importante espécie formadora de biofilmes e fonte de resistência aos antibióticos, o que traz desafios no tratamento das infecções causadas pela espécie. Autoridades de saúde enfatizam a necessidade crítica de desenvolver novos fármacos para combater infecções causadas por este patógeno. Estudos demonstraram potencial antimicrobiano de derivados acetamidas, entretanto, a 2-cloro-*N*-(4-flúor-3 nitrofenil)acetamida é uma substância pertencente a esse grupo para a qual ainda não há relatos de atividade antibacteriana encontrados na literatura. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antibacteriano da substância sobre cepas de *K. pneumoniae* e também analisar seu perfil citotóxico. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi de 512 µg/mL sobre todas as cepas de *K. pneumoniae* utilizadas no estudo. A substância apresentou atividade bactericida a partir da CIM, com Concentração Bactericida Mínima (CBM) também de 512 µg/mL. A análise por docking molecular sugere a ação sobre a parede celular bacteriana e o cloro presente na estrutura química ajuda na estabilização da molécula no sítio ativo, sendo tais dados reforçados pela observação de lise celular promovida pela acetamida *in vitro*. Também foi observada morte celular das cepas de *K. pneumoniae* após 6h de tratamento na concentração de 1024 µg/mL da acetamida. Os efeitos citotóxicos e mutagênicos *in vitro*, bem como a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos *in silico*, sugerem bom potencial para análise futura da aplicação *in vivo*. A 2-cloro-*N*-(4-flúor-3 nitrofenil)acetamida resultou em efeitos favoráveis quando administrada em combinação com antibacterianos, promovendo aditividade e sinergismo de ação sobre *K. pneumoniae*. Além disso, observou-se um efeito antibiofilme pronunciado, sendo a substância capaz de atuar de modo eficaz sobre biofilmes formados pela espécie. Assim, esse trabalho serve como base para que futuras perspectivas sejam traçadas sobre a aplicação clínica de 2-cloro-*N*-(4-flúor-3 nitrofenil)acetamida no tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae*.

**Palavras-chave:** *Klebsiella pneumoniae*. 2-cloro-*N*-(4-flúor-3 nitrofenil)acetamida. Antibacteriano.

## ABSTRACT

*Klebsiella pneumoniae* bacteria are opportunistic pathogens of great clinical relevance. It is estimated that this species is responsible for approximately one third of the total infections caused by Gram-negative bacteria in general. It is also an important biofilm-forming species and a source of antibiotic resistance, which poses challenges in the treatment of infections caused by the species. Health agencies emphasize the critical need to develop new drugs to fight infections caused by this pathogen. Studies have shown antimicrobial potential of acetamide derivatives, however, 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide is a substance belonging to this group for which there are still no reports of antibacterial activity found in the literature. Based on this, the objective of this study was to evaluate the antibacterial effect of the substance on *K. pneumoniae* strains and also to analyze its cytotoxic profile. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was 512 µg/mL against all strains of *K. pneumoniae* used in the study. The substance showed bactericidal activity from the MIC, with Minimum Bactericidal Concentration (MBC) also 512 µg/mL. The analysis by molecular docking suggests the action on the bacterial cell wall and the chloro present in the chemical structure helps in the stabilization of the molecule at the active site, such data being reinforced by the observation of cell lysis promoted by acetamide *in vitro*. Cell death of *K. pneumoniae* strains was also observed after 6 hours of treatment at 1024 µg/ mL of acetamide concentration. The cytotoxic and mutagenic effects *in vitro*, as well as the assessment of pharmacokinetic parameters *in silico*, suggest good potential for future analysis of *in vivo* application. 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide resulted in favorable effects when administered in combination with antibacterials, promoting additivity and synergism of action on *K. pneumoniae*. In addition, a pronounced antibiofilm effect was observed, the substance being able to act effectively on biofilms formed by the species. Thus, this work serves as a basis for future perspectives to be drawn on the clinical application of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide in the treatment of infections caused by *K. pneumoniae*.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*. 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide. Antibacterial.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Bacilos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> analisados sob microscopia óptica comum. ....	15
Figura 2 – Fatores de virulência de <i>K. pneumoniae</i> .....	18
Figura 3 - Etapas de formação e estrutura do biofilme bacteriano .....	23
Figura 4 - Estrutura química de 2-cloro- <i>N</i> -(4-flúor-3 nitrofenil)acetamida .....	29
Figura 5 - Estrutura química das substâncias <i>N</i> -(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida (A1) e 2-cloro- <i>N</i> -(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida (A2) .....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1	<i>N</i> -(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida
A2	2-cloro- <i>N</i> -(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
cKP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> clássica
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetil-sulfóxido
ESBL	<i>Extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamases</i>
hvKP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> hipervirulenta
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>14</b>
2.1	GÊNERO <i>Klebsiella</i> COMO PATÓGENO HUMANO .....	14
2.2	FARMACOTERAPIA ANTIBACTERIANA E SEUS DESAFIOS .....	25
2.3	ACETAMIDAS COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS .....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1	LOCAIS DA PESQUISA .....	31
4.2	MEIOS DE CULTURA .....	31
4.3	CEPAS BACTERIANAS .....	31
4.4	INÓCULO .....	32
4.5	OBTENÇÃO DA N-(4-FLÚOR-3-NITROFENIL)ACETAMIDA E 2-CLORO-N-(4-FLÚOR-3-NITROFENIL)ACETAMIDA .....	32
4.6	ANTIBACTERIANOS PADRÕES.....	34
4.7	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	34
4.8	DOCKING MOLECULAR.....	35
4.9	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) ...	35
4.10	CINÉTICA DE MORTE BACTERIANA.....	36
4.11	EFEITO SOBRE A INTEGRIDADE CELULAR .....	36
4.12	HEMÁCIAS E CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL .....	37
4.13	ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	37
4.14	ATIVIDADE ANTI-HEMOLÍTICA.....	37
4.15	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS .....	38
4.16	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS .....	38
4.17	EFEITO DA ASSOCIAÇÃO COM ANTIBACTERIANOS-PADRÕES .....	39
4.18	CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME .....	40
4.19	CAPACIDADE DE AÇÃO SOBRE BIOFILME PRÉ-FORMADO .....	40
4.20	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>

5.1	Potential of 2-chloro- <i>N</i> -(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide against <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>in vitro</i> toxicity analysis .....	42
5.2	Effect of 2-chloro- <i>N</i> -(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide in combination with antibacterial drugs against <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	65
5.3	Potential of 2-chloro- <i>N</i> -(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide against <i>Klebsiella pneumoniae</i> biofilms .....	91
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>106</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>107</b>
	<b>APÊNDICE – PRODUÇÃO ACADÊMICA.....</b>	<b>114</b>
	<b>ANEXO – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>177</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Klebsiella pneumoniae* é a espécie pertencente à família Enterobacteriaceae na qual as bactérias caracterizam-se como bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, imóveis e capsulados (OCTAVIA; LAN, 2014). Essa espécie pode ser encontrada em diversos nichos ecológicos, como solo, água e sendo saprófita de vários organismos. Na espécie humana, compõe a microbiota intestinal e nasofaríngea (WYRES; LAM; HOLT, 2020). Além disso, é também um dos principais patógenos oportunistas, sendo responsável por, aproximadamente, 10% das infecções nosocomiais causadas por bactérias e por um terço do total das infecções causadas por Gram-negativas em geral (BROWN; CORNFORTH; MIDEO, 2012; NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017).

Esse microrganismo é capaz de causar infecções hospitalares e também comunitárias, promovendo uma ampla gama de manifestações clínicas diferentes (MARTIN; BACHMAN, 2018; WYRES; LAM; HOLT, 2020). O surgimento e disseminação de cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae*, as quais superexpressam de fatores de virulência como cápsula e sideróforos, tem impactado diretamente na prática clínica, trazendo um desafio no tratamento dessas infecções (PIPERAKI *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2017). A espécie também é capaz de formar biofilmes bacterianos e essas estruturas complexas, dinâmicas e amorfas, envoltas por uma matriz extracelular, lhes garante resistência não só contra o sistema imune do hospedeiro, como também contra os antibacterianos. Uma vez estabelecidos, os biofilmes são de difícil remoção e estão relacionados com infecções persistentes e insucessos terapêuticos (MUHAMMAD *et al.*, 2020).

Além disso, agravando o manejo das infecções causadas por *K. pneumoniae*, essa espécie também é uma importante fonte de resistência aos antibióticos, apresentando uma grande capacidade de adquirir plasmídeos com genes que lhes conferem resistência a múltiplos antibacterianos. A escassez de fármacos disponíveis para o tratamento de cepas multirresistentes faz com que seja necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas contra *K. pneumoniae* (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; WYRES; HOLT, 2018).

Nesse contexto, observando o crescimento dos fármacos sintéticos no combate às infecções bacterianas (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014), as acetamidas destacam-se como uma possível fonte para obtenção de novas moléculas bioativas,

pois são relacionadas a diversas atividades biológicas como antibacteriana, antiviral e antifúngica. Em especial, as cloroacetamidas demonstram bons resultados sobre bactérias Gram-positivas e negativas (BRAVO *et al.*, 2003; KATKE *et al.*, 2011; ASCHALE, 2012; PATEL *et al.*, 2013).

A 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida é uma acetamida sintética utilizada como intermediário reacional (PEIXOTO *et al.*, 2016), sobre a qual não existem relatos que descrevam atividade antimicrobiana. Assim, esse trabalho analisou, através de métodos *in vitro* e *in sílico*, o potencial de 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida como agente antibacteriano contra *K pneumoniae*, além de investigar seus efeitos citotóxicos, a fim de contribuir para viabilização de um novo medicamento antibacteriano.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

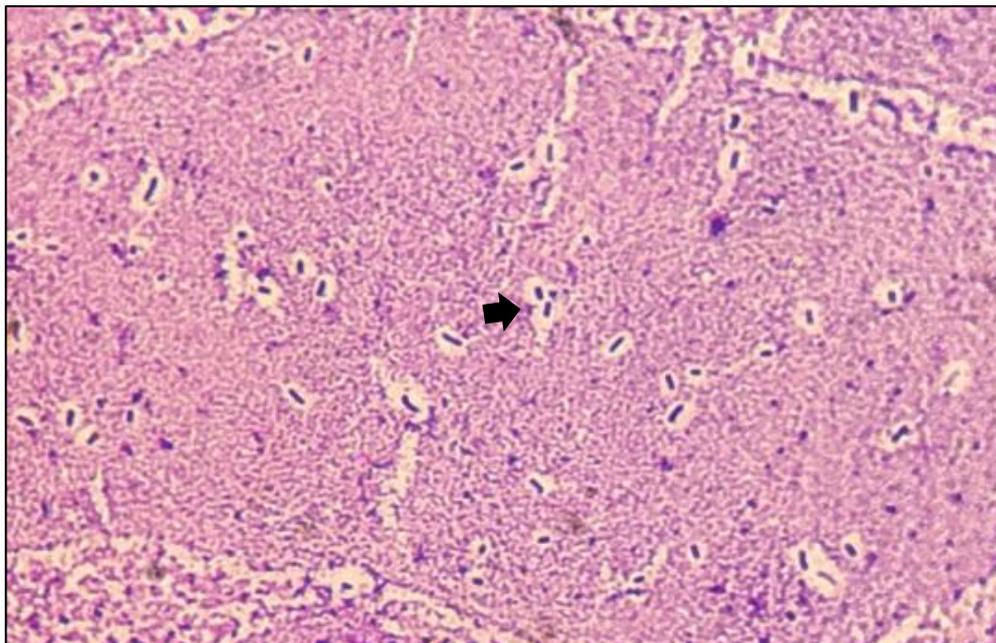
### 2.1 GÊNERO *Klebsiella* COMO PATÓGENO HUMANO

As bactérias são seres procariotos ubíquos que desempenham papel fundamental para manutenção da vida na Terra. Apenas uma pequena porcentagem das bactérias é patogênica ao ser humano. Entretanto, as infecções por elas causadas possuem um amplo impacto na saúde pública, sendo causa de largos índices de morbidade e mortalidade ao longo da história. Dentre os gêneros de bactérias de maior relevância clínica, inclui-se *Klebsiella* (DORON; GORBACH, 2008).

*Klebsiella* foi o nome dado ao gênero de bactérias em homenagem aos estudos conduzidos pelo microbiologista alemão Edwin Klebs no final do século XIX, os quais descreviam tais microrganismos pela primeira vez. Posteriormente, Carl Friedländer, outro microbiologista germânico, em 1882, também discorreu sobre os bacilos que compunham o gênero, estabelecendo a relação entre tais bactérias e a pneumonia grave que acometia os pacientes da época. Durante muito tempo associou-se o “bacilo de Friedländer” como sinônimo para bactérias do gênero *Klebsiella* (OCTAVIA; LAN, 2014).

As espécies integrantes do gênero *Klebsiella* pertencem à família Enterobacteriaceae e possuem como característica serem bacilos Gram-negativos, que medem aproximadamente 0,3 – 1,0 x 0,6 – 6,0 µm. São aeróbios ou anaeróbios facultativos, fermentadores, imóveis, não esporulados e envoltos por cápsula polissacarídica, a qual pode ser observada através de algumas técnicas de coloração específicas (Figura 1). Em análise por microscopia óptica, apresentam-se como bacilos isolados, aos pares ou em cadeias curtas e, em meios de isolamento, produzem colônias de aspecto mucoide e viscoso. Dentre as características bioquímicas do gênero, tem-se espécies catalase positiva e que podem utilizar citrato e glicose como única fonte de carbono, mas não L-sorbose (OCTAVIA; LAN, 2014).

**Figura 1 – Bacilos de *Klebsiella pneumoniae* analisados sob microscopia óptica comum.**



Fonte: Elaboração própria, 2018. Coloração de Anthony. Aumento 400x. Seta preta evidencia halo branco correspondente à estrutura capsular bacteriana.

A classificação das espécies do gênero *Klebsiella* é controversa e, atualmente, é composta por: *K. aerogenes*, *K. huaxiensis*, *K. oxytoca*, *K. michiganensis*, *K. pasteurii*, *K. grimontii* e o complexo *K. pneumoniae*. Dentro do complexo *K. pneumoniae*, estão: *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *K. variicola* subsp. *variicola*, *K. variicola* subsp. *tropica*, *K. quasivariicola*, *K. africana*, as quais são espécies que compartilham entre si 95-96% de similaridade na sequência nucleotídica. Para as espécies *K. terrigena*, *K. electrica*, *K. planticola* e *K. ornithinolytica*, propõe-se uma classificação em um novo gênero, denominado *Raoultella*, embora tal tema ainda seja motivo de debates (WYRES; LAM; HOLT, 2020).

Embora o complexo *K. pneumoniae* seja formado por sete espécies, *K. pneumoniae sensu stricto* é a mais prevalente como patógeno humano, sendo correspondente a aproximadamente 85% dos isolados classificados genericamente como *K. pneumoniae* e é também a espécie responsável pela maioria das infecções humanas causadas por todo o gênero *Klebsiella* (WYRES; LAM; HOLT, 2020). Além disso, estima-se que essa espécie, sozinha, seja responsável por aproximadamente

um terço do total das infecções causadas por bactérias Gram-negativas em geral (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017).

*K. pneumoniae* possui vasta distribuição, podendo ser encontrada em vários nichos ecológicos distintos, tanto de vida livre - como em solo e água - quanto associada a hospedeiros - como plantas, insetos, répteis, aves e mamíferos (WYRES; LAM; HOLT, 2020). Quando associada a hospedeiros, a relação estabelecida pode ser comensal ou patogênica. Trata-se de uma relação complexa e fragilmente alterada conforme as condições ofertadas. A colonização comensal do trato intestinal por *K. pneumoniae* é comum nos seres humanos. Acredita-se que a ampla distribuição dessa espécie na natureza leve-a a ser um contaminante comum de alimentos de origem animal e vegetal, e, dessa forma, contribua para a colonização intestinal em humanos. Em menor extensão, também se encontra *K. pneumoniae* compondo a colonização da nasofaringe humana e pele, embora nesse último caso a espécie seja considerada parte da microbiota transitória apenas (WYRES; HOLT, 2018).

Além de sua da sua abrangente distribuição na natureza, a espécie *K. pneumoniae* figura entre os principais patógenos oportunistas, sendo responsável por, aproximadamente, 10% de todas as infecções nosocomiais bacterianas. Patógenos oportunistas são caracterizados como microrganismos que podem se tornar patogênicos após algum tipo de perturbação no sistema imunológico do hospedeiro que leve ao imunocomprometimento, como uma doença prévia, uso de medicamentos ou fatores relacionados à idade (BROWN; CORNFORTH; MIDEO, 2012). Sabe-se que o alcoolismo, câncer, insuficiência renal e diabetes mellitus são fatores de risco para o desenvolvimento de infecções causadas por *K. pneumoniae* e que a colonização é uma etapa determinante na progressão da infecção. Entretanto, os exatos mecanismos envolvidos nessa relação não estão totalmente elucidados (MARTIN; BACHMAN, 2018).

De modo geral, as infecções podem ser de origem hospitalar ou comunitária. As infecções hospitalares mais comumente associadas à *K. pneumoniae* são pneumonia, endocardites, infecções do trato urinário, infecções em feridas e associadas à dispositivos de longa permanência (como cateteres), qualquer uma das quais é capaz de progredir para bacteriemia (MARTIN; BACHMAN, 2018; WYRES; LAM; HOLT, 2020). *K. pneumoniae* é considerada a terceira espécie mais prevalente relacionada às infecções hospitalares. Na América Latina, é o terceiro agente etiológico mais encontrado em bacteremias, e o quarto mais isolado em pneumonias

(MARRA *et al.*, 2011). E, na Paraíba, estudos realizados por Fehlberg *et al.* (2012) e Paz *et al.* (2015) identificaram *K. pneumoniae* como o principal micro-organismo causador de infecções nosocomiais em dois hospitais universitários de grande porte.

E, apesar da alta prevalência relacionada às infecções hospitalares, *K. pneumoniae* também é agente de severas manifestações infecciosas de origem comunitária. Tais infecções não são consideradas oportunistas e acometem indivíduos sem fatores de riscos prévios conhecidos. Dentre elas, incluem-se: endoftalmite, pneumonia, fascite necrotizante, abscesso hepático, meningite e abscesso hepático piogênico na ausência de doença do trato biliar (MARTIN; BACHMAN, 2018; WYRES; LAM; HOLT, 2020).

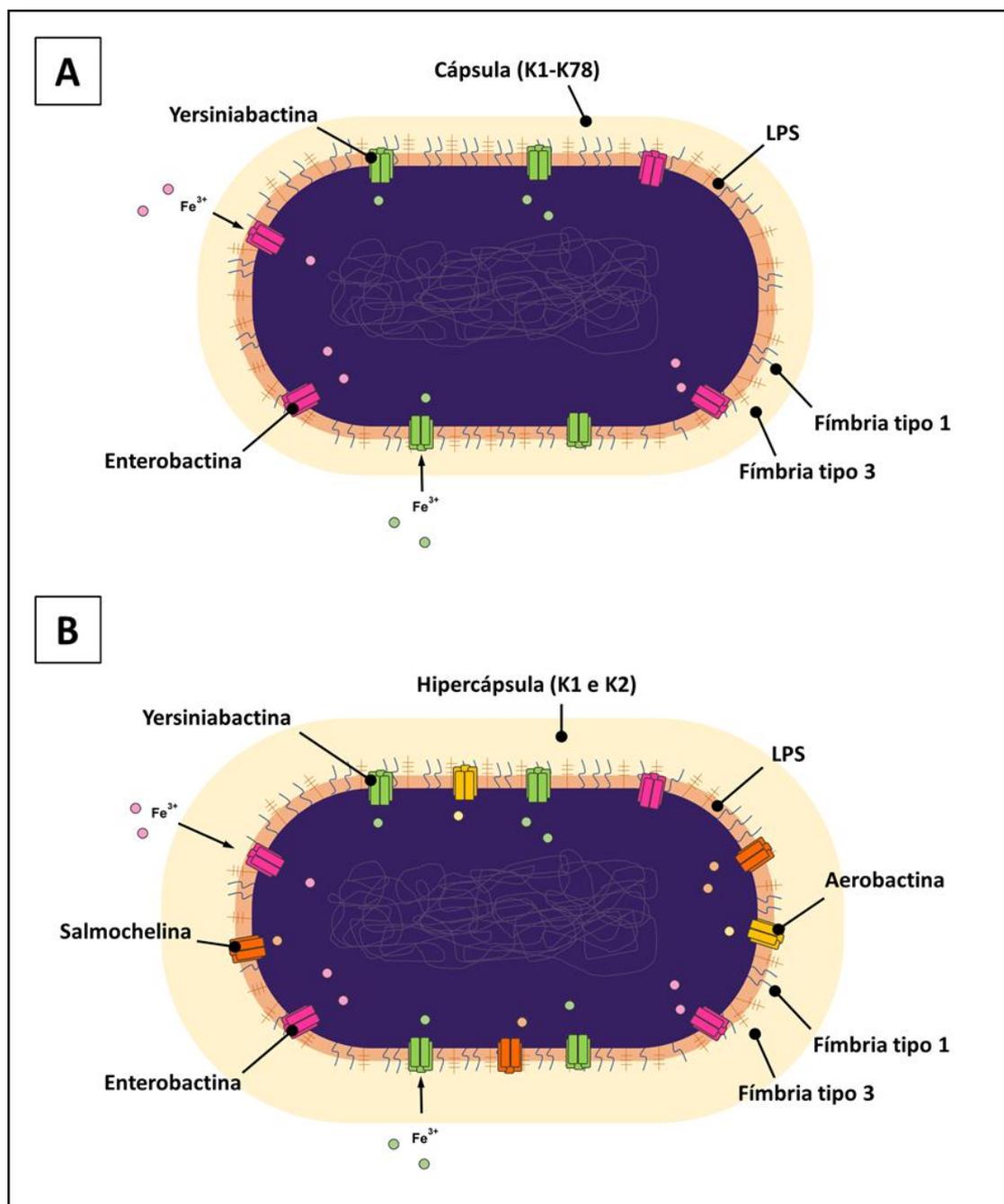
Para que um microrganismo ocasione infecção, é necessário que ele seja capaz de transpor as barreiras de defesa do hospedeiro, promovendo invasão tecidual e sobrevivendo à ação do sistema imunológico, ao passo em que consegue a obtenção de recursos nutricionais e atinge uma elevada densidade microbiana, causadora de danos diretos ao hospedeiro. Essas habilidades, características das bactérias patogênicas, são conferidas através da expressão de fatores de virulência. Por sua vez, define-se fatores de virulência como componentes do patógeno cuja perda tolhe a virulência, mas não sua viabilidade. Assim, tais elementos são considerados recursos “adicionais” presentes em algumas espécies e fundamentais para promover manifestações infecciosas no hospedeiro (BROWN; CORNFORTH; MIDEO, 2012; CLEGG, MURPHY, 2017).

Embora não se tenha uma elucidação completa da totalidade de mecanismos de virulência expressos por *K. pneumoniae*, alguns fatores já são bem descritos na literatura, sendo eles: a cápsula, o lipopolissacarídeo, os sideróforos, as fímbrias e a secreção de urease. Além disso, *K. pneumoniae* é conhecidamente uma espécie formadora de biofilmes, os quais também são uma forma de virulência e impactam diretamente no quadro infeccioso (PIPERAKI *et al.*, 2017).

A cápsula polissacarídica que envolve *K. pneumoniae* é considerada o principal fator de virulência da espécie e é também o mais estudado (Figura 2). Através da análise da composição de sacarídeos específicos da cápsula, nominados antígenos K, classifica-se *K. pneumoniae* em 78 sorotipos distintos que vão de K1 a K78, os quais possuem diferentes graus de patogenicidade. Dentre as diversas funções da cápsula, sabe-se que ela contribui para proteger o microrganismo da fagocitose pelas células de defesa do hospedeiro, retardando e reduzindo a ativação

da rede de respostas inflamatórias iniciais. Além disso, essa estrutura dificulta a atuação do sistema complemento em promover lise e opsonização, evitando, conseqüentemente, a fagocitose mediada por opsonização. Ela também reduz a ação de peptídeos antimicrobianos como as beta-defensinas e lactoferrinas por manter essas moléculas afastadas da membrana bacteriana (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Figura 2 – Fatores de virulência de *K. pneumoniae*



Fonte: Elaboração própria, 2020. **(A)** cepa de *K. pneumoniae* clássica e **(B)** cepa hipervirulenta

É demonstrado que a espessura e composição da cápsula bacteriana influencia diretamente na manifestação do processo infeccioso. Cepas acapsulares de *K. pneumoniae* possuem patogenicidade intensamente atenuada. Por outro lado, cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* (hvKP) possuem cápsula polissacarídica mais espessa, sendo denominada “hipercápsula” (Figura 2B), a qual é caracterizada pelos antígenos K1 e K2. Associada a outros fatores, a hipercápsula fornece mecanismos de proteção adicionais que conferem a essas cepas a capacidade de promover manifestações infecciosas mais severas e invasivas do que as ocasionadas por *K. pneumoniae* clássica (cKP). Enquanto cKP está associada a infecções oportunistas, geralmente em pacientes imunodebilitados, hvKP é capaz de ocasionar infecções comunitárias mesmo em indivíduos fora do grupo de risco (PIPERAKI *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2017).

O lipopolissacarídeo (LPS), é também um dos fatores de grande impacto na virulência bacteriana. Sinonimamente chamado de endotoxina, o LPS é o maior componente da membrana externa de todas as bactérias Gram-negativas. De modo geral, é composto pelo três partes: o lipídeo A, um oligossacarídeo central e o antígeno O. O antígeno O consiste em um conjunto de resíduos de açúcares (D-galactose, D-galactofuranose, D-manose, D-ribofuranose e N-acetil-D-glucosamina) de combinação variável entre as cepas de *K. pneumoniae*, sendo descritos onze tipos distintos, os quais estão associados a diferentes graus de patogenicidade, embora O1, O2, O3 e O5 sejam os mais frequentemente encontrados nas cepas de importância clínica. Uma das principais funções do LPS como fator de virulência é conferir maior proteção às células bacterianas contra a ação do sistema complemento (PATRO; RATHINAVELAN, 2019).

O ferro livre disponível no ambiente extracelular do hospedeiro é escasso e, em casos de infecções, pode ter seus níveis ainda mais reduzidos, devido ao sequestro por proteínas como a lactoferrina, a qual faz parte da imunidade inata e visa restringir a oferta desse elemento fundamental para a sobrevivência e propagação dos microrganismos. Assim, uma das estratégias utilizadas por *K. pneumoniae* para adquirir ferro no organismo hospedeiro é através dos sideróforos, os quais são moléculas que possuem afinidade por íons de ferro muito maior do que a afinidade das proteínas quelantes desse elemento no organismo alvo, o que garante que o patógeno seja capaz de “roubar” ferro dessas proteínas e também do microambiente (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Vários sideróforos são expressos em *K. pneumoniae*, incluindo enterobactina, yersiniabactina, salmochelina e aerobactina. A afinidade pelo ferro é diferente entre os tipos de sideróforos. A enterobactina é o principal sistema de captação de ferro e possui maior grau de afinidade pelo íon, enquanto que aerobactina possui o menor nível de afinidade pelo mesmo. Também é variável a distribuição dos sideróforos entre a espécie, sendo enterobactina encontrada em praticamente todas as cepas de *K. pneumoniae*, enquanto que salmochelina e aerobactina são mais frequentemente associadas a cepas hipervirulentas do que a cepas clássicas, fornecendo mecanismos adicionais que amplificam a captação de ferro pelo microrganismo (Figura 2). A ausência ou redução da expressão de sideróforos compromete a viabilidade do patógeno no organismo hospedeiro, impactando diretamente no curso da infecção, uma vez que não é alcançada carga microbiana suficiente para promover danos teciduais significativos (PACZOSA; MECSAS, 2016; LEE *et al.*, 2017).

Outra classe de fatores de virulência corresponde às fímbrias, que são importantes mediadores no processo de adesão de *K. pneumoniae* às mucosas e contribuem para colonização e invasão no organismo hospedeiro, bem como para aderência a superfícies abióticas. As principais fímbrias descritas na espécie são tipo 1 e 3 (Figura 2). As do tipo 1 são saliências finas e presentes em aproximadamente 90% dos isolados clínicos, capazes de reconhecer e se ligar a resíduos de manose. Já as fímbrias tipo 3 possuem aspecto helicoidal e não se ligam à manose, mas são fundamentais na ligação às proteínas da matriz extracelular, como as fibras de colágeno (CLEGG, MURPHY, 2017).

A urease também configura um tipo de fator de virulência bastante associado às cepas de *K. pneumoniae*. Essa espécie é uma das principais causadoras de infecções no trato urinário e a hidrólise da ureia favorece o crescimento bacteriano nesses sítios, possibilitando a colonização do local. Isso ocorre devido a ação da enzima promover a formação de amônia, que alcaliniza o pH em torno do microrganismo e o protege do ambiente hostil encontrado no trato urinário. Além disso, a alteração no pH leva à precipitação de sais inorgânicos, que são insolúveis em meio alcalino, formando incrustações no trato urinário e em cateteres. Essas incrustações, além de influenciar no curso da infecção, reduzem o fluxo urinário, aumentando a permanência dos patógenos no local (CLEGG, MURPHY, 2017).

A formação de biofilmes bacterianos é um importante mecanismo, que contribui para a patogenicidade de *K. pneumoniae*. Trata-se de uma estrutura

complexa, dinâmica e amorfa, constituída por agregados bacterianos envolvidos por uma matriz extracelular que lhes garante resistência não só contra o sistema imune do hospedeiro, como também contra os antibacterianos. Uma vez estabelecidos, os biofilmes são de difícil remoção e estão relacionados com vários relatos de infecções persistentes e insucessos terapêuticos (LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010).

O processo é iniciado quando bactérias de vida livre (planctônicas) se depositam em uma superfície biótica ou abiótica, através de interações não específicas fracas, como as hidrofóbicas, eletrostáticas e de van der Waals. Essas interações são facilmente desfeitas, o que torna essa adesão inicial um processo reversível. Entretanto, caso a resultante entre interações repulsivas e atrativas seja favorável para associação com a superfície, as bactérias passam a ter uma adesão mais forte, a qual inicia a nucleação do biofilme. Após esse contato inicial entre célula bacteriana e superfície, ocorre a adesão irreversível das bactérias ao substrato. Nesse ponto, interações dipolo-dipolo, iônicas, ligações de hidrogênio e covalentes estão envolvidas, além da conexão das adesinas, pili e fímbrias presentes na superfície da célula, as quais fazem o ancoramento com o substrato. Em *K. pneumoniae*, as fímbrias tipo 1 e 3 são de grande importância para essa etapa (MUHAMMAD *et al.*, 2020).

A sinalização célula-célula conduz outras bactérias livres a iniciarem a formação do biofilme e promoverem sua maturação. Em um processo denominado *quorum sensing* (percepção de quórum) há a comunicação entre bactérias através da difusão de pequenas moléculas sinalizadoras autoindutoras que permitem coordenar a expressão de genes especializados, em resposta à densidade populacional, fazendo com que a maior parte das células naquele ambiente responda de forma sincrônica, gerando um comportamento comunitário (GUILHEN *et al.*, 2006). A partir de então, inicia-se a produção da matriz exopolimérica - *Extracellular polymeric substances* (EPS), a qual é um componente essencial para existência do biofilme e é formada majoritariamente por polissacarídeos, proteínas, DNAs, lipídeos e outros compostos poliméricos (MUHAMMAD *et al.*, 2020).

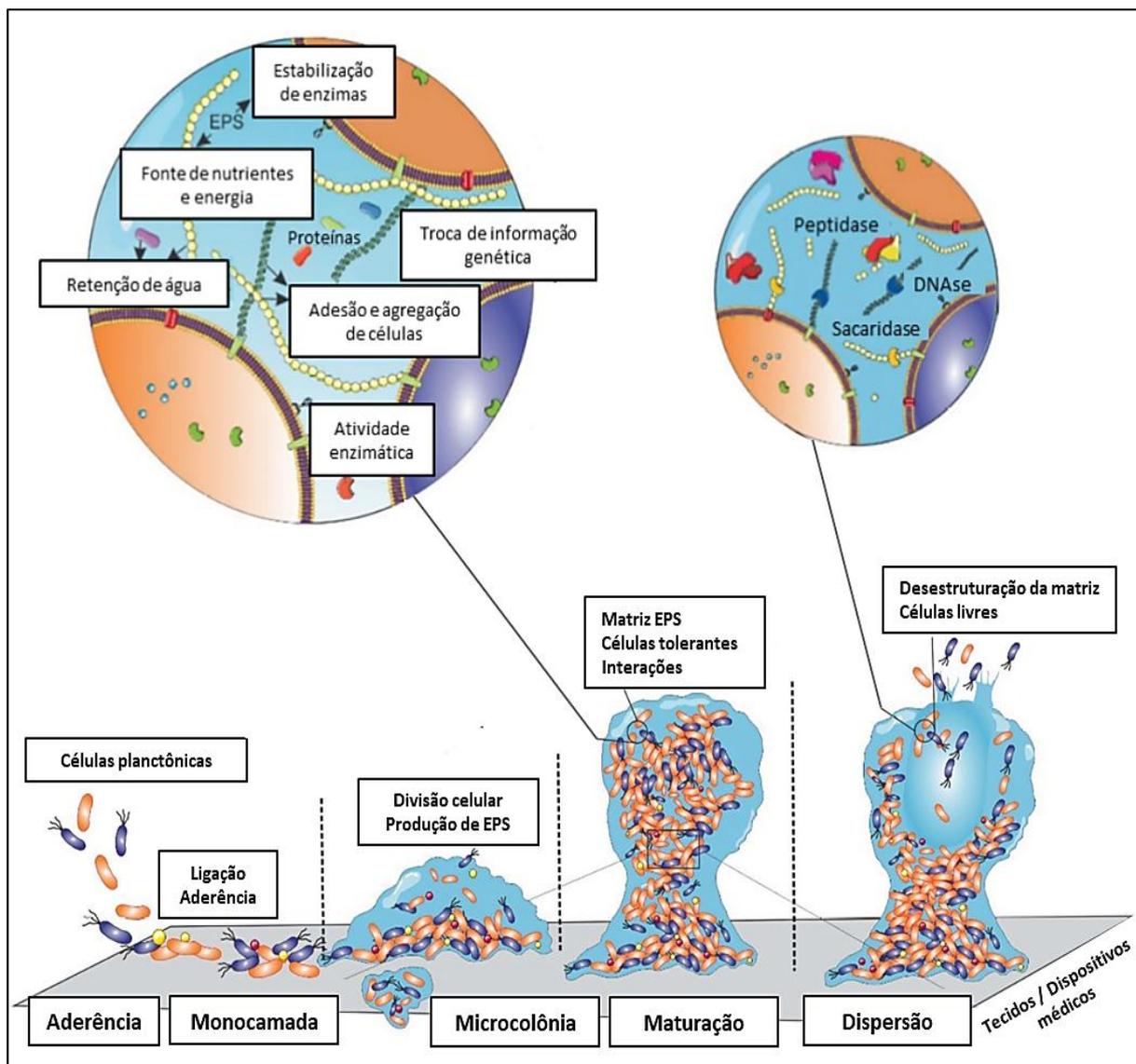
As bactérias envolvidas no processo sintetizam e secretam EPSs, formando uma camada de proteção em torno da comunidade bacteriana aderida à superfície. É estabelecida, então, a microcolônia inicial de células em monocamada, envoltas pelo EPS, em constante divisão celular. Essa matriz, além de proteger as células sésseis das agressões do ambiente externo, as mantém coesas, o que também favorece a

troca de informações, dos mais diversos tipos, e de material genético entre elas. Além disso, serve como meio para reter água e nutrientes necessários àquela população bacteriana. E, devido à alteração na expressão gênica das células do biofilme, vários fatores de virulência passam a ser intensamente expressos, além de mecanismos de resistência, como bombas de efluxo - mesmo na ausência de agentes antibacterianos (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007; MUHAMMAD *et al.*, 2020).

Na maturação do biofilme a comunidade microbiana torna-se mais complexa e bem estabelecida, ocorrendo inúmeras interações simultaneamente em seu interior. Há heterogeneidade entre as células envoltas pela matriz exopolimérica, pois as condições do interior do biofilme geram microambientes distintos, que interferem na atividade celular. Nas regiões mais internas, por exemplo, há menos aporte de oxigênio e alguns nutrientes, fazendo com que essas células tenham um metabolismo mais lento do que as periféricas, as quais multiplicam-se ativamente (BEITELSHHEES *et al.*, 2018; MUHAMMAD *et al.*, 2020).

O ciclo do biofilme se completa quando ocorre a fase de dispersão das células. Esse processo é iniciado em resposta a algum estímulo, químico ou físico, que é percebido pelos microrganismos (como, por exemplo, a escassez de nutrientes). A sinalização disparada induz as células a alterarem sua expressão gênica, ativando genes necessários à forma de vida livre, ao passo que reduz a ativação de genes relacionados às formas sésseis, como os que resultam na produção de EPS e proteínas de adesão. Ocorre também a ativação de diversas enzimas responsáveis pela degradação da matriz exopolimérica, fazendo com que as células fiquem desprotegidas e livres. Dessa forma, essa etapa tem a finalidade de que as bactérias que antes compunham o biofilme se desprendam e possam formar novas microcolônias em um novo substrato (MUHAMMAD *et al.*, 2020; RUMBAUGH; SAUER, 2020). A Figura 3 resume as etapas de formação do biofilme citadas anteriormente, e também sua estrutura interna.

**Figura 3 - Etapas de formação e estrutura do biofilme bacteriano**



Fonte: Adaptado de Barzegari *et al.*, 2020.

Os biofilmes podem ser formados tanto em tecidos vivos quanto em superfícies abióticas, como os dispositivos médicos de longa permanência, o que impacta diretamente na prática clínica. Estima-se que, apenas nos Estados Unidos, a incidência anual de infecções relacionadas ao biofilme seja de aproximadamente 1,96 milhão de casos, causando cerca de 268.000 mortes, com mais de US\$ 18 bilhões em custos diretos gastos no tratamento dessas infecções. Tais dados ocorrem devido à difícil eliminação dos biofilmes, o que obstaculiza bastante o tratamento dessas infecções (RUMBAUGH; SAUER, 2020).

A matriz exopolimérica reduz a penetração dos agentes antibacterianos em seu interior. Além disso, a presença das bombas de efluxo e enzimas de resistência em todo o ambiente do biofilme atenuam ainda mais a possibilidade de atuação dos fármacos sobre tais bactérias. A alteração na expressão gênica também contribui para falha terapêutica, uma vez que pode induzir os microrganismos a sofrerem um processo adaptativo, reduzindo, por exemplo, sua atividade proliferativa. Assim, alguns fármacos que têm como alvo o momento da replicação celular ou da síntese da parede celular irão ser menos efetivos sobre essas células. Tem sido relatado, inclusive, que células do biofilme podem ser 10 a 1000 vezes mais tolerantes a vários fármacos do que suas respectivas formas planctônicas e que alguns antibacterianos convencionais são totalmente ineficazes contra biofilmes, mesmo em altas concentrações (CIOFU *et al.*, 2017; GEBREYOHANNES *et al.*, 2019).

Um agravante no combate a essas infecções é que alguns medicamentos antibacterianos que são utilizados atualmente, incluindo alguns  $\beta$ -lactâmicos, em concentrações subinibitórias, podem servir como moléculas sinalizadoras que estimulam a formação de biofilme, dificultando o curso da infecção e tratamento (RANIERI *et al.*, 2018). A indução da formação de biofilmes em concentrações subinibitórias é um processo clinicamente relevante, pois durante o tratamento da infecção uma parte da população de micro-organismos é exposta a concentrações subótimas, mesmo quando se seguem as condições recomendadas de uso do medicamento. Assim, baixas doses destes fármacos podem interferir no curso da infecção, complicando o tratamento dessas doenças (KAPLAN *et al.*, 2012; GONEAU *et al.*, 2015).

Além de serem altamente resistentes às terapias antimicrobianas, os biofilmes geralmente são formados em áreas do corpo que não são facilmente acessíveis para tratamento e para ação do sistema imunológico. Acredita-se que eles possam atuar como “estoques” de microrganismos e que a fase de dispersão contribua para espalhamento das células no organismo. Devido a isso, tem sido cada vez mais investigada a relação entre infecções crônicas persistentes e a formação de biofilmes, principalmente quando relacionadas a dispositivos médicos de longa permanência. (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; FLEMING; RUMBAUGH, 2018).

## 2.2 FARMACOTERAPIA ANTIBACTERIANA E SEUS DESAFIOS

O tratamento das infecções causadas por *K. pneumoniae* é realizado conforme o sítio de infecção e a sensibilidade da cepa, avaliada pelo antibiograma. Usualmente, os esquemas terapêuticos incluem como monoterapia as cefalosporinas, principalmente as de terceira e quarta geração, ou as quinolonas. Também pode ser feita a combinação de qualquer um desses regimes com aminoglicosídeos. E, para infecções nosocomiais, preferencia-se o uso de carbapenemas em monoterapia. Caso ocorra a detecção de resistência e/ou falha terapêutica, avalia-se o uso de opções adicionais, como polimixinas, tigeciclina e fosfomicina, sendo frequentemente também realizada a combinação entre dois ou mais agentes antibacterianos, conforme cada caso clínico (CALFEE, 2017; ASHURST; DAWSON, 2018).

Entretanto, a resistência de *K. pneumoniae* aos antibacterianos disponíveis atualmente tem atingido níveis alarmantes nas últimas décadas, levando a frequentes insucessos terapêuticos. A espécie é uma importante fonte de resistência aos antimicrobianos, apresentando uma grande capacidade de adquirir plasmídeos com genes que lhes conferem resistência a múltiplos fármacos (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; WYRES; HOLT, 2018). Como explica Paczosa e Meccas (2016), esse patógeno vem ganhando cada vez mais notoriedade, pois o aumento no número de infecções graves, surgimento de cepas hipervirulentas e a escassez de medicamentos eficazes leva a altos índices de morbidade e mortalidade, internações hospitalares prolongadas e aumentos nos custos e duração de tratamentos medicamentosos.

Em todo o mundo, a resistência bacteriana é considerada um dos principais problemas de saúde pública na atualidade e é também uma questão econômica, trazendo elevados custos financeiros para os sistemas de saúde. Estima-se que, apenas nos Estados Unidos da América (EUA), ocorram cerca de 29 mil mortes por ano, decorrentes de infecções não responsivas aos tratamentos disponíveis. Os gastos anuais para tratamento de infecções resistentes nos EUA são de, aproximadamente, 4,7 bilhões de dólares, além de um impacto de 35 bilhões de dólares a menos na produtividade anual da população (THORPE; JOSKI; JOHNSTON, 2018; DADGOSTAR, 2019; OLIVEIRA et al., 2020). Na Europa, calcula-se que o tratamento destas infecções gere um custo de mais de 9 bilhões de euros por ano (DADGOSTAR, 2019; OLIVEIRA et al., 2020).

Especialistas relatam que estamos vivendo uma era “pós-antibiótica”, pois os índices de resistência microbiana aumentam diariamente, enquanto a descoberta de novos fármacos progride a passos curtos (LUEPKE *et al.*, 2016; WHO, 2017). A seleção natural, auxiliada pelo uso indevido de antibióticos e a desaceleração a descoberta de novos antibióticos conspiram para colocar a sociedade em um ponto de crise. O déficit de inovação se deve, em grande medida, ao fato de que muitas das principais empresas farmacêuticas deixaram de investir recursos em pesquisa e desenvolvimento de antibacterianos, o que contribuiu para o declínio no número de novos antibacterianos lançados nos últimos 30 anos (WRIGHT *et al.*, 2014).

Para o tratamento das infecções causadas por Gram-negativas, principalmente, observa-se a escassez de novos fármacos (EXNER *et al.*, 2017). As quinolonas, descobertas em 1962 foram a última nova classe de antibiótico com atividade frente a estas bactérias. Dos 44 antibacterianos em estudo para desenvolvimento atualmente, apenas 15 apresentam algum tipo de ação contra Gram-negativas e somente cinco progrediram para estudo clínico de fase 3, mas todos estes são substâncias decorrentes modificações moleculares de fármacos já existentes no mercado (WILLYARD, 2017; TACCONELLI *et al.*, 2018). Autoridades de saúde deixam claro que é necessário, urgentemente, desenvolver novas alternativas para o tratamento infecções causadas por patógenos resistentes (LUEPKE *et al.*, 2016; PIDDOCK, 2017), e a pandemia causada pela *coronavirus disease 2019* (COVID-19) tem reforçado ainda mais esse alerta, visto que tem sido observado um aumento geral nos índices de bactérias multirresistentes associadas aos pacientes acometidos por Sars-CoV-2 (TIZKAM *et al.*, 2020).

Em 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou pela primeira vez uma lista de micro-organismos resistentes que representam ameaça à saúde humana e para as quais há necessidade prioritária de desenvolvimento de novos antibióticos. Os especialistas utilizaram como base para construção deste documento critérios como mortalidade, prevalência da resistência e transmissibilidade. A lista foi dividida em três níveis: crítico, alto e médio. Compondo o grupo crítico estão as bactérias Gram-negativas, mais especificamente *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e Enterobacteriaceae - que incluem *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemas e/ou cefalosporinas de terceira geração (WHO, 2017).

Um dos objetivos da lista divulgada pela OMS é guiar a pesquisa de novos antibacterianos, visando atenuar a crise relacionada a essas infecções. Além disso,

algumas estratégias terapêuticas vêm sendo utilizadas como alternativas para auxiliar no combate às cepas resistentes, dentre as quais está a administração combinada de fármacos. Tem-se demonstrado que a sobrevivência de pacientes com infecções por cepas de *Klebsiella* spp. resistentes é maior em casos onde combinações de antibacterianos são utilizadas, em comparação com aqueles que utilizam a monoterapia (COTTAREL; WIERZBOWSKI, 2007; QURESHI *et al.*, 2012).

A associação de dois ou mais antibacterianos pode promover efeitos aditivos e sinérgicos benéficos, visto que atuam sobre diferentes alvos moleculares e, assim, conseguem exercer efeito antibacteriano sobre algumas cepas não responsivas à monoterapia farmacológica. Também é possível haver a combinação de um antibacteriano com um adjuvante que otimize o efeito do fármaco, atuando por mecanismos acessórios, como prevenindo a degradação/modificação do antibiótico por enzimas de resistência e também inibindo bombas de efluxo, favorecendo o efeito farmacológico principal (COTTAREL; WIERZBOWSKI, 2007). Visto que é preciso garantir alternativas contra cepas para as quais simplesmente não existem medicamentos disponíveis atualmente, torna-se interessante a investigação dos efeitos da associação de fármacos nesse contexto.

É importante ressaltar também que a habilidade de *K. pneumoniae* formar biofilmes é um dos fatores que contribui para as elevadas taxas de resistência aos antibacterianos e falhas terapêuticas. Portanto, desenvolver medidas eficazes de abordagens antibiofilme não só permite melhorar o tratamento dessas infecções, como também pode oferecer benefícios para retardar a taxa de disseminação da resistência aos antibióticos, sendo de grande relevância o estudo da atuação de novas substâncias sobre estes alvos (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

### 2.3 ACETAMIDAS COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS

As fontes para obtenção de fármacos podem ser naturais, semissintéticas e sintéticas. Os produtos naturais permanecem sendo a maior fonte de novas moléculas bioativas até os dias atuais, juntamente com modificações químicas feitas através de semissíntese para aprimoramento da atividade biológica, mas que possuem como base a estrutura da molécula de origem natural. Entretanto, substâncias de origem

completamente sintética vêm ganhando cada vez mais espaço de destaque em meio aos novos fármacos (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

O desenvolvimento de beta-lactâmicos totalmente sintéticos como imipenem, loracarbef e meropenem nas décadas de 1980 e 1990, iniciaram perspectivas para que outros fármacos sintéticos começassem a ser também avaliados e produzidos em escala industrial, sendo os exemplos mais notáveis na área microbiológica o cloranfenicol, metronidazol, trimetoprim, fosfomicina e sulfas. É possível observar que tais moléculas apresentam elevada potência, segurança terapêutica e espectro de atividade estendido, inclusive frente às bactérias resistentes (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

Dentro do contexto de moléculas de origem sintética, sabe-se que o grupamento amida é amplamente encontrado e é de fundamental importância para propriedades biológicas e materiais de um vasto número de compostos criados pelo homem e presentes na natureza (RUIDER; MAULIDE, 2015). Como explica Aschale (2012), tem havido um considerável interesse em realizar substituições em derivados de acetanilidas devido a este grupo estar presente em vários fármacos sintéticos relacionados com uma vasta gama de atividades biológicas como antibacteriana, antiviral, antifúngica, antihelmíntica, analgésica e anti-inflamatória.

As cloroacetamidas são largamente utilizadas como herbicidas na agricultura, apresentando potente atividade contra pragas (COLEMAN *et al.*, 2000). Olszewska *et al.* (2016) descreve o uso de algumas cloroacetamidas específicas que são capazes de se ligar ao DNA e fazer uma ponte entre DNA e proteína, o que pode servir como um excelente substrato para reação em cadeia da polimerase (PCR). Também existem relatos de derivados acetamidas como agentes antimicrobianos.

Um estudo de Katke *et al.* (2011) investigou o potencial antibacteriano de treze acetamidas diferentes usando a metodologia de difusão de ágar. Como resultados, eles observaram zonas de inibição variando entre 7 e 30 mm contra *Escherichia coli*, 16-35 mm contra *Pseudomonas aeruginosa* e 10-36 mm contra *Staphylococcus aureus*. Apenas duas das treze substâncias avaliadas não apresentaram atividade antibacteriana sobre alguma das cepas testadas, demonstrando o excelente potencial biológico das acetamidas.

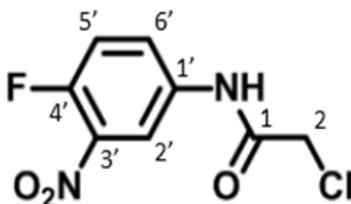
Patel *et al.* (2013) sintetizaram uma acetamida a partir de cumarina e obtiveram um produto com boa atividade frente a várias cepas, incluindo *Mycobacterium tuberculosis*. Adicionalmente, Jetti, Chidurala e Meshram (2014)

demonstraram que a conjugação de uma acetamida com antibiótico monobactâmico apresentou boa atividade contra Gram-positivas e negativas.

Além disso, um estudo de Bravo *et al.* (2003) demonstra que a presença do átomo de cloro parece melhorar a atividade antimicrobiana dessas moléculas. Os autores avaliaram a atividade antimicrobiana da *N*-(2-hidroxifenil)acetamida contra *Candida albicans* e, como resultado, a ausência de atividade contra este microorganismo foi observada. Porém, a mesma substância acrescida de um átomo de cloro (2-cloro-*N*-(2-hidroxifenil)acetamida) foi capaz de inibir 96,6% das cepas de *C. albicans*. Assim, a adição de cloro ao carbono alfa foi essencial para a atividade biológica da molécula.

A 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida (Figura 4) é uma acetamida sintética sobre a qual não existem dados na literatura científica acerca da sua atividade biológica. Trata-se de um composto sintetizado pela primeira vez por Peixoto *et al.* (2016) e utilizado apenas como intermediário para reação de obtenção de produtos mesoiônicos, sendo este o único relato dessa substância encontrado nas bases científicas.

**Figura 4 - Estrutura química de 2-cloro-*N*-(4-flúor-3 nitrofenil)acetamida**



Fonte: Elaboração própria, 2020.

Tendo em vista o potencial antimicrobiano das cloroacetamidas e a urgente necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae*, torna-se de especial interesse o estudo inédito da atividade antibacteriana da molécula, bem como a análise do seu perfil citotóxico, afim de contribuir para viabilização de um novo medicamento antibacteriano.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antibacteriano sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* e perfil citotóxico da 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma avaliação preliminar e comparação entre a potência antibacteriana de *N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida e 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida;
- Analisar o efeito antibacteriano da 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e cinética de morte bacteriana, investigando seus possíveis alvos de ação por meio da análise de *docking* molecular e do efeito sobre a integridade celular bacteriana;
- Avaliar a citotoxicidade da 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida sobre hemácias e seu efeito genotóxico sobre células da mucosa oral, além de investigar os parâmetros farmacocinéticos *in silico* da substância;
- Analisar os efeitos da associação da 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida com antibacterianos-padrões sobre *K. pneumoniae*;
- Observar a ação da 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida sobre a inibição da formação de biofilmes por *K. pneumoniae*, bem como a ação sobre biofilmes previamente formados.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAIS DA PESQUISA

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo de atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) da UFPB, sob coordenação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edeltrudes de Oliveira Lima.

Os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, localizado no Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) / Patos – PB, sob coordenação do Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Os experimentos de análise do efeito sobre biofilme e sobre a integridade celular foram conduzidos utilizando o Laboratório Multiusuário do Departamento de Biologia Molecular (DBM) da UFPB.

### 4.2 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados foram ágar nutriente, ágar e caldo Brain Heart Infusion (BHI) e ágar Mueller-Hinton, os quais adquiridos comercialmente da DIFCO Laboratories<sup>®</sup>/EUA/França e preparados conforme as descrições do fabricante.

### 4.3 CEPAS BACTERIANAS

Foram utilizadas 12 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, identificadas como: KP-25, KP-26, KP-56, KP-83, KP-87, KP-138, KP-143, KP-166, KP-173, KP-176, KP-260 e KP-326, cedidas pela farmacêutica-bioquímica Darci de Magalhães Melo, obtidas através de isolados clínicos no Laboratório de Patologia Clínica HEMATO, localizado em João Pessoa-PB, e depositadas na MICOTECA do Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos. A identificação bacteriana, bem como a análise de seus perfis de resistência aos antibacterianos foram realizadas no referido laboratório.

Para fins de controle, foi utilizada também a cepa-padrão da *American Type Culture Collection*: ATCC-700603 (PLASTLABOR®/Rio de Janeiro/Brasil).

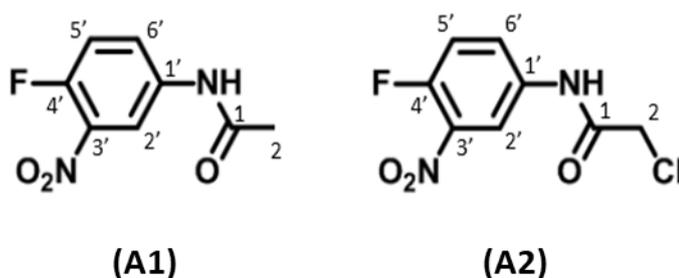
#### 4.4 INÓCULO

Para preparação do inóculo, colônias obtidas de culturas recentes mantidas em caldo BHI serão suspensas em solução estéril de cloreto de sódio (NaCl) 0,85%, e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 de McFarland, que corresponde à aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) (CLSI, 2015).

#### 4.5 OBTENÇÃO DA *N*-(4-FLÚOR-3-NITROFENIL)ACETAMIDA E 2-CLORO-*N*-(4-FLÚOR-3-NITROFENIL)ACETAMIDA

As substâncias *N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida (A1) e 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida (A2) (Figura 5) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho e Dr. Helivaldo Diógenes da Silva Souza, através do Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da UFPB.

**Figura 5 - Estrutura química das substâncias *N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida (A1) e 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida (A2)**



Fonte: Elaboração própria (2021).

Para a síntese das substâncias foram utilizados 4-fluoro-3-nitroanilina, trietilamina (Et<sub>3</sub>N), anidrido acético, cloreto de cloroacetila, clorofórmio, hexano, acetato de etila, metanol e etanol, os quais foram adquiridos da Merck/Sigma-Aldrich®.

A técnica de recristalização foi usada para purificar o composto e a sua pureza foi confirmada a partir da fusão ponto de medição usando o MQAPF-302 (Microquímica) aparelho. O espectrômetro Shimadzu modelo IRPrestige -21 FT-IR com um acessório de reflexão total atenuada (ATR) produziu o espectro infravermelho (IR). Os espectros da ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono foram obtidos a partir de um aparelho Bruker Avance 400. Os espectros de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) foram obtidos na frequência de 400 e 500 MHz utilizando os solventes deuterados clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) e dimetilsulfóxido (DMSO). Os espectros de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos na frequência de 101 e 126 MHz utilizando os solventes deuterados clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) e dimetilsulfóxido (DMSO). As distâncias químicas ( $\delta$ ) foram gerados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram determinadas em hertz (Hz).

Na síntese de *N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida (A1), a 4-fluoro-3-nitroanilina (3,12 g, 20 mmol) foi adicionada, em pequenas porções, em um frasco de 50 mL contendo anidrido acético (11 mL, 116 mmol) sob agitação constante à temperatura ambiente. A mistura reacional foi agitada durante 12 horas. Ao fim da reação, o gelo foi adicionado e a mistura foi agitada durante 30 minutos. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água e seco. O produto foi recristalizado a partir de uma mistura de etanol / água (8: 2). Rendimento: 85%, sólido castanho. m.p: 142-144 °C m.p: 142-144 °C (Lit. (MCFARLANE; MOODY; SMITH, 1988): 140-141 °C). IV (ATR):  $\nu/\text{cm}^{-1}$  3356 (N-H), 3124, 3064 (C-H<sub>Ar</sub>), 1678 (C=O), 1610 (N-H), 1529 and 1332 (NO<sub>2</sub>), 1482 (C=C), 1238 (C<sub>Ar</sub>-F), 1155, 1141 (C-H<sub>Ar</sub>), 833 (C-N for ArNO<sub>2</sub>).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.37 (s, 1H, NH), 8.48 (dd,  $J$  = 6.9, 2.7 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.81 (ddd,  $J$  = 9.1, 3.9, 2.8 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.50 (dd,  $J$  11.2, 9.1 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  168.97, 150.19 ( $J$  257.8 Hz), 136.31 ( $J$  7.8 Hz), 136.05 ( $J$  3.3 Hz), 126.23 ( $J$  8.1 Hz), 118.75 ( $J$  21.8 Hz), 115.27 ( $J$  3.3 Hz), 23.89 (MCFARLANE; MOODY; SMITH, 1988).

Para sintetizar 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida (A2), o cloreto de cloroacetila (2,71 g, 24 mmol) foi adicionado lentamente a um frasco de 50 mL contendo a mistura de 4-fluoro-3-nitroanilina (3,12g, 20 mmol) e Et<sub>3</sub>N (3,3 mL, 0,024 moles) solubilizado em 20 mL de  $\text{CHCl}_3$  a 0°C, em um banho de gelo. Ao final da adição de cloreto de cloroacetila o banho de gelo foi removido e a reação foi agitada à temperatura ambiente. Após 20 horas de reação, a mistura foi submetida à extração. A fase orgânica foi lavada três vezes em água (3 x 30 mL), posta em secagem com sulfato de sódio anidro e concentrada à pressão reduzida, promovendo precipitação.

O material foi purificado usando mistura de etanol e água (9: 1). Rendimento: 80%, sólido castanho. m.p: 91-93 °C (Lit. (PEIXOTO *et al.*, 2016): 90-92 °C). IV (ATR):  $\nu/\text{cm}^{-1}$  3332 (N-H), 3132, 3074 (C-H<sub>Ar</sub>), 2943 (C-H<sub>Aliph</sub>), 1678 (C=O), 1606 (N-H), 1529 and 1338 (NO<sub>2</sub>), 1492 (C=C), 1228 (C<sub>Ar</sub>-F), 831 (C-N for ArNO<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.47 (s, 1H, NH), 8.32 (dd, *J* 6.4, 2.8 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.89 – 7.85 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.29 (dd, *J* 10.1, 9.1 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 4.22 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  164.53, 152.43 (*J* 263.6 Hz), 133.44, 133.41, 127.13 (*J* 8.1 Hz), 119.13 (*J* 22.1 Hz), 117.55 (*J* 2.9 Hz), 42.81 (PEIXOTO *et al.*, 2016).

Para utilização nos ensaios, as substâncias foram pesadas e preparadas imediatamente antes do uso através de solubilização em dimetil-sulfóxido (DMSO) a 5% e tween 80 a 2%, completando-se o volume final com água destilada esterilizada de forma a se obter emulsões nas concentrações necessárias para realização dos experimentos.

#### 4.6 ANTIBACTERIANOS PADRÕES

Os antibacterianos-padrões utilizados nos ensaios foram: Ciprofloxacino, cefepima, ceftazidima, meropenem e imipenem (Merck/Sigma-Aldrich®). Para utilização nos ensaios, as substâncias foram pesadas e devidamente solubilizadas em dimetil-sulfóxido (DMSO) a 5% e tween 80 a 2%, completando-se o volume final com água destilada esterilizada de forma a se obter emulsões nas concentrações desejadas.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Inicialmente, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizada como critério para avaliar a potência antibacteriana das substâncias A1 e A2 frente às cepas de *K. pneumoniae*, em uma triagem preliminar.

As CIMs das substâncias foram determinadas através da técnica de microdiluição em meio líquido em placa para cultura de células (TPP/SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços com fundo em “U”. Primeiramente, foram distribuídos 100  $\mu\text{L}$  de caldo BHI duplamente concentrado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  das substâncias foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa e, por meio de uma diluição

seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL a 0,015 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL das suspensões das cepas bacterianas ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) nas cavidades. Também foram realizados os controles de viabilidade das cepas, esterilidade do meio de cultura e diluentes, em paralelo. O ensaio foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas (CLSI, 2015).

Em seguida foi adicionado 20 µL de solução de resazurina a 0,01 % (INLAB®), um indicador colorimétrico de óxido-redução. Após incubação durante 1-2 h, foi realizada a leitura. Bactérias viáveis reduziram o corante, mudando a coloração do azul para rosa. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano e/ou verificado pela permanência da coloração do corante indicador (ELSHIKH et al., 2016).

#### 4.8 DOCKING MOLECULAR

Para análise de *docking* molecular, as estruturas químicas das substâncias foram projetadas usando o software MarvinSketch 18.5, suas energias minimizadas no programa Hyperchem v. 8.0.3, usando o método de mecânica molecular (MM+) e o método semi-empírico AM1 (Austin Model 1) (DEWAR, 1985). As enzimas foram obtidas a partir do Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) junto com seus inibidores co-cristalizados, com PDB ID: 2VF52 (2,9 Å) (MOUILLERON *et al.*, 2008), 5V3D3 (1,54 Å) (KLONTZ *et al.*, 2017), 5HLA4 (1,7 Å) (KING *et al.*, 2017), 2ZD85 (1,05 Å) (NUKAGA *et al.*, 2008), 3PBS6 (2,00 Å) (HAN *et al.*, 2010), 6C3U7 (1,85 Å) (TOMICH *et al.*, 2019), 1AJ68 (2,30 Å) (HOLDGATE *et al.*, 1997), 1S149 (2,00 Å) (BELLON *et al.*, 2004). O encaixe molecular foi realizado em Software Molegro Virtual Docker (MVD) (v 6.0.1, Molegro ApS, Aarhus, Dinamarca), usando os parâmetros padrões do software. As moléculas de água foram removidas e um modelo foi gerado no inibidor co-cristalizado do PDB.

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Após a leitura da CIM, alíquotas de 10 µL dos sobrenadantes foram retiradas dos poços das placas de microdiluição nas concentrações correspondentes à CIM, CIM x 2, CIM x 4 e CIM x 8 para cada cepa e inoculadas em novas placas de microdiluição contendo apenas meio BHI. O ensaio foi realizado em triplicata. As

placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas e em seguida foi observado o crescimento bacteriano. A CBM foi definida como a menor concentração capaz de causar completa inibição do crescimento bacteriano (CLSI, 1999; SILVA *et al.*, 2020).

#### 4.10 CINÉTICA DE MORTE BACTERIANA

A determinação do tempo de ação da substância A2 sobre *K. pneumoniae* foi feita através do ensaio de cinética de morte bacteriana, usando as cepas ATCC-700603 e KP-56 (FLAMM *et al.*, 2017). Para realização do ensaio, 100 $\mu\text{L}$  de caldo BHI foram adicionados em placas de 96 poços. Em seguida, adicionou-se a substância nas concentrações correspondentes à CIM e CIM x 2 e, por fim, 10 $\mu\text{L}$  dos inóculos bacterianos ( $1 \times 10^7$  UFC/ mL) nos poços correspondentes a cada cepa. Para fins de controle, também foi realizada a adição do inóculo em poços contendo apenas meio de cultura. A placa foi incubada a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Nos intervalos correspondentes a 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 24h foram retiradas alíquotas de 1 $\mu\text{L}$  dos poços utilizando alça bacteriológica estéril calibrada e semeadas em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, as quais foram incubadas em estufa bacteriológicas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Para interpretação dos resultados, foram construídas curvas de crescimento plotando a contagem média de colônias  $\log_{10}\text{UFC/ mL}$  em função do tempo (horas).

#### 4.11 EFEITO SOBRE A INTEGRIDADE CELULAR

A integridade da célula pode ser avaliada através da liberação de material intracelular, principalmente de nucleotídeos, os quais absorvem comprimentos de onda de 260 nm (DEVI *et al.*, 2010). Para realização deste ensaio foram utilizadas as cepas ATCC-700603, KP-26, KP-56 e KP-143. Primeiramente, 330  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano ( $1 \times 10^7$  UFC/ mL) foram cultivados em tubos contendo 3 mL de caldo BHI overnight a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Em seguida, foi feita a centrifugação a 400 x g durante 10 minutos. O pellet de células foi lavado duas vezes com PBS (tampão fosfato salino) estéril e ressuspenso em 3 mL de PBS contendo a substância-teste nas concentrações correspondentes à CIM e CIM x 2. Como controle negativo, foram usadas células sem tratamento. Os tubos correspondentes à CIM foram incubados durante 10 h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , e o tubo correspondente à CIM x 2, durante 6h. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 400 x g durante 10 minutos e foi realizada

a leitura dos sobrenadantes em espectrofotômetro (AGILENT TECHNOLOGIES Cary 60/ UV-Vis) a 260 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.12 HEMÁCIAS E CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL

As hemácias e células da mucosa bucal foram utilizados nos testes de avaliação da atividade hemolítica/ anti-hemolítica e genotóxica, respectivamente. As amostras de sangue (tipos A, B e O) e esfregaços da mucosa oral foram doados por adultos jovens e saudáveis, seguindo-se todos os aspectos éticos recomendados para garantir o total sigilo, segurança e integridade dos voluntários. Os testes foram realizados após aprovação do Comitê de Ética do Centro Universitário de Patos (número: 3621284).

#### 4.13 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Os sangues tipo A, B e O foram diluídos em solução salina a 0,9 %, em uma proporção de 1: 30 e postos em centrifugação a 400 x g durante cinco minutos, a fim de separar o concentrado de hemácias do plasma. Após sucessivas lavagens, o concentrado de hemácias foi diluído em solução salina, preparando-se uma suspensão a 0,5 %. Em seguida, a substância-teste foi adicionada à suspensão de hemácias, nas concentrações 50, 100, 500 e 1000 µg/ mL. Como controle negativo foram utilizadas as suspensões de hemácias sem tratamento (0% de hemólise) e como controle positivo, hemácias tratadas com 1 % de triton X-100 (100% hemólise). Os tubos foram incubados por 1 h a  $22 \pm 2$  °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 700 x g por cinco minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria, realizando a leitura a 540 nm (RANGEL *et al.*, 1997).

#### 4.14 ATIVIDADE ANTI-HEMOLÍTICA

A análise da fragilidade osmótica das hemácias foi realizada utilizando suspensões de hemácia a 0,5 % em solução salina, preparadas conforme descrito anteriormente. Diferentes concentrações da substância-teste foram utilizadas: 50, 100, 500 e 1000 µg/ mL. Foi realizado o tratamento das suspensões de hemácias durante 1h a  $22 \pm 2$  °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 400 x g por 5

min e o sobrenadante descartado. As hemácias foram ressuspensas em uma solução salina hipotônica a 0,24 % por 1h a  $22 \pm 2$  °C. Após esse período, foi realizada a centrifugação a 700 x g por cinco minutos e a hemólise do sobrenadante foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm. Como controle negativo foram utilizadas as suspensões de hemácias sem tratamento em meio salino isotônico (0% de hemólise) e, como controle positivo, hemácias em meio salino hipotônico sem tratamento (100% hemólise) (DACIE; LEWIS, 2001).

#### 4.15 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS

As células de mucosa bucal foram coletadas através de esfregaços realizados na cavidade bucal utilizando-se escovas citológicas (*cytobrush*). Após o esfregaço, as escovas contendo as células foram colocadas em solução salina (0,9% de NaCl), a qual é considerada um excelente meio de conservação das células até a etapa de preparação das lâminas (KASSIE *et al.*, 2001).

As células foram lavadas duas vezes em solução salina e ressuspensas também em solução salina. Após a terceira lavagem, as células foram expostas (*ex vivo*) à substância nas concentrações 50, 100, 500 e 1000 µg /mL por 30 min. As células tratadas com peróxido de hidrogênio a 0,0005% foram utilizadas como controle positivo, e as células não tratadas, como controle negativo. Após o tempo determinado, o material foi centrifugado e o sobrenadante descartado antes da preparação do esfregaço.

As células foram homogeneizadas e foram feitos os esfregaços em lâminas, aguardando em temperatura ambiente as secagens dos mesmos, durante 15 min. Em seguida, foram fixados com metanol: ácido acético (3: 1) por 15 min e corados com Giemsa 2 %. As células foram observadas ao microscópio óptico e avaliadas 1000 células em cada lâmina, analisando a presença ou não de alterações como cariólise, cariorrexe, micronúcleo e binucleação (THOMAS *et al.*, 2008; GABRIEL *et al.*, 2006).

#### 4.16 ANÁLISE *IN SILICO* DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

Violações das regras de Lipinski *et al.* (1997), Ghose, Viswanadhan e Wendoloski (1999), Veber *et al.*, (2002) e Egan, Merz e Baldwin (2000) ajudam a avaliar as características farmacocinéticas de substâncias candidatas a drogas. Os

seguintes parâmetros foram avaliados sobre a substância A2: propriedades físico-químicas, lipofilicidade, solubilidade em água e semelhança com drogas, usando o software online gratuito SwissADME ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch)). Tais resultados foram analisados usando as regras de Lipinski (1997), Ghose (1999), Veber (2002) e Egan (2000).

#### 4.17 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO COM ANTIBACTERIANOS-PADRÕES

O ensaio de associação pelo método *checkerboard* é feito através de microdiluição e avalia a CIM de drogas sozinhas e combinadas. A partir do índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) é possível definir a natureza da interação: sinérgica, aditiva, indiferente ou antagônica (EUCAST, 2000; BONAPACE *et al.*, 2002).

Nesse ensaio, foi analisada a associação de 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida com os antibacterianos: ciprofloxacino, cefepima, ceftazidima, meropenem e imipenem.

Inicialmente, 50 µL de caldo BHI foram adicionados nos poços de microplacas estéreis contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U”. Em seguida, 50 µL de diferentes concentrações (CIM/ 8, CIM/ 4, CIM/ 2, CIM, CIM x 2, CIM x 4 e CIM x 8) da 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida e dos antibacterianos-padrões foram adicionados na microplaca no sentido horizontal e vertical, respectivamente. Por fim, foram adicionados os inóculos bacterianos ( $1 \times 10^7$  UFC/ mL) em cada poço. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C durante 24-48 horas e em seguida foi observado o crescimento bacteriano (WU *et al.*, 2017).

O ensaio de *checkerboard* resulta em várias diferentes combinações. O valor da combinação mais efetiva é determinado através do ICIF, que é calculado através da soma das concentrações inibitórias fracionadas (CIFs):  $CIF_A + CIF_B$ , onde A representa 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida e B o antibacteriano-padrão. A  $CIF_A$ , por sua vez, é calculada através da relação  $CIM_A$  combinado/  $CIM_A$  sozinho, enquanto que o  $CIF_B$  corresponde a  $CIM_B$  combinado/  $CIM_B$  sozinho (EUCAST, 2000; BONAPACE *et al.*, 2002). Este índice é interpretado da seguinte forma (WU *et al.*, 2017):

- Sinergismo:  $ICIF \leq 0,5$
- Aditividade:  $0,5 < ICIF \leq 1$

- Indiferença:  $1 < ICIF \leq 4$
- Antagonismo:  $ICIF > 4$

#### 4.18 CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

A avaliação do potencial de inibição da formação de biofilme bacterianos foi feita utilizando-se placas de microdiluição incubadas estaticamente com caldo BHI, contendo diferentes concentrações da substância-teste na presença dos inóculos bacterianos (concentração final  $10^7$  UFC/ mL). O controle negativo foi feito com células não tratadas. Após 24 horas de incubação a  $35 \pm 2$  °C, o conteúdo dos poços foi descartado e as placas lavadas com água destilada estéril, a fim de remover as células planctônicas, seguido de secagem em temperatura ambiente.

Após a secagem, foi adicionada solução de violeta cristal a 1% nos poços, e as placas serão deixadas em repouso por 40 min. Em seguida, o corante foi descartado e os excessos nas paredes dos poços foram removidos por lavagem com água destilada estéril. Por fim, as placas foram expostas à secagem em temperatura ambiente e foi adicionado etanol absoluto aos poços, o qual permaneceu durante 30 min até que as placas fossem lidas em um espectrofotômetro de microplaca (Multiskan GO/Thermo Fisher Scientific Corporation®/ Vantaa/ Finlândia) a 590 nm. Todas as análises foram realizadas em quintuplicata. A porcentagem de inibição do biofilme foi calculada através da seguinte equação: % de inibição da formação de biofilmes =  $[(ABS_{590nm} \text{ controle} - ABS_{590nm} \text{ teste}) / ABS_{590nm} \text{ controle}] \times 100$  (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2012).

#### 4.19 CAPACIDADE DE AÇÃO SOBRE BIOFILME PRÉ-FORMADO

Para analisar o potencial da substância-teste contra biofilmes pré-formados, as microplacas foram previamente incubadas com caldo BHI e inóculos bacterianos (concentração final  $10^7$  UFC/ mL) por 24-48 h a  $35 \pm 2$  °C, para que os biofilmes fossem formados nos poços (RAJASEKHARAN *et al.*, 2017). Em seguida, o conteúdo dos poços foi removido e foi adicionado caldo de cultura fresco, contendo diferentes concentrações da substância-teste. Novamente, as microplacas foram incubadas estaticamente nas mesmas condições de tempo e temperatura e o mesmo processo descrito anteriormente foi realizado para avaliação da ação da substância sobre os

biofilmes previamente formados nas placas de microdiluição. Todas as análises foram realizadas em quintuplicata.

#### 4.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados foi realizada conforme orientações estatísticas, de acordo com cada metodologia utilizada, para selecionar os testes mais adequados em relação a cada variável. Foram empregados o teste “*t-Student*” ou análise de variância (ANOVA) paramétrica ou não-paramétrica, seguido de testes posteriores adequados para cada parâmetro obtido. Os resultados foram considerados significativos apenas quando  $p < 0,05$ . Todos os resultados foram analisados com o software GraphPadPrism versão 6.0 para Windows, EUA.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 POTENTIAL OF 2-CHLORO-N-(4-FLUORO-3-NITROPHENYL)ACETAMIDE AGAINST *Klebsiella pneumoniae* AND *IN VITRO* TOXICITY ANALYSIS

<https://doi.org/10.3390/molecules25173959>

Artigo publicado em 31 de agosto de 2020 na revista *Molecules* (ISSN 1420-3049).  
Qualis Farmácia (quadriênio 2013-2016): B1.

Article

# Potential of 2-Chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide Against *Klebsiella pneumoniae* and In Vitro Toxicity Analysis

Laísa Cordeiro <sup>1,\*</sup> , Hermes Diniz-Neto <sup>1</sup> , Pedro Figueiredo <sup>1</sup>, Helivaldo Souza <sup>2</sup> , Aleson Sousa <sup>1</sup> , Francisco Andrade-Júnior <sup>1</sup>, Thamara Melo <sup>1</sup>, Elba Ferreira <sup>1</sup> , Rafael Oliveira <sup>2</sup>, Petrónio Athayde-Filho <sup>2</sup>, José Barbosa-Filho <sup>1</sup> , Abrahão Oliveira-Filho <sup>3</sup> and Edeltrudes Lima <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, 58033-455 João Pessoa, Paraíba, Brazil; hermes.dn@hotmail.com (H.D.-N.); pedrotrfigueiredo@gmail.com (P.F.); aleson\_155@hotmail.com (A.S.); juniorfarmacia.ufcg@outlook.com (F.A.-J.); th.rmelo@outlook.com (T.M.); elbaferreira99@gmail.com (E.F.); jbarbosa@ltf.ufpb.br (J.B.-F.); edelolima@yahoo.com.br (E.L.)

<sup>2</sup> Chemistry Department, Exact and Natural Sciences Center, Federal University of Paraíba, 58033-455 João Pessoa, Brazil; helivaldog3@gmail.com (H.S.); rfarias.quimica@gmail.com (R.O.); athayde-filho@quimica.ufpb.br (P.A.-F.)

<sup>3</sup> Rural Health and Technology Center, Federal University of Campina Grande, 58708-110 Patos, Brazil; abrahao.farm@gmail.com

\* Correspondence: laisavilar@gmail.com; Tel.: +55-83-3216-7347

Received: 9 July 2020; Accepted: 21 July 2020; Published: 31 August 2020



**Abstract:** *Klebsiella pneumoniae* causes a wide range of community and nosocomial infections. The high capacity of this pathogen to acquire resistance drugs makes it necessary to develop therapeutic alternatives, discovering new antibacterial molecules. Acetamides are molecules that have several biological activities. However, there are no reports on the activity of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide. Based on this, this study aimed to investigate the in vitro antibacterial activity of this molecule on *K. pneumoniae*, evaluating whether the presence of the chloro atom improves this effect. Then, analyzing its antibacterial action more thoroughly, as well as its cytotoxic and pharmacokinetic profile, in order to contribute to future studies for the viability of a new antibacterial drug. It was shown that the substance has good potential against *K. pneumoniae* and the chloro atom is responsible for improving this activity, stabilizing the molecule in the target enzyme at the site. The substance possibly acts on penicillin-binding protein, promoting cell lysis. The analysis of cytotoxicity and mutagenicity shows favorable results for future in vivo toxicological tests to be carried out, with the aim of investigating the potential of this molecule. In addition, the substance showed an excellent pharmacokinetic profile, indicating good parameters for oral use.

**Keywords:** 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide; *Klebsiella pneumoniae*; antibacterial; toxicity; minimum inhibitory concentration

## 1. Introduction

The *Klebsiella pneumoniae* bacteria, belonging to the Enterobacteriaceae family, are Gram-negative, facultative, immobile, and encapsulated anaerobes. It is one of the opportunistic pathogens of greatest clinical relevance, known to be associated with nosocomial infections. It is estimated that this species, alone, is responsible for approximately one third of all infections caused by Gram-negative bacteria in general, causing, for example, pneumonia, urinary tract infections, bacteremia, endocarditis, and liver

abscesses. This pathogen is also involved in serious community infections, such as necrotizing pneumonia, pyogenic liver abscesses, and endogenous endophthalmitis [1,2].

In addition to being a highly prevalent species, the appearance of hypervirulent strains of *K. pneumoniae* has further expanded the number of people susceptible to infections by this species, increasing, for example, the number of cases in immunocompetent individuals. The species is also an important source of resistance to antibiotics, presenting a great capacity to acquire plasmids with genes that give them resistance to multiple antibacterials [2]. As explained by Paczosa and Mecsas [1], this pathogen is gaining more notoriety, since the increase in the number of serious infections and the growing scarcity of effective medications bring a great challenge in the treatment of these diseases.

In 2017, the World Health Organization (WHO) [3] released for the first time a list of resistant microorganisms that pose a threat to human health and for which there is a priority need for the development of new antibiotics. The experts used as a basis for the construction of this document criteria such as mortality, prevalence of resistance, and transmissibility. The list was divided into three levels of need for antibiotic development: critical, high, and medium. Compounding the critical group are Gram-negative bacteria, more specifically *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae—which include *K. pneumoniae*—resistant to third-generation carbapenems and cephalosporins [3].

One of the objectives of the list released by the WHO is to guide research strategies for new antibacterials. In recent years, experts have already warned of the difficulty in combating Gram-negatives, especially [4]. Quinolones, discovered in 1962, were the last new class of antibiotic with activity against these bacteria. Of the 44 antibacterials under study for development, currently only 15 have some type of action against Gram-negative and only five have progressed to a phase 3 clinical study, but all of these are substances resulting from molecular modifications of drugs already on the market [5,6]. Health authorities around the world are looking for solutions to this crisis and emphasize that we urgently need to develop new alternatives for the treatment of these infections [7,8].

The amide group is widely found and is of fundamental importance for the biological and material properties of a vast number of compounds created by man and present in nature [9]. As Aschale [10] explains, there has been considerable interest in making substitutions for acetanilide derivatives due to this group being present in several synthetic drugs related to a wide range of biological activities, such as antibacterial, antiviral, antifungal, antihelmintic, analgesic, and anti-inflammatory activities.

The acetamides are widely used as herbicides in agriculture, showing potent activity against pests [11]. There are some reports of acetamide derivatives as antimicrobial agents. Katke, Amrutkar, and Khairnar [12] demonstrated excellent antibacterial and antifungal activity for these compounds, Patel et al. [13] synthesized an acetamide from coumarin and obtained a product with good activity against several strains, including *Mycobacterium tuberculosis*. Jetty, Chidurala, and Meshram [14] demonstrated that the combination of an acetamide with monobactamic antibiotic showed good activity against Gram-positive and negative.

In the acetamide group, the presence of the chloro atom seems to improve the antimicrobial activity of these molecules. In a study by Bravo et al. [15] the antimicrobial activity of *N*-(2-hydroxyphenyl)acetamide against *Candida albicans* was evaluated. As a result, the absence of activity against this microorganism was observed. On the other hand, the same substance with the addition of a chloro atom (2-chloro-*N*-(2-hydroxyphenyl)acetamide) was able to inhibit 96.6% of *C. albicans* strains. Thus, the addition of chlorine to the alpha carbon caused the molecule to show activity against these yeasts.

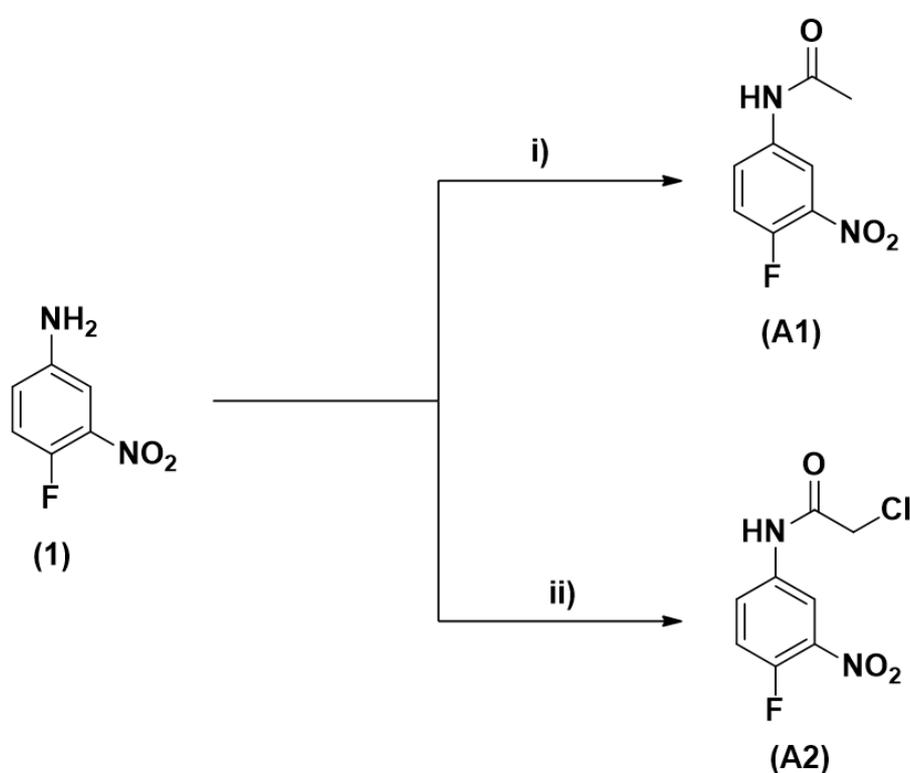
The *N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide (A1) and 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide (A2) are substances commonly used as reaction intermediates [16,17], about which there are still no reports in the scientific literature on their biological activities. In view of the antimicrobial potential of acetamides and chloroacetamides, and the urgent need to develop new therapeutic alternatives for the treatment of infections caused by *K. pneumoniae*, this study aimed to investigate the antibacterial activity of these molecules on *K. pneumoniae*, evaluating whether the presence of the chloro atom improves this effect. Then, the most promising molecule was investigated, analyzing its antibacterial

action more thoroughly, as well as its cytotoxic and pharmacokinetic profile, in order to contribute to future studies for the viability of a new antibacterial drug.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Chemistry

The target molecules **A1** and **A2** were synthesized using specific acylating agents for each one (Figure 1). The compound *N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide (**A1**) was obtained with 85% yield from the acetylation reaction of 4-fluoro-3-nitroaniline with acetic anhydride at room temperature [16]. The compound 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide (**A2**) was obtained from the reaction between 2-chloroacetyl chloride and 4-fluoro-3-nitroaniline in the presence of triethylamine ( $\text{Et}_3\text{N}$ ), with a yield of 80% [17]. All compounds were purified using the recrystallization method and their purities were confirmed by the melting point.



**Figure 1.** Synthetic route for the synthesis of the target molecules. (**A1**): *N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide, (**A2**): 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide. Reagents and conditions: (i)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , rt, 24 h, 85%; (ii) 2-chloroacetyl chloride,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DCM, 0 °C to rt, 20 h, 80%.

The structures of the compounds **A1** and **A2** were characterized by infrared (IR),  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (Supplementary Materials). In the hydrogen spectra of the compounds, the proton signal attributed to N-H can be observed in the region between 8.47 and 10.37 ppm. For compound **A1**, a signal assigned to three methyl protons in the form of a singlet referring to the acetyl group is observed at 2.07 ppm. In the spectrum of compound **A2** was observed a referring singlet for two methylenic protons ( $\text{CH}_2$ ) at 4.22 ppm. In all compounds, aromatic protons are in the range of 7.29–8.48 ppm. In the carbon spectra of the synthesized compounds, we observed the characteristic signal of amide carbonyl in the region of 164.53–168.97 ppm. In the spectrum of compound **A1** the signal at 23.89 ppm refers to the methyl carbon of the acetyl group. In compound **A2** a signal referring to methylene carbon ( $\text{CH}_2$ ) at 42.81 ppm was observed. In all compounds, the signals attributed to aromatic carbons were found at 115.27–152.44 ppm.

In the infrared (IR) spectra of all compounds, we can observe stretches of approximately  $1678\text{ cm}^{-1}$  referring to the secondary amide carbonyl. For all compounds, the N-H stretching occurred around  $3300\text{ cm}^{-1}$ . Folding bands of N-H for all compounds showed absorption values close to  $1610\text{ cm}^{-1}$ . The asymmetric and symmetrical stretches related to the  $\text{NO}_2$  group of all molecules showed absorption values in the region of  $1529\text{ cm}^{-1}$  and  $1332\text{--}1338\text{ cm}^{-1}$ , respectively. The C-F stretches of aromatic compounds occurred around  $1238\text{ cm}^{-1}$ .

## 2.2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Determination

Two acetamide derivatives were synthesized: *N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl) acetamide (**A1**) and 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide (**A2**) (Figure 1), in order to assess which molecule, among these, has the best antibacterial activity on *K. pneumoniae* and whether the presence of the chloro atom in the molecule is capable of interfering with biological activity. The only structural difference between these molecules is at carbon 2 of the amide portion, where in **A2** there is a chloro atom, and in **A1** this atom is absent.

The previous screening for the antibacterial activity evaluation of the molecules was done by determining the minimum inhibitory concentration (MIC). It was possible to observe that **A1** presented MIC of  $1024\text{ }\mu\text{g/mL}$  for 100% of the *K. pneumoniae* strains used in this study, while **A2** resulted in a MIC of  $512\text{ }\mu\text{g/mL}$  for the same strains (Table 1).

**Table 1.** Minimum inhibitory concentration (MIC) of **A1** and **A2** against *K. pneumoniae* strains.

<i>K. pneumoniae</i> Strains	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<b>A1</b>	<b>A2</b>
ATCC-700603	1024	512
KP-25	1024	512
KP-26	1024	512
KP-56	1024	512
KP-83	1024	512
KP-87	1024	512
KP-138	1024	512
KP-143	1024	512
KP-166	1024	512
KP-173	1024	512
KP-176	1024	512
KP-260	1024	512
KP-326	1024	512

The results of the antimicrobial activity suggest that the chloro atom is directly related to the potency of the antibacterial activity observed, since the addition of this atom (**A2** substance) made its antibacterial activity twice as potent as that of its precursor (**A1** substance).

A study by Katke, Amrutkar, and Khairnar [12] investigated the antibacterial potential of thirteen different acetamides using the agar diffusion methodology. As results, they observed zones of inhibition ranging between 7 and 30 mm against *Escherichia coli*, 16–35 mm against *Pseudomonas aeruginosa* and 10–36 mm on *Staphylococcus aureus*. Only two of the thirteen substances evaluated did not show antibacterial activity for any strain tested, showing the excellent biological potential of acetamides.

In addition, a study by Bravo et al. [15] showed that the presence of the chloro atom seems to improve the antimicrobial activity of these molecules. The authors evaluated the antimicrobial activity of *N*-(2-hydroxyphenyl) acetamide against *Candida albicans* was evaluated and the substance did not have the ability to inhibit fungal growth. However, the same substance with the addition of a chloro atom (2-chloro-*N*-(2-hydroxyphenyl)acetamide) was able to inhibit 96.6% of *C. albicans* strains. Thus, the addition of chloro to the alpha carbon was essential for the biological activity of the molecule, similarly to the results obtained in this study.

At the present work, the **A1** and **A2** MICs against *K. pneumoniae* show a moderate to weak antibacterial activity of these acetamides. However, it is important to note that there are no reports of antimicrobial activity of these substances and the results indicate their potential applicability for use against bacterial strains, being a starting point for new structural changes to be made, aiming to improve this biological activity. It is interesting that more analyzes are carried out on the action of these substances against other bacterial species, since the results may vary and even be more favorable. Given the current need to discover new antibiotic pharmacological classes, it is interesting that microbiological studies with this group of molecules are further explored.

Due to the **A2** molecule demonstrated greater potential against *K. pneumoniae*, it was selected as the object of study in the present work, to better evaluate its antibacterial and cytotoxic effect.

### 2.3. Molecular Docking Analysis

To understand what is the possible molecular target on which the **A1** and **A2** molecules act to exert the observed antibacterial effect, as well as to better investigate the influence of the chloro atom to anchor the molecule in the active site of the target enzyme, molecular docking analyzes were performed.

The accuracy of molecular docking was validated through re-docking, where it was observed that the RMSD value for the analyzed enzymes remained within the acceptable range 0–2 Å [18]. Table 2 shows the binding energies of the two molecules with the chosen enzymes. The **A2** substance showed better binding energies compared to **A1**, for all tested enzymes, showing that the chloro helps the molecule to have a more effective anchoring in different active sites.

**Table 2.** Binding energies (Moldock score) of PDB enzymes and tested compounds.

Enzyme	Classification	Moldock Score (kcal·mol <sup>-1</sup> )	RMSD (Å)	Moldock Score (kcal·mol <sup>-1</sup> )	
				A1	A2
Glucosamine-6-Phosphate Synthase (2VF5)	Transferase	−89.1	0,18	−52.9	−58.8
FosA (5V3D)	Transferase	−62.3	0,19	−42.6	−46.5
PBP1b (5HLA)	Transferase	−123.4	0,35	−52.2	−59.0
β-lactamase (2ZD8)	Hydrolase	−82.5	0.33	−35.7	−37.3
PBP3 (3PBS)	Hydrolase	−165.5	0.34	−55.6	−59.0
FosAKP (6C3U)	Transferase	−95.2	0.24	−47.5	−55.2
DNA gyrase (1AJ6)	Topoisomerase	−121.3	0.47	−44.0	−50.8
Topoisomerase IV (1S14)	Isomerase	−154.9	0.40	−54.8	−56.8

Among all tested enzymes, **A2** showed better binding energies for the enzymes penicillin binding proteins (PBPs) 1 and 3, with −59.0 kcal·mol<sup>-1</sup> for both enzymes. In addition to the values of binding energy, another parameter of extreme importance is the interactions carried out with the active site of the enzyme. With PBP1, the **A2** and **A1** molecules performed hydrogen bonding interactions with the Thr701, Thr 699, Asn574, and Ser510 residues, together with several Van der Walls interactions with other residues from the active site, as can be seen in Figure 2. However, the presence of chloro in **A2** is fundamental to better stabilize this molecule in the active site of the enzyme, due to Van der Walls interactions with the Ser510 and Thr702 residues that are important for a good anchorage in this active site [19]. These differences in anchoring reflect the potency of the antibacterial activity that was observed previously, confirming that the **A2** molecule has a more pronounced antibacterial effect.



Table 3. Cont.

<i>K. pneumoniae</i> Strains	A2	
	MBC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Effect
KP-166	512	Bactericide
KP-173	512	Bactericide
KP-176	512	Bactericide
KP-260	512	Bactericide
KP-326	512	Bactericide

A bactericidal substance is capable of killing the bacterial cell, while bacteriostatic substances inhibit or slow its growth without causing death. A drug is considered to exhibit bactericidal activity when the ratio between MBC and MIC is  $\leq 4$  [21,22]. Thus, since the MIC of A2 was 512  $\mu\text{g/mL}$  and the MBC was also 512  $\mu\text{g/mL}$  for all *K. pneumoniae* strains, there is a 1:1 proportion. Therefore, the substance A2 acted in a bactericidal manner, from the MIC.

Data on the classification of a given substance as bacteriostatic or bactericidal can provide valuable information on the potential action of antibacterial agents in vitro. However, these concepts are applicable to experiments in standardized conditions in vitro and can vary according to the type of bacteria, amount of inoculum and duration of the test. These variations are, therefore, observed in clinical practice, where the conditions found are as varied as possible [22]. Thus, it is necessary to combine this information with the pharmacokinetic and pharmacodynamic data of this acetamide, to provide a more significant prediction of in vivo efficacy.

### 2.5. Time-Kill Kinetics Against *K. pneumoniae*

To assess the time of action of A2 on *K. pneumoniae*, time-kill kinetics was performed, evaluating the number of colony-forming units (CFU) over 24 h of cell exposure to the substance. As shown in Figure 3, after 10 h of treatment with A2 it is possible to observe the total reduction of viable cells. The same effect is observed after 6 h in the presence of A2 in the concentration corresponding to  $2\times$  MIC. Bactericidal activity was defined as a  $\geq 3$ -log reduction in bacterial counts ( $\log_{10}$  CFU/mL) [23], therefore, these results confirm the data observed in the determination of the minimum bactericidal concentration, proving that A2 acts as a bactericide agent, from the MIC.

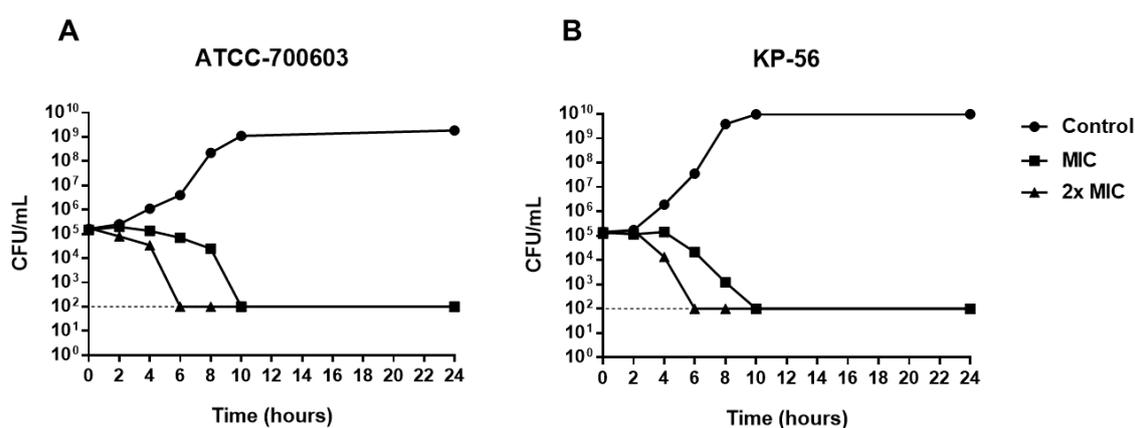


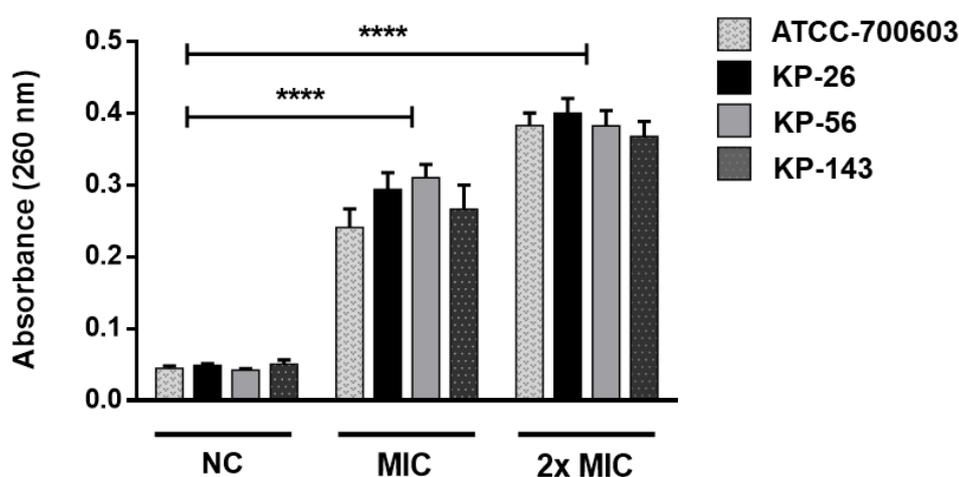
Figure 3. Time-kill curve for *K. pneumoniae* (A) ATCC-700603 and (B) KP-56 treated with A2 at MIC and  $2\times$  MIC concentrations.

Although A2 MIC and  $2\times$  MIC are bactericidal, the time-kill kinetics is reduced with increasing concentration, as observed in the dead time curve (Figure 3). Thus, the higher the concentrations of A2 substance, the shorter the time required to obtain the bactericidal effect.

## 2.6. Effect on Bacterial Cell Integrity

The analysis of molecular docking suggests that **A2** acts by inhibiting the PBP enzyme, responsible for maintaining the bacterial cell wall. Agents acting on this target cause a series of destabilizations, which result in cell lysis [20] and consequent release of cytoplasmic content. In these cases, cytoplasmic ions such as potassium and phosphate are first released to the external environment, followed by larger molecules such as deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA), in addition to other materials. The nucleotides have a strong absorption at 260 nm and, therefore, it is possible to measure cell lysis through UV absorption of the supernatant of cells treated with the antibacterial substance [24,25].

The Figure 4 shows the results when *K. pneumoniae* is treated with different concentrations of **A2** (MIC and 2× MIC) compared to untreated cells (negative control). After 10 h of treatment with **A2** at MIC, there is a significant release of cytoplasmic contents. Cell lysis is also evident after six hours of **A2** action at a concentration corresponding to 2× MIC.



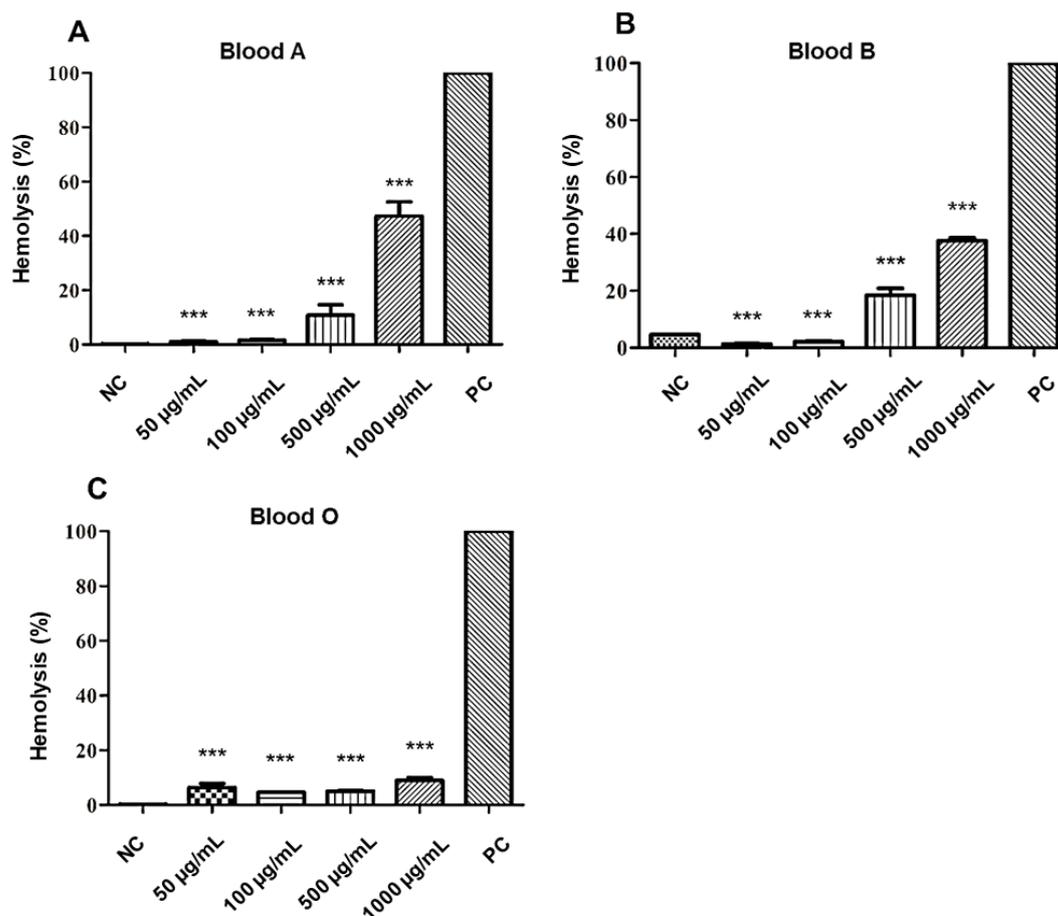
**Figure 4.** The effect of **A2** on bacterial cell integrity. Release of 260 nm absorbing material from *K. pneumoniae* suspensions treated with MIC and 2× MIC of **A2** for 10 h and 6 h, respectively. Statistical analysis compared to negative controls (NC): \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .

The results indicated that irreversible damage to *K. pneumoniae* cells can occur, leading to the loss of cellular constituents, such as nucleic acid and some essential molecules, causing bacterial lysis. These results reinforce the previous data, confirming the bactericidal effect of **A2** and its possible action on PBP enzyme.

## 2.7. Hemolytic Activity

The toxicity of bioactive substances must be assessed to ensure less toxic effect on the system to which it is intended for therapeutic application. In this context, tests with in vitro cytotoxicity screenings are a good alternative to assess the toxic potential of substances. In a study by Rangel et al. [26], red blood cells were used to determine the toxicity of promising drugs. Its effect was classified by percentage considering: low (0% and 40%), moderate (40% and 80%), and high above (80%).

The analysis of the hemolytic potential of the **A2** molecule showed a low hemolysis, being approximately 4–20% at 50–500 µg/mL concentrations, in all tested blood types. The highest concentration of the tested molecule (1000 µg/mL) against the erythrocytes of the ABO system demonstrated a percentage of lysis that varied according to blood type. On types A and B, moderate hemolysis was obtained, ranging from 37–47%. However, for type O, a low percentage of hemolysis was observed, with an average of 8% of erythrocyte lysis, as can be seen in Figure 5.



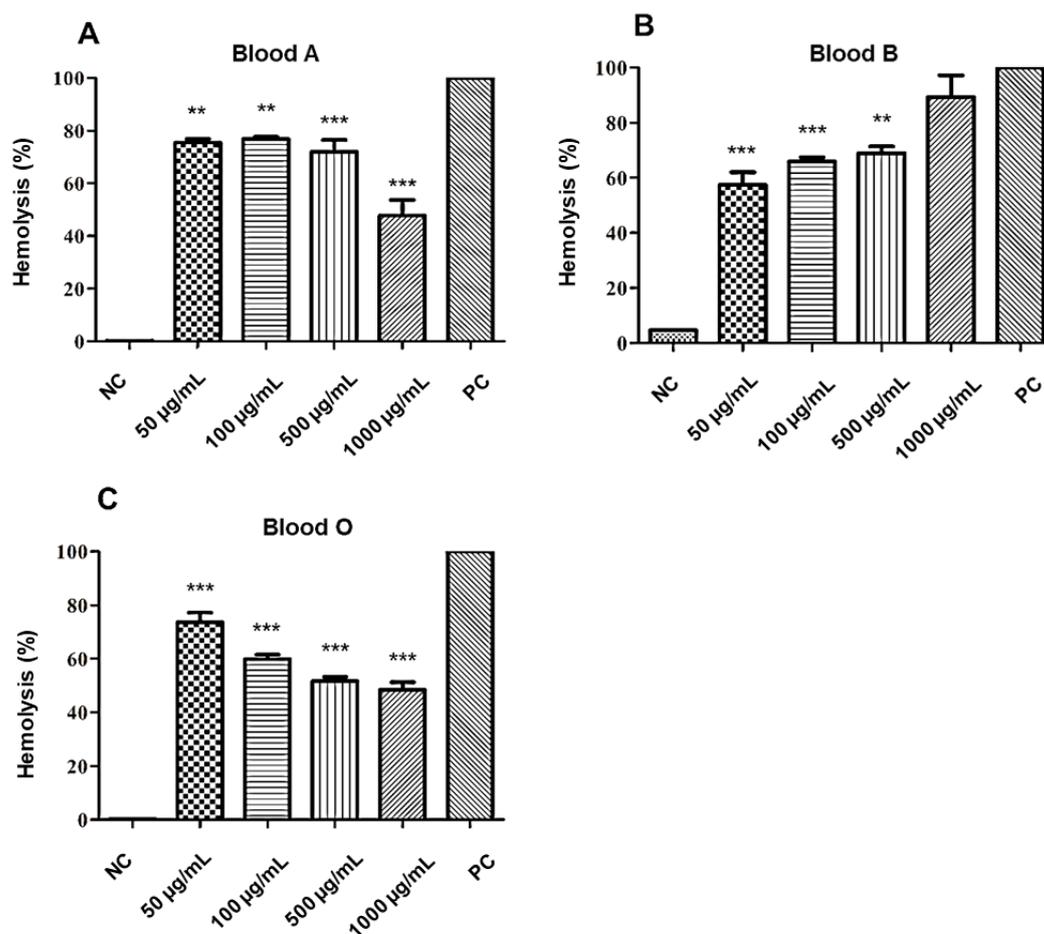
**Figure 5.** Cytotoxic effect of **A2** on red blood cells (RBC) of the different blood types of the ABO system: (A) type A, (B) type B, and (C) type O. NC: negative control. PC: positive control. Statistical analysis compared to positive control: \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

The results suggest that **A2** molecule has less potential for hemolysis in the absence of surface carbohydrates from red cell membranes, such as *N*-acetylgalactosamine (serotype A) and *D*-galactose (serotype B), since the assay revealed a better interaction of the molecule in order  $O < B < A$  blood types.

Other acetamide derivatives with significant biological activity also demonstrate low cytotoxic potential. In studies carried out by Gentile and Calabrese [27] evaluating the *in vitro* toxicity of acetamide-derived molecules with potential herbicide, the production of oxidative stress against the erythrocytes of rats, sheep, and dogs was not observed. The test describes, in addition to low levels of hemolysis, the reduction in oxidative stress of the test on the formation of MetHb. Likewise, in the present study, the results indicate that the **A2** molecule has a low toxicological effect when tested in human red blood cells.

### 2.8. Antihemolytic Activity

The anti-hemolytic evaluation of the **A2** molecule showed a percentage of hemolysis that is classified as moderate (>40% and <80%) [26], for all concentrations evaluated in the three blood types of the ABO system, except for the concentration of (1000 µg/mL), which presented hemolysis (>80%) in type B red blood cells. The osmotic protection performance was also perceived with an increase in the concentration of the tested substance, where, the higher the concentration tested, the better the red cell protection effect, as can be seen in Figure 6.



**Figure 6.** Anti-hemolytic effect of **A2** on red blood cells (RBC) of the different blood types of the ABO system: (A) type A, (B) type B, and (C) type O. NC: negative control. PC: positive control. Statistical analysis compared to positive control: \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ .

The concentration of 500 µg/mL of the **A2** molecule revealed a moderate potential to promote the stability and protection of the erythrocytes of the ABO system. However, there was a variation in lysis according to the blood type and concentration of the substance evaluated, in the following order  $O < A < B$ .

According to a study by Autore et al. [28] acetamide derivatives may have antioxidant and anti-inflammatory activity, revealing low toxicity potential in tests with liver cell lines. In this present study, the anti-hemolytic test revealed a moderate percentage of lysis, suggesting a higher concentration of the **A2** molecule to achieve good levels of protection for red blood cells. However, more studies need to be carried out to better investigate this protective activity.

### 2.9. Mutagenic Effect on Oral Mucosa Cells

In vitro genotoxicity studies evaluate the cytotoxic capacity of substances on certain cell types isolated in liquid media. The possible action of toxicity is revealed through the damage caused to the nucleus by the time of exposure to test substances. Cytotoxic effects can be verified by suggestive nuclear alterations, such as: micronucleus, binucleation, karyolysis, and cariorrexe [29].

The **A2** genotoxicity test showed the appearance of few cellular alterations compatible with toxic damage. The toxic findings were more present in the groups exposed to the  $H_2O_2$  solution (positive control). The cells treated with different concentrations of **A2** showed few cellular changes compared to the positive control, as can be seen in Table 4.

**Table 4.** Genotoxic profile of A2.

Group	Karyolysis	Karyorrhexis	Micronucleus	Binucleation	Normal
NC	1.50%	2.00%	2.75%	0.25%	93.50%
PC-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7.00%	10.75%	6.50%	1.00%	77.75%
A2-1000 µg/mL	5.00%	7.00%	2.00%	0.50%	83.50%
A2-500 µg/mL	4.00%	5.00%	0.70%	0.50%	86.80%
A2-100 µg/mL	3.00%	4.00%	0.50%	0.00%	92.50%
A2-50 µg/mL	1.00%	1.00%	0.50%	0.00%	97.50%

NC: negative control. PC: positive control.

The data reveal that **A2** showed low toxicity, with the presence of normal cells in amounts greater than 80% in all tested concentrations. Among the nuclear alterations found, karyolysis, and karyorrhexis were identified in greater quantities, although these indices are lower than those found in the positive control, suggesting a safe threshold of low toxicity of the **A2** molecule on the oral mucosa cells.

Other studies, such as the one carried out by Moore et al. [30], point out that some acetamides have low cytotoxic, clastogenic, aneugenic, or mutagenic potential, which reinforces the data found in this work. However, in order to better evaluate the possibility of using A2 and its derivatives as an antibacterial drug, further studies must be performed to ensure the safety of in vivo use.

#### 2.10. In Silico Analysis of Pharmacokinetic Parameters

In this work, the physical-chemical parameters of the A2 molecule were obtained through an in silico approach using the free online software SwissADME to verify its theoretical absorption. According to Table 5, the physical-chemical parameters analyzed according to the rules of Lipinski [31], Ghose [32], Veber [33], and Egan [34] it is possible to predict whether the molecule under study has the potential to be developed as a drug.

**Table 5.** In silico studies of Lipinski's parameters of terpinen-4-ol.

Parameters	A2
<b>Physicochemical Properties</b>	
Formula	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> ClFN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Molecular Weight	232.60 g/mol
Num. Heavy atoms	15
Fraction Csp <sup>3</sup>	0.12
Num. Rotatable Bonds	4
Num. H-bonds acceptors	4
Num. H-bonds donors	1
Molar Refractivity	54.33
TPSA <sup>1</sup>	74.92 Å <sup>2</sup>
<b>Lipophilicity</b>	
Consensus <sup>2</sup> Log P <sub>o/w</sub> <sup>3</sup>	1.33
<b>Water Solubility</b>	
Log S (Ali) Class <sup>4</sup>	-2.30 Soluble
<b>Druglikeness</b>	
Lipinski <sup>5</sup>	Yes; 0 violation
Ghose <sup>6</sup>	Yes; 0 violation
Veber <sup>7</sup>	Yes; 0 violation
Egan <sup>8</sup>	Yes; 0 violation
Bioavailability Score	0.55

<sup>1</sup> TPSA: Topological Polar Surface Area; <sup>2</sup> Consensus Log P<sub>o/w</sub> = Average of all five predictions; <sup>3</sup> Log P<sub>o/w</sub> = The partition coefficient between *n*-octanol/water; <sup>4</sup> Class = Ali class: insoluble < -10 < poor < -6 < moderately < -4 < soluble < -2 < very < 0 < highly; <sup>5</sup> Lipinski = MM ≤ 500; Log P<sub>o/w</sub> ≤ 5; H-bond donors ≤ 5; H-bond acceptors ≤ 10; <sup>6</sup> Ghose = 180 ≤ MM ≤ 480; 20 ≤ No. of atoms ≤ 70; 40 ≤ Molar Refractivity ≤ 130; -0.4 ≤ Log P<sub>o/w</sub> ≤ 5.6; <sup>7</sup> Veber = Num. Rotatable Bonds ≤ 10; TPSA ≤ 140 Å<sup>2</sup>; <sup>8</sup> Egan = Log P<sub>o/w</sub> ≤ 5.88; TPSA ≤ 131.6 Å<sup>2</sup>.

The *in silico* approach showed that the substance **A2** presents values of physicochemical parameters within the acceptable region based on the rules of Lipinski [31], Ghose [32], Veber [33], and Egan [34]. The hydrogen acceptors calculated was 4 and that of hydrogen donors was 1 and are in accordance with Lipinski's rule. To develop a molecule with the potential for a particular drug, the molecule must be able to cross plasma membranes. Thus, the partition coefficient of a substance in *n*-octanol and water (Log P), is an important parameter. According to the rules of Lipinski ( $\text{Log } P_{o/w} \leq 5$ ), Ghose ( $\text{Log } P_{o/w} \leq 5.6$ ), and Egan ( $\text{Log } P_{o/w} \leq 5.8$ ) the **A2** molecule fits the required conditions imposed, as its Log P is 1.33.

Another important factor for the development of a compound is the molar mass, since it is related to the transport of the drug within the body. The molecule under study has a molar mass of 232.60 g/mol, which meets the criteria of Lipinski and Ghose. Other important criteria are the number of rotatable connections and the value of the TPSA. According to Veber, molecules that have a number of rotatable bonds  $\leq 10$  and TPSA values  $\leq 140 \text{ \AA}$ , indicate that there is a high probability of being administered orally. According to Table 5, the molecule showed values of 4 for the number of rotatable bonds and a TPSA of  $74.92 \text{ \AA}^2$ . As for solubility (Log S), it considers an important quality of a drug for the absorption and distribution of the molecule in the body. According to the class presented in Table 5, substance **A2** is soluble, as it presented the Log S (coefficient of solubility determined by the ESOL method) with a value of  $-2.30$ .

Based on the above, *in silico* results show a favorable pharmacokinetic profile for **A2** substance. Inadequate penetration of the infection site is one of the main factors related to the failure of antibacterial therapies. The active drug needs to reach the bacteria in appropriate body fluids and tissues at concentrations necessary to kill or suppress pathogens' growth. Even for substances with good *in vitro* activity, the pharmacokinetic parameters are decisive for its clinical use [22]. Thus, **A2** presents characteristics that suggest a good drug candidate and can display a high prospect of being used orally, with excellent theoretical oral bioavailability and good solubility, which can guarantee adequate absorption and distribution *in vivo*.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Chemistry

The reagents 4-fluoro-3-nitroaniline, triethylamine ( $\text{Et}_3\text{N}$ ), acetic anhydride, chloroacetyl chloride, chloroform, and ethanol were purchased from Merck/Sigma-Aldrich® (Darmstadt, Germany). The recrystallization technique was used to purify the compound and its purity was confirmed from the melting point measurement using the MQAPF-302 (Microquímica, São Paulo, Brazil) apparatus. A Shimadzu spectrometer model IRPrestige-21 FT-IR (Barueri, São Paulo, Brazil) with an attenuated total reflection (ATR) accessory produced the infrared (IR) spectrum. The hydrogen and carbon nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were obtained from a Bruker Avance 400 apparatus. The hydrogen spectra ( $^1\text{H}$ ) were obtained at the frequency of 400 and 500 MHz using deuterated solvents chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) and dimethylsulfoxide (DMSO). The carbon spectra ( $^{13}\text{C}$ ) were obtained at the frequency of 101 and 126 MHz using deuterated solvents chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) and dimethylsulfoxide (DMSO). The chemical distances ( $\delta$ ) were generated in parts per million (ppm) and in Hertz (Hz) the coupling constants ( $J$ ) were determined.

#### 3.2. Preparation of *N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide (A1)

The 4-fluoro-3-nitroaniline (3.12 g, 20 mmol) is added, in small portions, in a 50 mL flask containing acetic anhydride (11 mL, 116 mmol) under constant stirring at room temperature. The reaction mixture is stirred for 12 h. At the end of the reaction, ice water is added and the reaction mixture was stirred for 30 min. The precipitate formed was filtered, washed with water and dried. The product was recrystallized from an ethanol/water mixture (8:2). Yield: 85%, brown solid. m.p.:  $142\text{--}144 \text{ }^\circ\text{C}$  (Lit. [16]:  $140\text{--}141 \text{ }^\circ\text{C}$ ). IV (ATR):  $\nu/\text{cm}^{-1}$  3356 (N-H), 3124, 3064 (C-HAr), 1678 (C=O), 1610 (N-H), 1529 and

1332 (NO<sub>2</sub>), 1482 (C=C), 1238 (C<sub>Ar</sub>-F), 1155, 1141 (C-H<sub>Ar</sub>), 833 (C-N for ArNO<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.37 (s, 1H, NH), 8.48 (dd, *J* = 6.9, 2.7 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.81 (ddd, *J* = 9.1, 3.9, 2.8 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.50 (dd, *J* = 11.2, 9.1 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 168.97, 150.19 (*J* = 257.8 Hz), 136.31 (*J* = 7.8 Hz), 136.05 (*J* = 3.3 Hz), 126.23 (*J* = 8.1 Hz), 118.75 (*J* = 21.8 Hz), 115.27 (*J* = 3.3 Hz), 23.89 [16].

### 3.3. Preparation of 2-Chloro-N-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide (A2)

The chloroacetyl chloride (2.71 g, 24 mmol) is added slowly in a 50 mL flask containing a mixture of 4-fluoro-3-nitroaniline (1) (3.12 g, 20 mmol) and Et<sub>3</sub>N (3, 3 mL, 0.024 moles) solubilized in 20 mL of CHCl<sub>3</sub> at 0 °C in an ice bath. At the end of the addition of chloroacetyl chloride, the ice bath is removed and the reaction is stirred at room temperature. After 20 h of reaction, the reaction mixture was subjected to extraction. The organic phase is washed with water (3 × 30 mL), brine (3 × 30 mL), dried over anhydrous sodium sulfate and then concentrated under reduced pressure, providing the precipitate. The material was purified using a mixture of ethanol/water (9:1) in a recrystallization process. Yield: 80%, brown solid, m.p.: 91–93 °C (Lit. [17]: 90–92 °C). IR (ATR): ν/cm<sup>-1</sup> 3332 (N-H), 3132, 3074 (C-H<sub>Ar</sub>), 2943 (C-H<sub>Aliph</sub>), 1678 (C=O), 1606 (N-H), 1529 and 1338 (NO<sub>2</sub>), 1492 (C=C), 1228 (C<sub>Ar</sub>-F), 831 (C-N for ArNO<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.47 (s, 1H, NH), 8.32 (dd, *J* = 6.4, 2.8 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.89–7.85 (m, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 7.29 (dd, *J* = 10.1, 9.1 Hz, 1H, CH<sub>Ar</sub>), 4.22 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.53, 152.43 (*J* = 263.6 Hz), 133.44, 133.41, 127.13 (*J* = 8.1 Hz), 119.13 (*J* = 22.1 Hz), 117.55 (*J* = 2.9 Hz), 42.81 [17].

### 3.4. Strains

The clinical isolates strains of *K. pneumoniae* were used in this study belong to the MICOTECA of the Antibacterial and Antifungal Activity Research Laboratory of the Federal University of Paraíba, Brazil, which are: KP-25, KP-26, KP-56, KP-83, KP-87, KP-138, KP-143, KP-166, KP-173, KP-176, KP-260, and KP-326. The American Type Culture Collection strain ATCC-700603 was used as controls. For use in the assays, bacterial suspensions were prepared in 0.9% saline solution, from fresh cultures, and adjusted to the McFarland standard 0.5 scale.

### 3.5. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

To assess the antibacterial activity of substances **A1** and **A2**, the minimum inhibitory concentration against *K. pneumoniae* strains was determined. The substances were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 5% and Tween-80 at 2%, to obtain emulsions in the concentrations necessary for use in the tests. The MIC determination was performed using the broth microdilution technique in a 96-well plate to obtain different concentrations of **A1** and **A2** [35]. In parallel, controls for sterility, cell viability, and interference of the vehicles used in the preparation of substance emulsions (DMSO and Tween-80) were also performed. MIC is defined as the lowest concentration capable of causing complete inhibition of bacterial growth after 24 h at 35 ± 2 °C.

### 3.6. Molecular Docking

The chemical structures of the compounds were designed using the software MarvinSketch 18.5, their energies minimized in the program Hyperchem v. 8.0.3, using the molecular mechanics method (MM +) and the semi-empirical method AM1 (Austin Model 1) [36]. The enzymes were obtained from the Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) together with their co-crystallized inhibitors, with PDB ID: 2VF52 (2.9 Å) [37], 5V3D3 (1.54 Å) [38], 5HLA4 (1.7 Å) [19], 2ZD85 (1.05 Å) [39], 3PBS6 (2.00 Å) [40], 6C3U7 (1.85 Å) [41], 1AJ68 (2.30 Å) [42], 1S149 (2.00 Å) [43]. Molecular docking was performed at Molegro Virtual Docker (MVD) software (v 6.0.1, Molegro ApS, Aarhus, Denmark), using the standard parameters of the software, the water molecules were removed and a template was generated in the co-crystallized inhibitor of the PDB.

### 3.7. Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

After MIC reading, the **A2** minimum bactericidal concentration was determined by removing aliquots from the microdilution plates in the wells corresponding to concentrations equivalent to MIC, 2× MIC, 4× MIC, and 8× MIC and inoculating in new plates containing only culture broth. All controls were performed in parallel. MBC is defined as the lowest concentration capable of causing complete inhibition of bacterial growth after 24 h at  $35 \pm 2$  °C [21,44].

### 3.8. Time-Kill Kinetics

The determination of the action time of **A2** substance against *K. pneumoniae* (ATCC-700603 and KP-56) was carried out exposing the microorganisms to concentrations equivalent to MIC and 2× MIC during times 0, 2, 4, 6, 8, 10, and 24 h. After incubation on Mueller–Hinton agar, bacterial colonies were counted. Bactericidal activity was defined as a  $\geq 3$ -log reduction in bacterial counts ( $\log_{10}$  CFU/mL) [45].

### 3.9. Effect on Bacterial Cell Integrity

The cell integrity can be assessed by releasing intracellular material, mainly nucleotides, which absorb 260 nm wavelengths. The *K pneumoniae* strains ATCC-700603, KP-26, KP-56, and KP-143 were used to perform this test. First, the bacterial inoculum was incubated in BHI broth ( $1 \times 10^7$  CFU/mL) overnight at  $35 \pm 2$  °C. Then, centrifugation was performed at  $400\times g$  for 10 min. The cell pellet was washed three times with sterile PBS (phosphate-buffered saline) and resuspended in PBS containing the **A2** substance at MIC and 2× MIC concentrations. As a negative control, suspensions that underwent the same procedures, but without treatment with the substance, were used. The tubes corresponding to the MIC were incubated for 10 h at  $35 \pm 2$  °C, and the tubes corresponding to the 2× MIC, for 6 h. After incubation, the suspensions were centrifuged at  $400\times g$  for 10 min and the supernatants were read on a spectrophotometer at 260 nm [46]. All analyses were performed in triplicate.

### 3.10. Human Erythrocytes and Oral Mucosa Cells Collection

The tests were performed according to the recommendations established by the Code of Ethics of the World Medical Association, after approval by the ethics committee of the Centro Universitário de Patos (number: 3621284). Blood samples (types A, B, and O) and smears of oral mucosa were donated by young, healthy adults.

### 3.11. Hemolytic Activity

The red blood cell (RBC) samples from blood donors were diluted in 0.9% NaCl at a 1:30 ratio and centrifuged at 2500 rpm for five minutes to obtain the 0.5% suspension free of white blood cells and platelets. Then, the **A2** substance was added to the red blood cell suspensions, at 50, 100, 500, and 1000  $\mu\text{g/mL}$  concentrations. As controls, a suspension of red cells without treatment (0% hemolysis) were used as a negative control and a suspension of red cells treated with 1% Triton X-100 (100% hemolysis) as a positive control. The assay was incubated for one hour at  $22 \pm 2$  °C. After that time, the samples were centrifuged at  $700\times g$  for 5 min and hemolysis was quantified by spectrophotometry at a wavelength of 540 nm [26].

### 3.12. Antihemolytic Activity

The analysis of the osmotic fragility of the red cells was performed using previously prepared red blood cell suspensions at 0.5%. Different concentrations (50, 100, 500, and 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) of the **A2** substance were used for the treatment of 0.5% RBC suspensions for 1h at  $22 \pm 2$  °C. The samples were centrifuged at 2500 rpm for 5 min and the supernatant was discarded. The erythrocytes were resuspended in a hypotonic solution of 0.24% sodium chloride for one hour at  $22 \pm 2$  °C. After this period, the samples were centrifuged at  $700\times g$  for 5 min and the hemolysis of the supernatant was quantified by spectrophotometry at 540 nm [47]. As controls, a suspension of untreated red blood

cells was used as a negative control (0% hemolysis) and in a hypotonic solution as a positive control (100% hemolysis).

### 3.13. Genotoxic Effects

First, the oral mucosa cells were collected from the donors, which was done with a cyto-brush (smear collector) in the cheek area, and the material obtained was placed in 5 mL of 0.9% NaCl [48]. As controls, cells treated with hydrogen peroxide 0.0005% (positive control) and untreated cells (negative control) were used. The cells were washed twice with saline and centrifuged for 10 min at 400× g and kept in saline. After the third wash, the cells were exposed (ex vivo) to A2 substance at 50, 100, 500, and 1000 µg/mL concentrations for 30 min. The material was centrifuged and the supernatant was discarded before smear preparation. The cells were homogenized in a vortex and placed on the slides at room temperature for drying for 15 min. Then, they were fixed with methanol: acetic acid (3:1) for 15 min and stained with 2% Giemsa. The cells were observed under an optical microscope and about 1000 cells were analyzed on each slide [49,50].

### 3.14. Statistical Analysis

The data were analyzed by the One-way Analysis of Variance (ANOVA) and by the Bonferroni post hoc test, using the GraphPadPrism software (version 6.0 for Windows, San Diego, CA, USA). The data were considered significant when  $p < 0.05$ .

### 3.15. In Silico Analysis of Pharmacokinetic Parameters

Violations of the rules of Lipinski [31], Ghose [32], Veber [33], and Egan [34] help to evaluate the pharmacokinetic characteristics of drug candidate substances. The following parameters were evaluated about A2 substance: Physicochemical properties, lipophilicity, water solubility, and druglikeness, using the free online software SwissADME ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch)). Such results were analyzed using the rules of Lipinski [31], Ghose [32], Veber [33], and Egan [34].

## 4. Conclusions

Based on the above, this study showed a good antibacterial potential for acetamides, especially 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl) acetamide (A2), of which chloro is responsible for improving its antibacterial activity, stabilizing the molecule at the site target enzyme. The substance possibly acts on PBP, promoting cell lysis. The analysis of cytotoxicity and mutagenicity show favorable results for future in vivo toxicological tests to be carried out, with the aim of investigating the potential of this molecule. In addition, the substance showed an excellent pharmacokinetic profile, indicating good parameters for oral use. Given the need to discover new antibacterial drugs in order to have alternatives against resistant infections, it is interesting that this substance serves as a starting point for future molecular changes aimed at improving its biological activity.

**Supplementary Materials:** The following are available online. Figure S1. FTIR (ATR) spectrum of A1 substance; Figure S2. <sup>1</sup>H NMR spectrum (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) of A1 substance; Figure S3. <sup>13</sup>C NMR spectrum (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) of A1 substance; Figure S4. FTIR (ATR) spectrum of A2 substance; Figure 5. <sup>1</sup>H NMR spectrum (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) of A2 substance; Figure S6. <sup>13</sup>C NMR spectrum (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) of A2 substance.

**Author Contributions:** Conceptualization: L.C., H.D.-N., P.F., A.S., and E.L.; methodology: L.C., H.D.-N., P.F., H.S., A.S., R.O., and P.A.-F.; software: L.C., H.D.-N., P.F., H.S., A.S., F.A.-J., and E.L.; validation: L.C., A.S., F.A.-J., T.M., E.F., R.O., J.B.-F., A.O.-F., and E.L.; formal analysis: L.C., P.F., and H.S.; investigation: L.C., P.F., H.S., A.S., F.A.-J., T.M., E.F., J.B.-F., A.O.-F., and E.L.; resources: L.C., J.B.-F., A.O.-F., and E.L.; data curation: L.C., J.B.-F., A.O.-F., E.M., and E.L.; writing—original draft preparation: L.C., P.F., H.S., and A.S.; writing—review and editing: L.C., P.F., H.S., A.S., J.B.-F., A.O.-F., and E.L.; visualization: L.C., P.F., H.S., A.S., J.B.-F. and E.L.; supervision: J.B.-F., A.O.-F., and E.L.; project administration: J.B.-F., P.A.-F., A.O.-F., and E.L.; funding acquisition: L.C., J.B.-F., A.O.-F., and E.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES), concession number: 88882.347018/2019-01; and the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq), concession number: 302519/2012-2.

**Acknowledgments:** The authors wish to thank for the support provided by the Federal University of Paraíba (UFPB) and the Brazilian funding agencies: CAPES, CNPq.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Cerebral Heart Infusion (Broth)
CFU	Colony Forming Units
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
MBC	Minimum Bactericidal Concentration
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MVD	Molegro Virtual Docker
MW	Molecular Weight
NC	Negative control
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Positive control
PDB	Protein Data Bank
RBC	Red Blood Cell
RMSD	Root Mean Standard Deviation
TPSA	Topological polar surface area

## References

1. Paczosa, M.K.; Mecsas, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol. Mol. Biol. R* **2019**, *80*, 629–661. [CrossRef] [PubMed]
2. Navon-Venezia, S.; Kondratyeva, K.; Carattoli, A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 252–275. [CrossRef] [PubMed]
3. World Health Organization (WHO). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Available online: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>. (accessed on 4 June 2020).
4. Exner, M.; Bhattacharya, S.; Christiansen, B.; Gebel, J.; Goroncy-Bermes, P.; Hartemann, P.; Heeg, P.; Ilschner, C.; Kramer, A.; Larson, E.; et al. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hyg. Infect. Control* **2017**, *12*. [CrossRef]
5. Willyard, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nat. News* **2017**, *543*, 15. [CrossRef] [PubMed]
6. Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327. [CrossRef]
7. Aminov, R.I.A. brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* **2010**, *1*, 134. [CrossRef]
8. Piddock, L.J.V. Understanding drug resistance will improve the treatment of bacterial infections. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 639–640. [CrossRef]
9. Ruider, S.A.; Maulide, N. Strong bonds made weak: Towards the general utility of amides as synthetic modules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13856–13858. [CrossRef]
10. Aschale, M. Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel substituted 2-chloroacetalides. *Int. J. ChemTech Res.* **2012**, *4*, 1437–1441.

11. Coleman, S.; Linderman, R.; Hodgson, E.; Rose, R.L. Comparative metabolism of chloroacetamide herbicides and selected metabolites in human and rat liver microsomes. *Environ. Health Perspect.* **2000**, *108*, 1151–1157. [[CrossRef](#)]
12. Katke, S.A.; Amrutkar, S.V.; Bhor, R.J.; Khairnar, M.V. Synthesis of biologically active 2-chloro-N-alkyl/aryl acetamide derivatives. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2011**, *2*, 148–156.
13. Patel, R.V.; Kumari, P.; Rajani, D.P.; Chikhaliya, K.H. Synthesis of coumarin-based 1, 3, 4-oxadiazol-2-ylthio-N-phenyl/benzothiazolyl acetamides as antimicrobial and antituberculosis agents. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 195–210. [[CrossRef](#)]
14. Jetti, V.; Chidurala, P.; Meshram, J.S. Synthesis of new Acetamide-conjugated Monobactam antibiotics. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2015**, *6*, 1553–1561.
15. Bravo, H.R.; Weiss-López, B.; Lamborot, M.; Copaja, S. Chemical basis for the antimicrobial activity of acetanilides. *J. Chil. Chem. Soc.* **2003**, *48*, 27–30. [[CrossRef](#)]
16. McFarlane, M.D.; Moody, D.J.; Smith, D.M. o-Nitroaniline Derivatives. Part 10. 5-and 6-Amino-1H-benzimidazole-3-Oxides. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* **1988**, *1*, 691–696. [[CrossRef](#)]
17. Peixoto, I.N.; Souza, H.D.S.; Lira, B.F.; Silva, D.F.; Lima, E.O.; Barbosa-Filho, J.M.; Athayde-Filho, P.F. Synthesis and Antifungal Activity against Candida Strains of Mesoionic System Derived from 1,3-Thiazolium-5-thiolate. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27*, 1807–1813.
18. Thomsen, R.; Christensen, M.H. MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3315–3321. [[CrossRef](#)]
19. King, D.T.; Wasney, G.A.; Nosella, M.; Fong, A.; Strynadka, N.C. Structural insights into inhibition of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1B. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 979–993. [[CrossRef](#)]
20. Kohanski, M.A.; Dwyer, D.J.; Collins, J.J. How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 423–435. [[CrossRef](#)]
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guideline M26-A*; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, PA, USA, 1999.
22. Pankey, G.A.; Sabath, L.D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *38*, 864–870. [[CrossRef](#)]
23. Wu, H.; Moser, C.; Wang, H.Z.; Høiby, N.; Song, Z.J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int. J. Oral. Sci.* **2015**, *7*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ziaee, E.; Razmjooei, M.; Shad, E.; Eskandari, M.H. Antibacterial mechanisms of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil against *Lactobacillus curvatus*. *LWT* **2018**, *87*, 406–412. [[CrossRef](#)]
25. Dasgupta, N.; Ramalingam, C. Silver nanoparticle antimicrobial activity explained by membrane rupture and reactive oxygen generation. *Environ. Chem. Lett.* **2016**, *14*, 477–485. [[CrossRef](#)]
26. Rangel, M.; Malpezzi, E.L.; Susini, S.M.; De Freitas, J. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon* **1997**, *35*, 305–309. [[CrossRef](#)]
27. Gentile, T.J.; Calabrese, E.J. Screening for potential hemolytic responses to environmental agents using a bioactivation system: Evaluation of six pesticides. *J. Environ. Sci. Health A* **1987**, *22*, 427–444. [[CrossRef](#)]
28. Autore, G.; Caruso, A.; Marzocco, A.; Nicolaus, B.; Palladino, C.; Pinto, A.; Popolo, A.; Sinicropi, M.S.; Tommonaro, G.; Saturnino, C. Acetamide Derivatives with Antioxidant Activity and Potential Anti-Inflammatory Activity. *Molecules* **2010**, *15*, 2028–2038. [[CrossRef](#)]
29. Sponchiado, G.; Adam, M.L.; Silva, C.D.; Soley, B.S.; de Mello-Sampayo, C.; Cabrini, D.A.; Correr, C.J.; Otuki, M.F. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *178*, 289–296. [[CrossRef](#)]
30. Moore, M.M.; Gollapudi, B.; Nagane, R.; Khan, N.; Patel, M.; Khanvilkar, T.; Roy, A.M.; Ramesh, E.; Bals, B.; Teymour, F.; et al. The food contaminant acetamide is not an in vivo clastogen, aneugen, or mutagen in rodent hematopoietic tissue. *Reg. Toxicol. Pharm.* **2019**, *108*, 104451. [[CrossRef](#)]
31. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *46*, 3–26. [[CrossRef](#)]
32. Ghose, A.K.; Viswanadhan, V.N.; Wendoloski, J.J. A Knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55–68. [[CrossRef](#)]

33. Veber, D.F.; Johnson, S.R.; Cheng, H.U.; Smith, B.R.; Ward, K.W.; Kopple, K.D. Molecular properties that influence the oral Bioavailability of Drug candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Egan, W.J.; Merz, K.M.; Baldwin, J.J. Prediction of Drug absorption using multivariate Statistics. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3867–3877. [[CrossRef](#)]
35. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard M07-A10; Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, PA, USA, 2015.
36. Dewar, M.J. AMI: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *7*, 3902–39091. [[CrossRef](#)]
37. Mouilleron, S.; Badet-Denisot, M.A.; Golinelli-Pimpaneau, B. Ordering of C-terminal loop and glutaminase domains of glucosamine-6-phosphate synthase promotes sugar ring opening and formation of the ammonia channel. *J. Mol. Biol.* **2008**, *377*, 1174–1185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Klontz, E.H.; Tomich, A.D.; Günther, S.; Lemkul, J.A.; Deredge, D.; Silverstein, Z.; Shaw, J.F.; McElheny, C.; Doi, Y.; Wintrobe, P.L.; et al. Structure and dynamics of FosA-mediated fosfomycin resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agent Chemother.* **2017**, *61*, e01572-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Nukaga, M.; Bethel, C.R.; Thomson, J.M.; Hujer, A.M.; Distler, A.; Anderson, V.E.; Knox, J.R.; Bonomo, R.A. Inhibition of class A  $\beta$ -lactamases by carbapenems: Crystallographic observation of two conformations of meropenem in SHV-1. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12656–12662. [[CrossRef](#)]
40. Han, S.; Zaniewski, R.P.; Marr, E.S.; Lacey, B.M.; Tomaras, A.P.; Evdokimov, A.; Miller, R.; Shanmugasundaram, V. Structural basis for effectiveness of siderophore-conjugated monocarbams against clinically relevant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 22002–22007. [[CrossRef](#)]
41. Tomich, A.D.; Klontz, E.H.; Deredge, D.; Barnard, J.P.; McElheny, C.L.; Eshbach, M.L.; Weisz, O.A.; Wintrobe, P.; Doi, Y.; Sundberg, E.J.; et al. Small-molecule inhibitor of FosA expands fosfomycin activity to multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01524-18. [[CrossRef](#)]
42. Holdgate, G.A.; Tunnicliffe, A.; Ward, W.H.J.; Weston, S.A.; Rosenbrock, G.; Barth, P.T.; Taylor, I.W.F.; Pauptit, R.A.; Timms, D. The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: A thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry* **1997**, *36*, 9663–9673. [[CrossRef](#)]
43. Bellon, S.; Parsons, J.D.; Wei, Y.; Hayakawa, K.; Swenson, L.L.; Charifson, P.S.; Lippke, J.A.; Aldape, R.; Gross, C.H. Crystal structures of *Escherichia coli* topoisomerase IV ParE subunit (24 and 43 kilodaltons): A single residue dictates differences in novobiocin potency against topoisomerase IV and DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1856–1864. [[CrossRef](#)]
44. Silva, D.; Diniz-Neto, H.; Cordeiro, L.; Silva-Neta, M.; Silva, S.; Andrade-Júnior, F.; Leite, M.; Nóbrega, J.; Morais, M.; Souza, J.; et al. (R)-(+)- $\beta$ -Citronellol and (S)-(–)- $\beta$ -Citronellol in Combination with Amphotericin B against *Candida* spp. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Flamm, R.K.; Farrell, D.J.; Rhomberg, P.R.; Scangarella-Oman, N.E.; Sader, H.S. Gepotidacin (GSK2140944) in vitro activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e00468-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Devi, K.P.; Nisha, S.A.; Sakthivel, R.; Pandian, S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *130*, 107–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Dacie, J.V.; Lewis, S.M. Investigation of haemostasis. In *Practical Haematology*, 9th ed.; Harcourt Publishers Limited: London, UK, 2001; pp. 444–451.
48. Kassie, F.; Darroudi, F.; Kundi, M.; Schulte-Hermann, R.; Knasmüller, S. Khat (*Catha edulis*) consumption causes genotoxic effects in humans. *Int. J. Cancer* **2001**, *92*, 329–332. [[CrossRef](#)]
49. Thomas, P.; Harvey, S.; Gruner, T.M.; Fenech, M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat. Res.* **2008**, *638*, 37–47. [[CrossRef](#)]

50. Gabriel, H.E.; Crott, J.W.; Ghandour, H.; Dallal, G.E.; Choi, S.W.; Keyes, M.K.; MAgGer, D. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *83*, 835–841. [[CrossRef](#)]

**Sample Availability:** Samples of the compounds N-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide and 2-chloro-N-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide are available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Supplementary Material

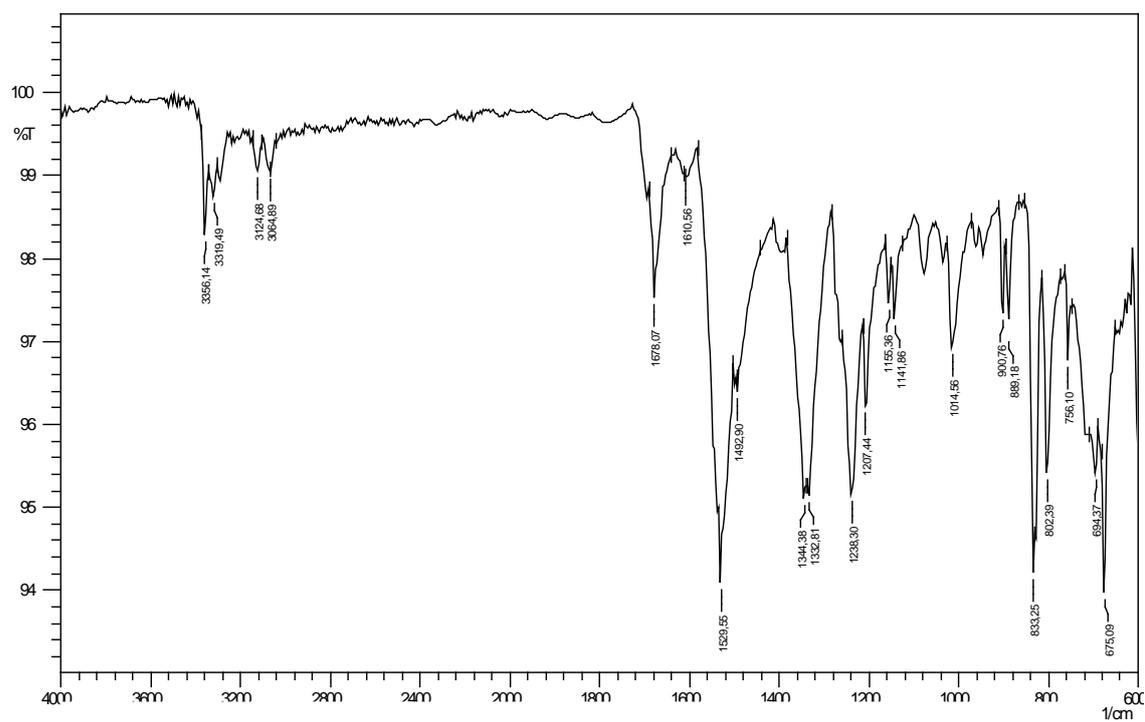
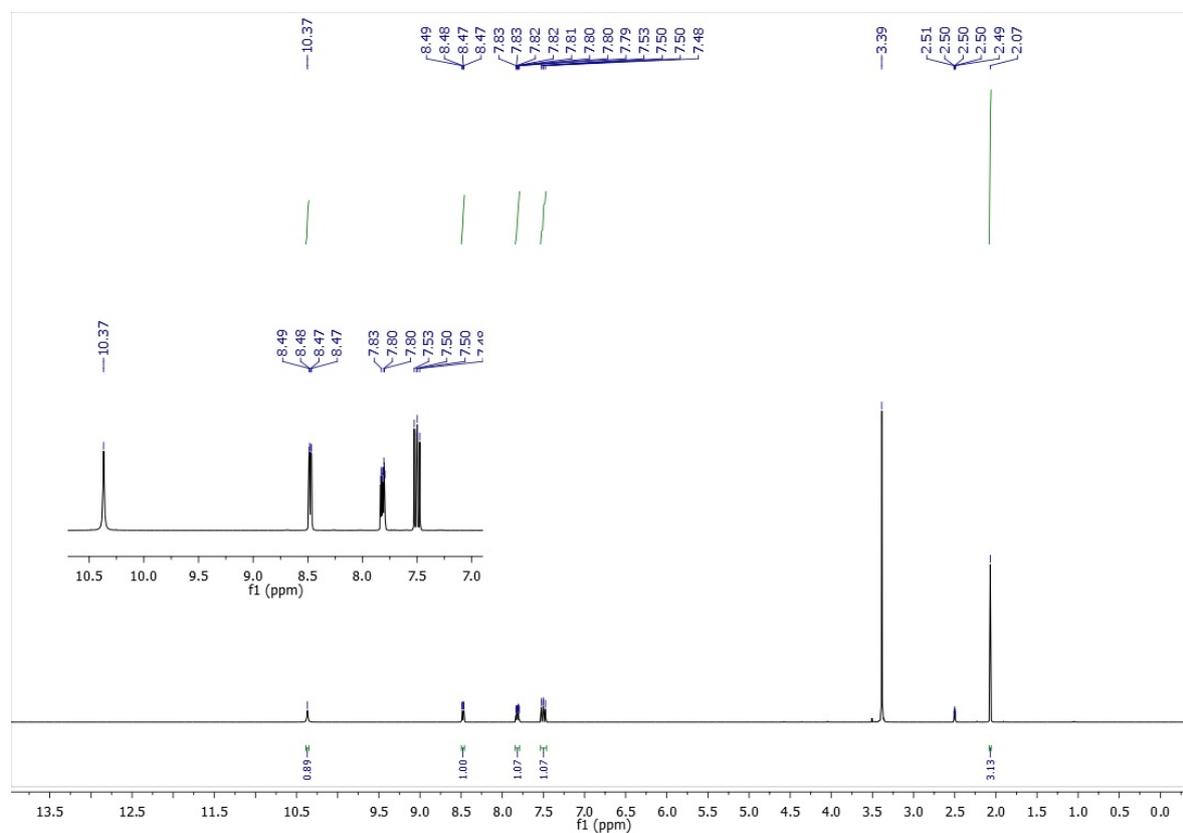
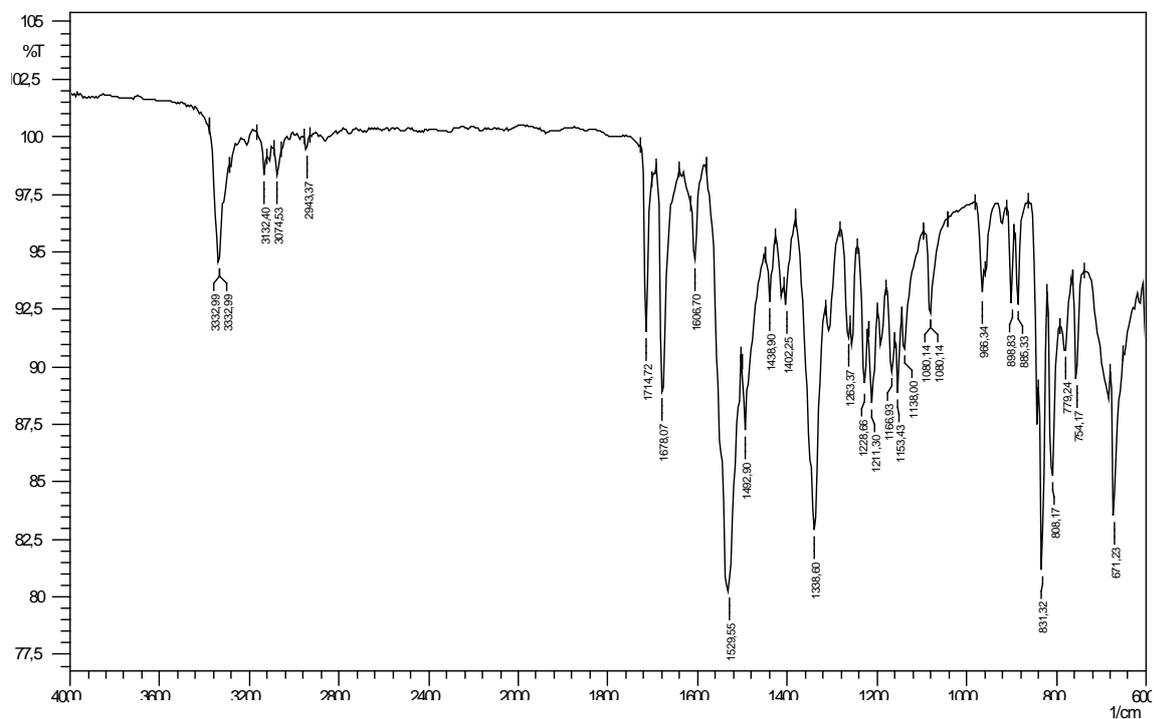
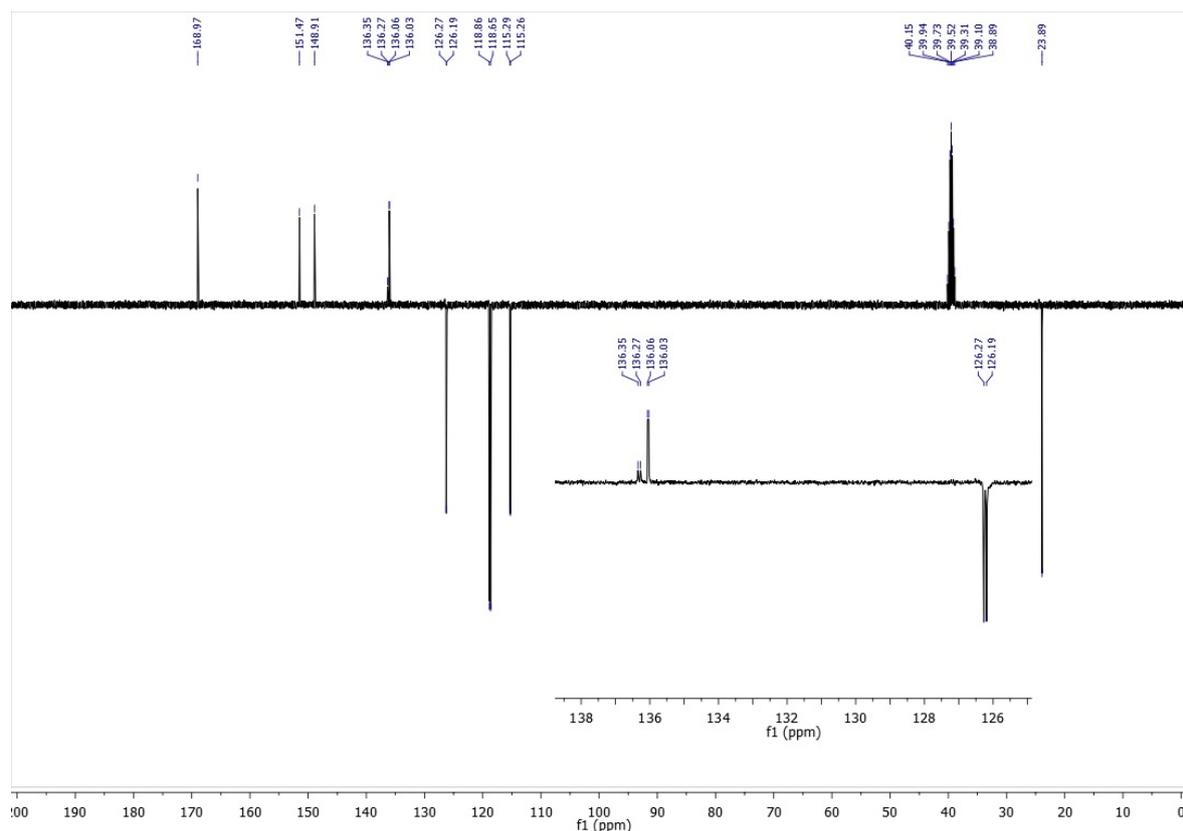
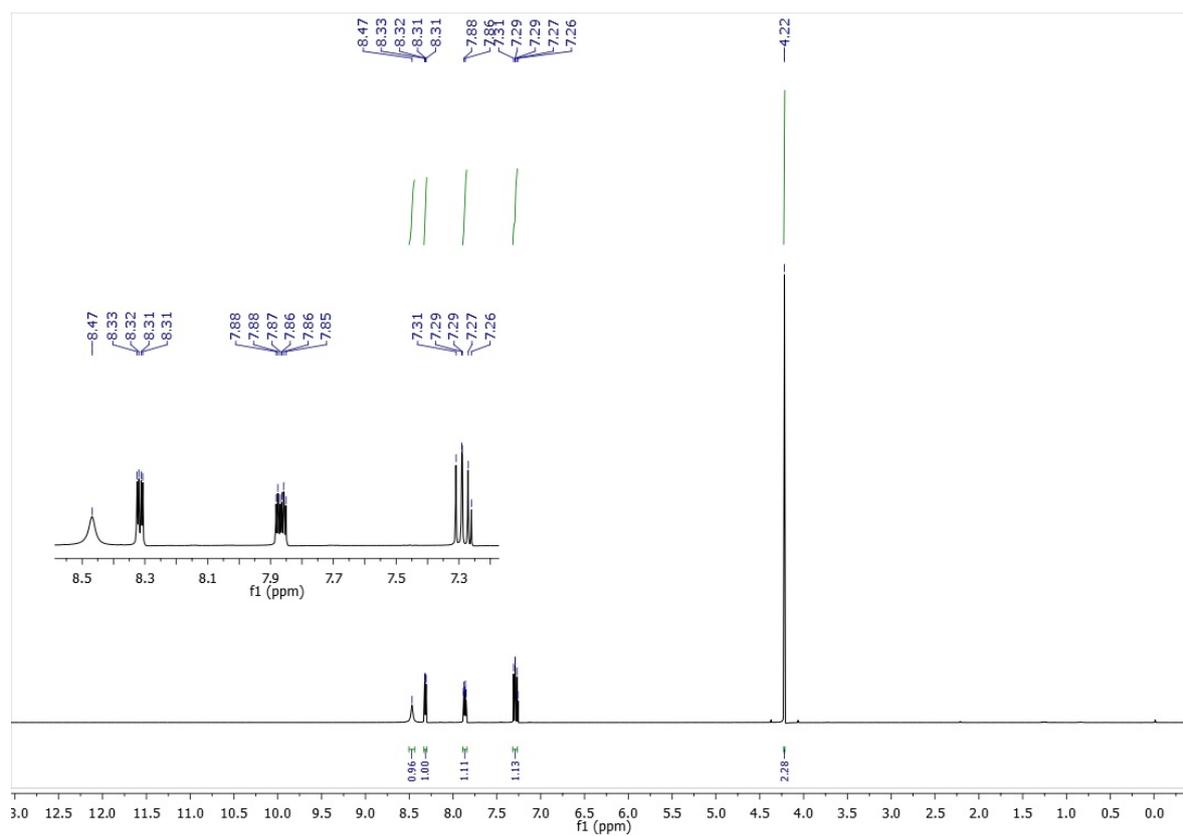
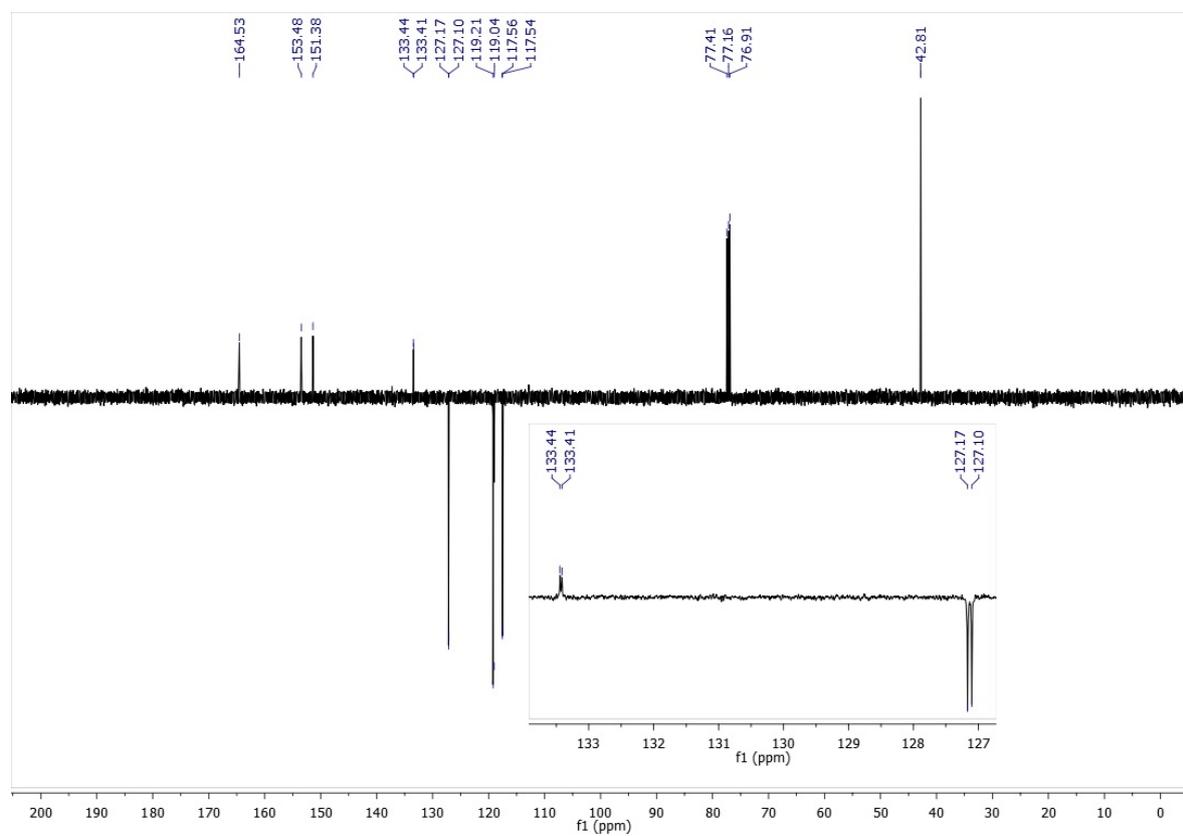


Figure S1. FTIR (ATR) spectrum of A1 substance.

Figure S2. <sup>1</sup>H NMR spectrum (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) of A1 substance.



Figure S5. <sup>1</sup>H NMR spectrum (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) of A2 substance.Figure S6. <sup>13</sup>C NMR spectrum (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) of A2 substance.

5.2 EFFECT OF 2-CHLORO-N-(4-FLUORO-3-NITROPHENYL)ACETAMIDE IN  
COMBINATION WITH ANTIBACTERIAL DRUGS AGAINST *Klebsiella pneumoniae*

Artigo submetido em 01 de fevereiro de 2021 para publicação na revista *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (ISSN 1678-2690). Qualis Farmácia (quadriênio 2013-2016): B3



**Effect of 2-chloro-N-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide in combination with antibacterial drugs against *Klebsiella pneumoniae***

Journal:	<i>Anais da Academia Brasileira de Ciências</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	CORDEIRO, LAÍSA; Universidade Federal da Paraíba Alves de Oliveira-Filho, Abrahão; UFPB Lima, Edeltrudes; Universidade Federal da Paraíba, Pharmaceutical Sciences Athayde-Filho, Petrônio; UFPB, Chemistry Oliveira, Rafael; Universidade Federal da Paraíba Figueiredo, Pedro; Universidade Federal da Paraíba Andrade Júnior, Francisco; Universidade Federal da Paraíba Sousa, Aleson; Universidade Federal da Paraíba, Health Sciences Center Souza, Helivaldo; Universidade Federal da Paraíba
Keyword:	Acetamide, Drug association, <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 2-chloro-N-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide
Classifications:	Health Sciences

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3 **Effect of 2-chloro-N-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide in combination with**  
4  
5 **antibacterial drugs against *Klebsiella pneumoniae***  
6  
7

8 Laísa Vilar Cordeiro <sup>1\*</sup>, Helivaldo Diógenes da Silva Souza <sup>2</sup>, Aleson Pereira Sousa <sup>3</sup>, Francisco Patricio  
9 de Andrade Júnior <sup>4</sup>, Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo <sup>5</sup>, Rafael Farias de Oliveira <sup>6</sup>, Petrônio  
10 Filgueiras de Athayde Filho <sup>7</sup>, Abrahão Alves Oliveira-Filho <sup>8</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima <sup>9</sup>  
11  
12  
13  
14

15  
16 <sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Jardim  
17 Universitário, Campus I, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: [laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com).

18  
19 ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8884-7331>.

20  
21 <sup>2</sup> Chemistry Department, Exact and Natural Sciences Center, Federal University of Paraíba, Jardim  
22 Universitário, Campus I, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: [helivaldog3@gmail.com](mailto:helivaldog3@gmail.com).

23  
24 ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1708-4066>.

25  
26 <sup>3</sup> Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Jardim  
27 Universitário, Campus I, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: [aleson\\_155@hotmail.com](mailto:aleson_155@hotmail.com).

28  
29 ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3430-477X>.

30  
31 <sup>4</sup> Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Jardim  
32 Universitário, Campus I, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail:

33  
34 [juniorfarmacia.ufcg@outlook.com](mailto:juniorfarmacia.ufcg@outlook.com). ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0681-8439>.

35  
36 <sup>5</sup> Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Jardim  
37 Universitário, Campus I, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: [pedrotrfigueiredo@gmail.com](mailto:pedrotrfigueiredo@gmail.com).

38  
39 ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6132-6248>.

40  
41 <sup>6</sup> Chemistry Department, Exact and Natural Sciences Center, Federal University of Paraíba, Jardim  
42 Universitário, Campus I, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: [rfarias.quimica@gmail.com](mailto:rfarias.quimica@gmail.com).

43  
44 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1654-9052>.

45  
46 <sup>7</sup> Chemistry Department, Exact and Natural Sciences Center, Federal University of Paraíba, Jardim  
47 Universitário, Campus I, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: [athayde-](mailto:athayde-filho@quimica.ufpb.br)

48  
49 [filho@quimica.ufpb.br](mailto:athayde-filho@quimica.ufpb.br). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0982-8261>.

50  
51 <sup>8</sup> Academic Unit of Biological Sciences, Center for Health and Rural Technology, Federal University of  
52 Campina Grande, Patos-PB Campus, 58708-110, Patos, Paraíba, Brazil. E-mail:

53  
54 [abraham.farm@gmail.com](mailto:abraham.farm@gmail.com). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7466-9933>.

55  
56 <sup>9</sup> Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Jardim  
57 Universitário, Campus I, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: [edelolima@yahoo.com.br](mailto:edelolima@yahoo.com.br).

58  
59 ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9547-0886>.  
60

1  
2  
3 **Keywords:** Acetamide; Drug association; *Klebsiella pneumoniae*; 2-chloro-*N*-(4-  
4 fluoro-3-nitrophenyl)acetamide  
5  
6  
7  
8

9 **Antibacterial drug association with acetamide**  
10

11  
12  
13 Health sciences  
14

15  
16 \* Corresponding author: Laísa Vilar Cordeiro. Department of Pharmaceutical Science,  
17 Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Jardim Universitário, Campus I,  
18 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. Tel: +55 83 3216-7347. E-mail:  
19 [laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com).  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**ABSTRACT**

*Klebsiella pneumoniae* is a species of Gram-negative bacteria related to a wide range of infections and high rates of drug resistance. The combined use of antibacterial agents is one of the strategies that has been analyzed in recent years as part of the alternatives in the treatment of drug-resistant infections. Recently, the antibacterial activity of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide has been demonstrated against *K. pneumoniae*, also indicating that this acetamide did not show significant cytotoxic potential in preliminary tests. Thus, it becomes an interesting substance for future studies that explore its antimicrobial capacity, including investigating its association with antibacterial drugs. Based on this, this research aimed to analyze the effects of the association of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide with ciprofloxacin, cefepime, ceftazidime, meropenem and imipenem against *K. pneumoniae* strains. The results showed additivity when the substance was combined with ciprofloxacin and cefepime, indifference when associated with ceftazidime and synergistic effect when combined with meropenem and imipenem. Thus, the acetamide was able to optimize the effects of antibacterial drugs, reducing the concentrations necessary to cause bacterial death. These data indicate a potential future clinical use of these combinations, and further studies are needed to analyze this viability.

## INTRODUCTION

*Klebsiella pneumoniae* is an opportunistic Gram-negative pathogen that causes several types of diseases, such as: pneumonia, endophthalmitis, liver abscess, urinary tract infections, cystitis, endocarditis, septicemia and infections associated with surgical procedures (Navon-Venezia et al. 2017; Effah et al. 2020). This species is part of the "ESKAPE" pathogens group, an acronym using the initials of the scientific names of the six species considered most virulent and pathogenic to humans: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp. (Pendleton et al. 2013).

It is estimated that *K. pneumoniae* causes about one third of all infections caused by Gram-negative bacteria. In addition, this is a bacterial species considered an important source of resistance to most of the last-line antibiotics that are usually used, presenting a great capacity to acquire plasmids with genes that give them resistance to multiple antibacterials (Navon-Venezia et al. 2017; Effah et al. 2020).

This microorganism has the ability to quickly react to selective environmental pressure modifications. One of the main mechanisms of drug-resistant *K. pneumoniae* is through enzymes that inactivate antibacterial agents and prevent their action. The dissemination of these resistant determinants have been recognized as a major challenge in the treatment of bacterial infections worldwide. Drug-resistant infections are a public health problem, but also an economic issue, resulting in high financial costs for health systems (Dadgostar 2019; Oliveira et al. 2020).

The combination of issues related to increasingly restricted pharmacological options for the treatment of drug-resistant bacterial infections and the high rates of infections caused by *K. pneumoniae* makes it necessary to research and develop new antibacterial

1  
2  
3 agents, which is one of the main countermeasures listed in the WHO global action plan  
4  
5 (WHO 2017) to combat microbial resistance.  
6  
7

8 Combating antimicrobial resistance requires multiple therapeutic strategies,  
9  
10 including the discovery of new molecular supports, improvements in antimicrobial  
11  
12 administration and drug design strategies based on synthetic chemistry (Belousoff et al.  
13  
14 2019; Murtaza et al. 2019). Obtaining synthetic drugs from acetamides is a promising  
15  
16 strategy, because this group is easily synthesized and its derivatives show a wide range  
17  
18 of biological properties, especially antibacterial ( Katke et al. 2011; Patel et al. 2012; Patel  
19  
20 et al. 2013; Murtaza et al. 2019). Several studies present synthetic derivatives as potential  
21  
22 agents against bacteria (Fuloria et al. 2009; Katke et al. 2011; Pradidphol et al. 2012;  
23  
24 Kaplancikli et al. 2012; Murtaza et al. 2019; Cordeiro et al. 2020).  
25  
26  
27

28 The combined use of antibacterial agents is one of the strategies that has been  
29  
30 analyzed in recent years as part of the alternatives in the treatment of drug-resistant  
31  
32 infections. In clinical practice, the treatment of infections caused by Gram-negative  
33  
34 bacteria includes the combination of antibiotics, which usually consist of a beta-lactam  
35  
36 and an aminoglycoside or fluoroquinolone (Tamma et al. 2012). In addition, the potential  
37  
38 of synergistic interactions of phytochemicals with antibacterial agents against resistant  
39  
40 bacteria has been demonstrated (Ayaz et al. 2019).  
41  
42  
43

44 Recently, Cordeiro et al. (2020) showed the first report of the antibacterial activity  
45  
46 of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide on *K. pneumoniae*, also indicating that  
47  
48 this acetamide did not present significant cytotoxic potential in preliminary tests. Thus, it  
49  
50 becomes an interesting substance for future studies that explore its antimicrobial capacity,  
51  
52 including investigating its association with antibacterial drugs. Based on this, this  
53  
54 research aimed to investigate the effects of the association of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 nitrophenyl)acetamide with ciprofloxacin, cefepime, ceftazidime, meropenem and  
4  
5 imipenem against *K. pneumoniae* strains.  
6  
7  
8  
9

## 10 11 **MATERIALS AND METHODS** 12

### 13 14 **Substances** 15

16  
17 The substance 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide was obtained and  
18 characterized according to processes described by Peixoto et al. (2016) and Cordeiro et  
19 al. (2020). Briefly, the 4-Fluoro-3-nitroaniline (3.12 g, 20 mmol) is added, in small  
20 portions, in a 50 mL flask containing acetic anhydride (11 mL, 116 mmol) under constant  
21 stirring at room temperature. The reaction mixture is stirred for 12 hours. At the end of  
22 the reaction, ice water is added and the reaction mixture was stirred for 30 minutes. The  
23 precipitate formed was filtered, washed with water and dried. The product was  
24 recrystallized from an ethanol / water mixture (8: 2). The yield of this reaction is 85% and  
25 a brown solid is obtained.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

37  
38 The antibacterial drugs ciprofloxacin, cefepime, ceftazidime, meropenem and  
39 imipenem used were obtained commercially from the Merck /Sigma-Aldrich® laboratory.  
40  
41

42 Both 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide and conventional antibacterials  
43 were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 5% and Tween-80 at 2%, to obtain  
44 emulsions in the concentrations necessary for use in the tests.  
45  
46  
47  
48  
49  
50

### 51 52 **Strains** 53

54 The effect of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide in association with  
55 conventional antibacterials was evaluated on *K. pneumoniae* strains.  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 The clinical isolates strains of *K. pneumoniae* used in this study belong to the  
4 MICOTECA of the Antibacterial and Antifungal Activity Research Laboratory of the  
5 Federal University of Paraíba, Brazil, which are: KP-26, KP-56, KP-83, KP- 176 and KP-  
6 260. In addition, the American Type Culture Collection strain ATCC-700603 was used  
7 as a control.  
8  
9

10  
11  
12 For use in the assays, bacterial suspensions were prepared in 0.9% saline solution,  
13 from fresh cultures, and adjusted to the McFarland standard 0.5 scale.  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

### 21 **Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal** 22 **Concentration (MBC) determination** 23 24 25

26  
27 To perform the antibacterial drug association test, it is first necessary to determine  
28 the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of the isolated drugs against *K.*  
29 *pneumoniae*. Thus, the necessary information is obtained to later calculate the Fractional  
30 Inhibitory Concentration Index (FICI), when the drugs are combined, classifying the  
31 effect of the association.  
32  
33  
34  
35  
36  
37

38 To determine the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) the analysis was  
39 carried out using the broth microdilution technique in a 96-well plate to obtain different  
40 concentrations of the substances (CLSI, 2015). At the same time, sterility, cell viability  
41 and interference controls of vehicles used in the preparation of emulsions of substances  
42 (DMSO and Tween-80) were also performed. MIC is defined as the lowest concentration  
43 capable of causing complete inhibition of bacterial growth after 24 hours at  $35 \pm 2$  °C.  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

51 The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) provides additional data on the  
52 classification of the action of a given isolated substance against the strains analyzed,  
53 determining whether the effect is bactericidal or bacteriostatic.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Thus, after the MIC reading, the MBC determination test was performed. For this,  
4 aliquots were removed from the wells where there was no visible growth (suprainhibitory  
5 concentrations) and inoculating in new plates containing only culture broth (CLSI, 1999;  
6 Silva et al. 2020). All controls were performed. MBC is defined as the lowest  
7 concentration capable of causing complete inhibition of bacterial growth after 24 hours  
8 at  $35 \pm 2$  °C. Both tests were performed in triplicate.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

### 20 **Drug association test**

21  
22 To check the effect of the association of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-  
23 nitrophenyl)acetamide with the antibacterial drugs: ciprofloxacin, cefepime, ceftazidime,  
24 meropenem and imipenem against *K. pneumoniae* strains, the checkerboard association  
25 method was performed. Through this method, different concentrations of 2-chloro-*N*-(4-  
26 fluoro-3-nitrophenyl)acetamide (8xMIC, 4xMIC, 2xMIC, MIC, 1/2 MIC, 1/4 MIC and  
27 1/8 MIC) were combined with different concentrations of antibacterial drugs (8xMIC,  
28 4xMIC, 2xMIC, MIC, 1/2 MIC, 1/4 MIC and 1/8 MIC).  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38

39 To perform this test, culture broth was added to the wells of sterile microplates  
40 containing 96 wells, with a U-shaped bottom. Then, different concentrations (8x MIC, 4x  
41 MIC, 2x MIC, MIC, 1/2 MIC, 1/4 MIC and 1/8 MIC) of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-  
42 nitrophenyl)acetamide and the antibacterial drug were added to the microplate  
43 horizontally and vertically, respectively ((Wu et al. 2017; Silva et al. 2020).  
44  
45  
46  
47  
48  
49

50 In this way, an entire microplate has different concentrations of combining acetamide  
51 with just one conventional antibacterial. This process was performed for the association  
52 with ciprofloxacin, cefepime, ceftazidime, meropenem and imipenem, always analyzing  
53 in triplicate. Finally, bacterial inoculums ( $1 \times 10^7$  CFU / mL) were added to each well.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 The plates were incubated at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  for 24-48 hours and then bacterial growth was  
4  
5 observed.  
6

7  
8 The effects produced between the combination of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-  
9 nitrophenyl)acetamide and conventional antibiotics was determined by the Fractional  
10 Inhibitory Concentration Index (FICI). From this index, is possible to define the type of  
11 interaction: synergistic, additive, indifferent or antagonistic.  
12  
13  
14  
15

16  
17 The FICI was calculated by the sum of fractional inhibitory concentrations (FIC),  
18 where  $\text{FIC}_A = (\text{MIC of 2-chloro-}N\text{-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide in combination})/$   
19  $(\text{MIC of 2-chloro-}N\text{-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide alone})$  and  $\text{FIC}_B = (\text{MIC of}$   
20  $\text{conventional antibiotic in combination})/ (\text{MIC of conventional antibiotic alone})$ , thus  
21  $\text{FICI} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B$ . The association was defined as synergistic for  $\text{FICI} \leq 0.5$ , as additive  
22 for  $0.5 < \text{FICI} < 1$ , as indifferent for  $1 \leq \text{FICI} < 4$ , and as antagonistic for  $\text{FICI} \geq 4$  (Wu et  
23 al. 2017; Silva et al. 2020).  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

## 37 RESULTS AND DISCUSSION

38  
39 The Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) results of each substance isolated  
40 against the *K. pneumoniae* strains used in this study are shown in Table I.  
41  
42  
43  
44

45 [TABLE I]

46  
47  
48 The 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide (CFA) showed a MIC of 512  
49  $\mu\text{g/mL}$  against all strains analyzed in this study, which is a concentration several times  
50 higher than the MICs found for conventional antibacterials (Table I).  
51  
52  
53  
54

55  
56 *K. pneumoniae* strains were inhibited in the presence of 1  $\mu\text{g/mL}$  ciprofloxacin (CIP)  
57 concentration, except for the KP-56 strain, for which the MIC was 8  $\mu\text{g/mL}$ . The cefepime  
58  
59  
60

1  
2  
3 (CEF) showed MIC of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  against four of the six strains analyzed and MIC 16  
4  
5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  against KP-56. The action of ceftazidime (CAZ) on *K. pneumoniae* resulted in  
6  
7 MIC of 1 to 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for most strains tested, despite having demonstrated MIC of 32  
8  
9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  on ATCC-700603 and KP-56. The carbapenems meropenem (MER) and  
10  
11 imipenem (IMI) showed similar MIC results on the strains analyzed, with values ranging  
12  
13 between 0.25 and 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Table I).  
14  
15  
16  
17

18 The high MIC values of ceftazidime (CAZ) over the standard strain ATCC-700603  
19  
20 occur because it is a strain characterized as producing ESBL (Extended-spectrum  $\beta$ -  
21  
22 lactamases). These enzymes are capable of hydrolyzing oxy- $\beta$ -lactams such as  
23  
24 ceftazidime, which promotes their resistance to antibiotics. This strain is recommended  
25  
26 as a standard to be used in tests for antimicrobial activity, especially for those using *K.*  
27  
28 *pneumoniae*. The MIC values of the antibacterials analyzed in this study on ATCC-  
29  
30 700603 are in accordance with those established by CLSI (2018). As all MIC  
31  
32 determinations were made under the same conditions for standard strains and isolated  
33  
34 clinical strains, this indicates the reliability of the other results.  
35  
36  
37  
38  
39

40 Among the clinical isolates used in this study, the KP-56 strain shows resistance to  
41  
42 cephalosporin and ceftazidime, according to the intervals defined by CLSI (2018). This  
43  
44 strain probably expresses one or more types of beta-lactamases such as ESBLs or AmpC,  
45  
46 which hydrolyze such antibacterials and make them resistant to their action (Ruppé et al.  
47  
48 2015), although further studies are needed to investigate what mechanisms are involved.  
49  
50 Betalactamases are the main mechanism of resistance to  $\beta$ -lactams in *Enterobacteriaceae*  
51  
52 and *K. pneumoniae* is known to be one of the most important sources of resistance to  
53  
54 antibiotics, with high transmissibility and ease of resistance acquisition, this species has  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 shown increased rates of resistance to broad-spectrum cephalosporins worldwide (Ruppé  
4  
5 et al. 2015; Navon-Venezia et al. 2017).  
6  
7

8  
9 In addition, it is possible to observe that KP-56 was also resistant to ciprofloxacin  
10  
11 (CLSI, 2018), and several mechanisms may be involved in this type of resistance, such  
12  
13 as changes in the structure of target enzymes, expression of efflux pumps and reduced  
14  
15 permeability of the cell by decreasing the amount of porins expressed in the bacterial  
16  
17 membrane (Hooper & Jacoby 2015).  
18  
19

20  
21 Thus, the KP-56 strain, although it is a strain of community origin, is resistant to  
22  
23 more than one class of antibacterial. Community infections due to multidrug-resistant  
24  
25 *Enterobacteriaceae* are a global reality and their spread has been considered a reason for  
26  
27 alert in several countries (Vasoo et al. 2015; Duin & Paterson 2016).  
28  
29

30  
31 The Minimum Bactericidal Concentrations of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-  
32  
33 nitrophenyl)acetamide and the antibacterials used in this study are expressed in Table II.  
34  
35

36  
37 [TABLE II]  
38  
39

40  
41 The 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide showed the same MBC values for  
42  
43 all strains tested, which coincide with the respective MICs. To classify a substance as a  
44  
45 bactericidal agent, the ratio between MBC and MIC must be less than or equal to 4 (CLSI,  
46  
47 1999; Pankey & Sabath 2004). Thus, the results indicate that this acetamide is bactericidal  
48  
49 from the MIC. This same classification was found for ciprofloxacin, meropenem and  
50  
51 imipenem, which have the ratio between MBC and MIC being less than or equal to 4. On  
52  
53 the other hand, the antibacterials ceftazidime and cefepime showed bacteriostatic  
54  
55 activities on all the strains analyzed, demonstrating an MBC/ MIC ratio greater than 4.  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Based on the previous results, it is evident that both 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide and conventional antibacterials showed some level of activity against *K. pneumoniae* when used alone. Starting from this information, the effect of the association of acetamide with each antibacterial drug was investigated, and the results are shown in Table III.

[TABLE III]

The effect of drug association takes into account the Minimum Inhibitory Concentrations obtained from the isolated substances and the MICs obtained when these substances are put together to act against the tested strains. The combination effect is classified as synergistic for  $FICI \leq 0.5$ , as additive for  $0.5 < FICI < 1$ , as indifferent for  $1 \leq FICI < 4$ , and as antagonistic for  $FICI \geq 4$  (Wu et al. 2017; Silva et al. 2020).

The combination of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide with ciprofloxacin resulted in additivity against all strains, except KP-56, for which there was indifference in the combination of substances. The combination of acetamide and cefepime also resulted in an additive effect on all strains analyzed in this study. The ceftazidime drug did not demonstrate any interaction to potentiate the antibacterial effect when combined with 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide, as the effect on all strains was indifferent. In contrast, the best combinations analyzed in this study were found in the association of acetamide with the carbapenems meropenem and imipenem, with synergism of action for 100% of the strains tested.

Thus, with the exception of ceftazidime, the association of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide with the antibacterial drugs conventionally used to treat infections caused by *K. pneumoniae* suggests a potentiation of the antibacterial effect, through additivity and synergism.

1  
2  
3 Additivity is defined when the result of the association is similar to the sum of the  
4 effects of the substances individually, although lower concentrations of both molecules  
5 are necessary to obtain an antimicrobial effect. Synergism, on the other hand, occurs when  
6 the association results in a greater effect than that observed for individual substances  
7 (EUCAST, 2000).  
8  
9

10  
11  
12 As explained by Díaz-Reval et al. (2008), synergism can occur because each  
13 substance is contributing to cell death through different mechanisms of action. There is  
14 also the possibility that the combination of antibacterials activates different mechanisms  
15 from those produced by the administration of substances individually, that is, a new  
16 mechanism would be generated and this would have a better effect.  
17  
18  
19

20  
21  
22 The combination of therapies has proven to be a highly effective alternative for the  
23 treatment of infections by resistant bacteria (Palaniappan & Holley, 2010; Toledo et al.  
24 2015; Ayaz et al., 2019). Evidence suggests that the combination of therapeutic regimes  
25 may even reduce the emergence of resistant microorganisms (Drusano et al. 2010; Ayaz  
26 et al., 2019).  
27  
28

29  
30  
31 Another interesting advantage of the drug association is the possibility of using lower  
32 concentrations of each substance individually and, in spite of that, obtaining greater  
33 effects than using the substances alone (Ayaz et al. 2019; Sun et al. 2019). Due to this, it  
34 would be possible, consequently, to also reduce the side effects resulting from the  
35 administration of these medications. The results indicate that 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-  
36 nitrophenyl)acetamide in combination with conventional antibacterials increased the  
37 antimicrobial effect, in an additive or synergistic way, which suggests the possibility of  
38 reducing the viability of the strains using a lower concentration of these substances.  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

54  
55  
56 It is difficult and expensive to screen for or develop new drugs, so it is important to  
57 find new methods to reduce the development of antibiotic resistance by pathogenic  
58  
59  
60

1  
2  
3 organisms, especially by *K. pneumoniae*, which is associated with high levels of  
4  
5 resistance and wide epidemiological distribution (Cottarel & Wierzbowski 2007)  
6  
7

8 An emerging option to combat such pathogens is the combination therapy. The  
9  
10 strategy of combining substances against bacteria has been extensively studied in recent  
11  
12 years and shows promising results, mainly in the association of products of natural origin  
13  
14 with conventional antibiotics or with another natural substance (Palaniappan & Holley,  
15  
16 2010; Ayaz et al. 2019).  
17  
18

19 The 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide is a synthetic substance, about  
20  
21 which there are still no reports in the literature of its association with other drugs.  
22  
23 Although a weak antibacterial activity has been observed when used alone, this molecule  
24  
25 has potential to be used in combination with other antibacterials such as ciprofloxacin,  
26  
27 cefepime, meropenem and imipenem.  
28  
29

30  
31 As demonstrated by Cordeiro et al. (2020), this acetamide presents favorable  
32  
33 cytotoxicity and mutagenicity results for future *in vivo* studies to be carried out. In  
34  
35 addition, *in silico* analysis suggest a pharmacokinetic profile with good parameters for  
36  
37 oral use. The 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide can also serve as a basis for  
38  
39 future structural changes that aim to improve its biological activity. Such factors make it  
40  
41 interesting that more studies will be performed, in order to investigate the feasibility of  
42  
43 the association of this substance with conventional antibacterials in clinical practice.  
44  
45  
46  
47  
48

#### 49 **Acknowledgments**

50  
51  
52 The authors wish to thank for the support provided by the Federal University of Paraíba  
53  
54 (UFPB) and the Brazilian funding agencies: CAPES, CNPq.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Author Contributions

LVC, HDSS, APS, FPAJ, PTRF, RFO and EOL idealized the study, performed the experiments and analyzed the results. LVC, HDSS, PFAF, AAOF and EOL wrote and revised the manuscript. PFAF, AAOF and EOL were responsible for acquiring resources, supervising the study and reviewing the work.

### References

- Ayaz M, Ullah F, Sadiq A, Ullah F, Ovais M, Ahmed J, Devkota H. 2019. Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. *Chem.-Biol. Interact* 308: 294-303.
- Belousoff MJ, Venugopal H, Wright A, Seoner S, Stuart I, Stubenrauch C, Bamert RS, Lupton DW & Lithgow T. 2019. CryoEM-guided development of antibiotics for drug-resistant bacteria. *Chem Med Chem* 14: 527-531.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved guideline M26-A.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M07-A10.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100.
- Cordeiro L, Diniz-Neto H, Figueiredo P, Souza H, Sousa A, Andrade-Júnior F, Melo T, Ferreira E, Oliveira R, Athayde-Filho P, Barbosa-Filho J, Oliveira-Filho A & Lima E.

1  
2  
3  
4 2020. Potential of 2-Chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide Against *Klebsiella*  
5  
6  
7 *pneumonia* and In Vitro Toxicity Analysis. *Molecules* 25: 3959.

8  
9  
10 Cottarel G & Wierzbowski J. 2007. Combination drugs, an emerging option for  
11  
12 antibacterial therapy. *Trends Biotechnol* 25: 547-555.

13  
14  
15 Dadgostar P. 2019. Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infect Drug Resist*  
16  
17 12: 3903.

18  
19  
20 Díaz-Reval MI, Galván-Orozco R, López-Muñoz FJ & Carrillo-Munguía N. 2008.  
21  
22 Sinergismo de la cafeína sobre los efectos antinociceptivos del metamizol. *Cirugia y*  
23  
24 *Cirujanos* 76: 241-246.

25  
26  
27 Drusano GL, Sgambati N & Eichas A. 2010. The combination of rifampin plus  
28  
29 moxifloxacin is synergistic for suppression of resistance but antagonistic for cell kill of  
30  
31 *Mycobacterium tuberculosis* as determined in a hollow-fiber infection model. *MBio* 1:  
32  
33 1–8.

34  
35  
36  
37  
38  
39 Duin D & Paterson D. 2016. Multidrug Resistant Bacteria in the Community: Trends and  
40  
41 Lessons Learned. *Infect Dis Clin North America* 30: 377-390.

42  
43  
44  
45 Effah CY, Sun T, Liu S & Wu Y. 2020. *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to  
46  
47 public health. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 19: 1-9.

48  
49  
50 European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the  
51  
52 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). 2000.  
53  
54 Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to  
55  
56 antimicrobial agents. *Clinical microbiology and infection*. 6: 503-508.  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 Fuloria NK, Singh V, Yar MS & Ali M. 2009. Synthesis, characterization and  
5  
6 antimicrobial evaluation of novel imines and thiazolidinones. *Acta Pol Pharm* 66: 141-  
7  
8  
9 146.

10  
11  
12 Hooper DC & Jacoby GA. 2015. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance.  
13  
14  
15 *Ann N Y Acad Sci.* 1354: 12-31.

16  
17  
18 Kaplancikli ZA, Yurttas L, Turan-Zitouni G, Özdemir A, Özic R & Ulusoylar-Yildirim  
19  
20 Ş. 2012. Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity of some new carbazole  
21  
22 derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem* 27: 868-874.

23  
24  
25  
26 Katke SA, Amrutkar SV, Bhor RJ & Khairnar MV. 2011. Synthesis of biologically active  
27  
28  
29 2-chloro-N-alkyl/aryl acetamide derivatives. *Int J Pharm Sci Res* 2:148-156.

30  
31  
32 Murtaza S, Altaf AA, Hamayun M, Iftikhar K, Tahir MN, Tariq J & Faiz K. 2019.  
33  
34  
35 Synthesis, antibacterial activity and docking studies of chloroacetamide derivatives. *Eur*  
36  
37  
38 *J Chem* 10: 358-366.

39  
40  
41 Navon-Venezia S, Kondratyeva K & Carattoli A. 2017. *Klebsiella pneumoniae*: A major  
42  
43  
44 worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 41: 252-  
45  
46  
47 275.

48  
49  
50 Oliveira DMP et al. 2020. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin*  
51  
52  
53 *Microbiol Rev* 33: e00181-19.

54  
55  
56 Pankey GA & Sabath LD. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal  
57  
58  
59 mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect*  
60  
61  
62 *Dis* 38: 864-870.

1  
2  
3  
4 Palaniappan K, Holley RA. 2010. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic  
5  
6 susceptibility of drug resistant bacteria. *Int J Food Microbiol* 140: 164-168.  
7

8  
9 Patel RV, Patel PK, Kumari P, Rajani DP & Chikhaliya KH. 2012. Synthesis of  
10  
11 benzimidazolyl-1,3,4-oxadiazol-2ylthio-N-phenyl (benzothiazolyl) acetamides as  
12  
13 antibacterial, antifungal and antituberculosis agents. *Eur J Med Chem* 53: 41-51.  
14  
15

16  
17 Patel RV, Kumari P, Rajani DP & Chikhaliya KH. 2013. Synthesis of coumarin-based 1,  
18  
19 3, 4-oxadiazol-2ylthio-N-phenyl/benzothiazolyl acetamides as antimicrobial and  
20  
21 antituberculosis agents. *Med Chem Res* 22: 195-210.  
22  
23

24  
25 Peixoto IN, Souza HDS, Lira BF, Silva DF, Lima EO, Barbosa-Filho JM & Athayde-  
26  
27 Filho PF. 2016. Synthesis and Antifungal Activity against *Candida* Strains of Mesoionic  
28  
29 System Derived from 1,3-Thiazolium-5-thiolate. *J Braz Chem Soc* 27: 1807–1813.  
30  
31

32  
33 Pendleton JN, Gorman SP & Gilmore BF. 2013. Clinical relevance of the ESKAPE  
34  
35 pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11: 297-308.  
36  
37

38  
39 Pradidphol N, Kongkathip N, Sittikul P, Boonyalai N & Kongkathip B. 2012. First  
40  
41 synthesis and anticancer activity of novel naphthoquinone amides. *Eur J Med Chem* 49:  
42  
43 253-270.  
44  
45

46  
47 Ruppé E, Woerther P & Barbier F. 2015. Mechanisms of antimicrobial resistance in  
48  
49 Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care*. 5: 21.  
50  
51

52  
53 Silva D et al. 2020. (R)-(+)- $\beta$ -Citronellol and (S)-(-)- $\beta$ -Citronellol in Combination with  
54  
55 Amphotericin B against *Candida* spp. *Int J Mol Sci* 21: 1785.  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 Sun W, Sanderson PE & Zheng W. 2016. Drug combination therapy increases successful  
5  
6 drug repositioning. *Drug Discov. Today* 21: 1189-1195.

7  
8  
9 Tamma PD, Cosgrove SE & Maragakis LL. 2012. Combination therapy for treatment of  
10  
11 infections with gram-negative bacteria. *Clin Microbial Rev* 25: 450-470.

12  
13  
14 Toledo PV, Aranha AA, Arend LN, Ribeiro V, Zavascki AP & Tuon FF. 2015. Activity  
15  
16 of antimicrobial combinations against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a  
17  
18 ratmodel and time-kill assay. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 4301–4304.

19  
20  
21  
22  
23 Vasoo S, Barreto JN & Tosh P.K. 2015. Emerging issues in gram-negative bacterial  
24  
25 resistance: an update for the practicing clinician. *Mayo Clin Proc* 90: 395-403.

26  
27  
28 World Health Organization (WHO). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria  
29  
30 to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Available online:  
31  
32 [http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-](http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/)  
33  
34 [bacteria/en/](http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/). (accessed on 4 June 2020).

35  
36  
37  
38  
39 Wu X, Li Z, Li X, Tian Y, Fan Y, Yu C, Zhou B, Liu Y., Xiang R & Yang L. 2017.  
40  
41 Synergistic effects of antimicrobial peptide DP7 combined with antibiotics against  
42  
43 multidrug-resistant bacteria. *Drug Des Dev Ther* 11: 939-946.  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Tables legends

**Table I.** Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide (CFA), ciprofloxacin (CIP), cefepime (CEF), ceftazidime (CAZ), meropenem (MER) and imipenem (IMI) on *Klebsiella pneumoniae* strains.

**Table II.** Minimum Bactericidal Concentrations (MBCs) of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide (CFA), ciprofloxacin (CIP), cefepime (CEF), ceftazidime (CAZ), meropenem (MER) and imipenem (IMI) on *Klebsiella pneumoniae* strains.

**Table III.** Effects of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide association with different antibacterial drugs: ciprofloxacin, cefepime, ceftazidime, meropenem and imipenem against *K. pneumoniae* strains. Synergism:  $FICI \leq 0.5$ , additivity:  $0.5 < FICI < 1$ , indifference:  $1 \leq FICI < 4$  and antagonism:  $FICI \geq 4$ .

**Table I.** Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide (CFA), ciprofloxacin (CIP), cefepime (CEF), ceftazidime (CAZ), meropenem (MER) and imipenem (IMI) on *Klebsiella pneumoniae* strains.

Strains	MIC (µg/mL)					
	CFA	CIP	CEF	CAZ	MER	IMI
ATCC-700603	512	1	1	32	0,5	0,25
KP-26	512	1	0,5	1	0,5	0,25
KP-56	512	8	16	32	1,0	0,5
KP-83	512	1	1	1	0,5	0,25
KP-176	512	1	1	1	0,5	0,25
KP-260	512	1	1	2	1,0	0,5

**Table II.** Minimum Bactericidal Concentrations (MBCs) of 2-chloro-*N*-(4-fluro-3-nitrophenyl)acetamide (CFA), ciprofloxacin (CIP), cefepime (CEF), ceftazidime (CAZ), meropenem (MER) and imipenem (IMI) on *Klebsiella pneumoniae* strains.

Strains	MBC (µg/mL)					
	CFA	CIP	CEF	CAZ	MER	IMI
ATCC-700603	512	2	>8	256	2	1
KP-26	512	2	>4	8	2	1
KP-56	512	16	16	256	4	2
KP-83	512	2	>8	8	2	1
KP-176	512	2	>8	8	2	1
KP-260	512	2	>8	16	4	2

**Table III.** Effects of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide association with different antibacterial drugs: ciprofloxacin, cefepime, ceftazidime, meropenem and imipenem against *K. pneumoniae* strains. Synergism: FICI  $\leq$  0.5, additivity:  $0.5 < \text{FICI} < 1$ , indifference:  $1 \leq \text{FICI} < 4$  and antagonism: FICI  $\geq 4$ .

Strains and drugs	FICI	Effect
<b>ATCC-700603</b>		
Ciprofloxacin	0.75	Additivity
Cefepime	0.56	Additivity
Ceftazidime	2.06	Indifference
Meropenem	0.50	Synergism
Imipenem	0.50	Synergism
<b>KP-26</b>		
Ciprofloxacin	0.75	Additivity
Cefepime	0.56	Additivity
Ceftazidime	1.06	Indifference
Meropenem	0.50	Synergism
Imipenem	0.50	Synergism
<b>KP-56</b>		
Ciprofloxacin	1.00	Indifference
Cefepime	0.75	Additivity
Ceftazidime	2.06	Indifference

1				
2				
3		Meropenem	0.50	Synergism
4				
5		Imipenem	0.50	Synergism
6				
7				
8				
9				
10	<b>KP-83</b>			
11				
12		Ciprofloxacin	0.75	Additivity
13				
14		Cefepime	0.56	Additivity
15				
16		Ceftazidime	1.06	Indifference
17				
18		Meropenem	0.50	Synergism
19				
20		Imipenem	0.50	Synergism
21				
22				
23				
24				
25				
26	<b>KP-176</b>			
27				
28		Ciprofloxacin	0.75	Additivity
29				
30		Cefepime	0.56	Additivity
31				
32		Ceftazidime	1.06	Indifference
33				
34		Meropenem	0.50	Synergism
35				
36		Imipenem	0.50	Synergism
37				
38				
39				
40				
41				
42	<b>KP-260</b>			
43				
44		Ciprofloxacin	0.75	Additivity
45				
46		Cefepime	0.56	Additivity
47				
48		Ceftazidime	2.06	Indifference
49				
50		Meropenem	0.50	Synergism
51				
52		Imipenem	0.50	Synergism
53				
54				
55				
56				
57				
58				
59				
60				

5.3 POTENTIAL OF 2-CHLORO-*N*-(4-FLUORO-3-NITROPHENYL)ACETAMIDE  
AGAINST *Klebsiella pneumoniae* BIOFILMS

Short communication submetido em 24 de março de 2021 para publicação na revista  
*Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (ISSN 2175-9790). Qualis Farmácia  
(quadriênio 2013-2016): B2



**POTENTIAL OF 2-CHLORO-N-(4-FLUORO-3-NITROPHENYL)ACETAMIDE AGAINST *Klebsiella pneumoniae* BIOFILMS**

Journal:	<i>Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences</i>
Manuscript ID	BJPS-2021-0268
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	24-Mar-2021
Complete List of Authors:	Cordeiro, Laísa; UFPB, Department of Pharmaceutical Science de Athayde Filho, Petrônio Filgueiras; Federal University of Paraíba, Chemistry Department Souza, Helivaldo; UFPB, Departamento de Química Sousa, Aleson; Universidade Federal da Paraíba Figueiredo, Pedro.; Federal University of Paraíba Oliveira, Rafael; UFPB De Oliveira Filho, Abrahão; Universidade Federal de Campina Grande, Unidade Acadêmica de Ciências biológicas Lima, Edeltrudes; Universidade Federal da Paraíba, Farmacia
Keyword:	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , biofilms, 2-chloro-N-(4-fluoro-3-nitrophenyl) acetamide

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3 **Short Communication**  
4  
5  
6  
7

8 **POTENTIAL OF 2-CHLORO-N-(4-FLUORO-3-NITROPHENYL)ACETAMIDE**  
9 **AGAINST *Klebsiella pneumoniae* BIOFILMS**  
10  
11

12 Laísa Vilar Cordeiro<sup>1</sup>, Helivaldo Diógenes da Silva Souza<sup>2</sup>, Aleson Pereira de Sousa<sup>1</sup>,  
13 Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo<sup>1</sup>, Rafael Farias de Oliveira<sup>2</sup>, Petrônio Filgueiras de  
14 Athayde Filho<sup>2</sup>, Abrahão Alves de Oliveira Filho<sup>3</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>1</sup>  
15  
16  
17

18 <sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of  
19 Paraíba, João Pessoa, Brazil  
20  
21

22 <sup>2</sup> Chemistry Department, Exact and Natural Sciences Center, Federal University of Paraíba,  
23 João Pessoa, Brazil  
24  
25

26 <sup>3</sup> Academic Unit of Biological Sciences, Center for Health and Rural Technology, Federal  
27 University of Campina Grande, Patos, Brazil.  
28  
29

30  
31  
32  
33  
34 \* Corresponding author. Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center,  
35 Federal University of Paraíba, 58033-455, João Pessoa, Brazil. Tel: +55 83 3216-7347, Fax:  
36 +55 83 3216-7094, [laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com). ORCID: 0000-0002-8884-7331.  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Abstract

There are few therapeutic options for the effective treatment of infections related to biofilms. Although the activity of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide against planktonic cells of *K. pneumoniae* has already been reported, it is necessary to investigate whether the substance also has activity on biofilms formed by this pathogen, since this species is associated with high rates of biofilm-related infections that directly impact in clinical practice. Given this context, this study aimed to investigate the action of this acetamide on *K. pneumoniae* biofilms, analyzing its effect on the inhibition of biofilm formation and also the ability to act on previously formed biofilms. There was a significant reduction in the formation of *K. pneumoniae* biofilms. The acetamide was able to reduce biofilm formation by up to 93% compared to the untreated group. It is also important to highlight that, even in suboptimal concentrations, there was inhibition of biofilm formation. In addition, it also acted on previously formed biofilms, promoting a reduction of up to 91.6% compared to the negative control. In view of the above, it is possible to observe that 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide has a notorious antibiofilm activity, which had not yet been explored.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, biofilms, 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide.

## Chloroacetamide as an antibiofilm agent

## INTRODUCTION

Bacteria exhibit two forms of life, a free-living planktonic and a sessile, but highly organized, associated with surfaces in biofilms (Rumbaugh, Sauer 2020; Liu *et al.*, 2020). In both cases, these microorganisms are harmful to human and environmental health. Bacterial biofilms are involved in 65% of microbial diseases and in more than 80% of chronic infections, causing more than 30 million deaths, being *Klebsiella pneumoniae* one of the main species associated with biofilms-related infections (Mahamuni-Badiger *et al.*, 2020; Olivares *et al.*, 2020). Most antimicrobial substances available are developed and evaluated

1  
2  
3 against planktonic microorganisms. However, these treatments are often ineffective against  
4 pathogenic biofilms, because they are more resistant and extremely difficult to treat and  
5 effectively eradicate (Verderosa *et al.*, 2019; Mahamuni-Badiger *et al.*, 2020).  
6  
7

8 Combating bacterial biofilms requires multiple therapeutic strategies, including the  
9 discovery of new molecular supports, improvements in antimicrobial administration and drug  
10 design strategies based on synthetic chemistry (Belousoff *et al.*, 2019; Murtaza *et al.*, 2019).  
11 Obtaining synthetic drugs from acetamides is a promising strategy, because this group is  
12 easily synthesized and its derivatives show a wide range of biological properties, especially  
13 antibacterial (Katke *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2013; Murtaza *et al.*, 2019).  
14  
15  
16  
17

18 Although the activity of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide against  
19 planktonic cells of *K. pneumoniae* has already been reported (Cordeiro *et al.*, 2020), it is  
20 necessary to investigate whether the substance also has activity on biofilms formed by this  
21 pathogen, since this species is associated with high rates of biofilm-related infections that  
22 directly impact in clinical practice.  
23  
24  
25  
26

27 Given this context, this study aimed to investigate the action of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-  
28 3-nitrophenyl)acetamide on *K. pneumoniae* biofilms, analyzing its effect on the inhibition of  
29 biofilm formation and also the ability to act on previously formed biofilms.  
30  
31  
32  
33  
34  
35

## 36 MATERIAL AND METHODS

### 37 Preparation of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl) acetamide

38  
39  
40 The tested substance 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl) acetamide was synthesized  
41 and characterized as described by Peixoto *et al.* (2016) and Cordeiro *et al.* (2020). For use in  
42 the antibiofilm activity tests, it was properly weighed and solubilized in 5%  
43 dimethylsulfoxide (DMSO) and 2% tween 80, in order to obtain emulsions of necessary  
44 concentrations.  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

### 54 Strains

1  
2  
3  
4  
5 For this work, strains of *K. pneumoniae* from clinical isolates were used, which  
6 belong to the MICOTECA of the Antibacterial and Antifungal Activity Research Laboratory  
7 of the Federal University of Paraíba, Brazil. The clinical strains used were: KP-56, KP-87,  
8 KP-143 and KP-260. The American Type Culture Collection strain ATCC-700603 was used  
9 as control. To prepare the inoculum used in the tests, the bacterial suspensions were  
10 suspended in 0.9% saline solution, from fresh cultures, and adjusted to the McFarland  
11 standard 0.5 scale.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

### 20 **Effect on inhibition of biofilm formation**

21  
22  
23  
24 The values of the minimum inhibitory concentrations (MICs) of 2-chloro-*N*-(4-  
25 fluoro-3-nitrophenyl)acetamide on the planktonic cells of *K. pneumoniae* strains used in this  
26 study were previously determined by Cordeiro *et al.* (2020). Briefly, the analysis was carried  
27 out using the broth microdilution technique in a 96-well plate to obtain different  
28 concentrations of the substance. At the same time, sterility, cell viability and interference  
29 controls of vehicles used in the preparation of emulsions (DMSO and Tween-80) were also  
30 performed. MIC is defined as the lowest concentration capable of causing complete inhibition  
31 of bacterial growth after 24 hours at  $35 \pm 2$  °C. Such concentrations served as a starting point  
32 to perform the analysis of acetamide activity on *K. pneumoniae* biofilm cells.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40 Aiming to analyze the potential of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide to  
41 inhibit biofilm formation by *K. pneumoniae*, the microdilution plates were incubated  
42 statically with brain heart infusion broth (BHI) containing different concentrations of the  
43 substance in the presence of the bacterial inoculum (final concentration of  $10^7$  CFU/mL).  
44 Negative controls were carried out containing only culture broth and inoculum. After 24  
45 hours of incubation at  $35 \pm 2$  °C, the contents of the wells were discarded and washed three  
46 times with sterile distilled water, in order to remove planktonic cells, reserving them for  
47 drying at room temperature. After drying, the 1% violet crystal solutions were transferred  
48 and left to stand for 40 min. The dye was discarded and its excess on the well walls was  
49 removed by washing with distilled water. Thus, the wells received absolute ethanol and, after  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 30 minutes at rest, the plate was read on a microplate spectrophotometer (Multiskan GO) at  
4 590nm (Balasubramanian *et al.*, 2012). All analyzes were performed in quintuplicate.  
5  
6  
7

### 8 9 **Effect on preformed biofilms**

10  
11  
12  
13 In order to analyze the potential of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide  
14 against preformed biofilms, the plates were previously incubated with BHI broth and  
15 inoculum (final concentration  $10^7$  UFC/mL) for 24 h at  $35 \pm 2$  °C, to form the biofilms in the  
16 wells. Then, the contents of the wells were removed and a new culture broth containing  
17 different concentrations of the substance was added. The plates were incubated statically  
18 under the same conditions of time and temperature. Finally, the same process described above  
19 was performed for evaluation on a microplate spectrophotometer (Rajasekharan *et al.*, 2017).  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26

### 27 **Statistical analysis**

28  
29  
30  
31 Statistical significance was determined by the paired test using the t test and the  
32 results were considered statistically significant when  $p < 0.05$  for rejection of the null  
33 hypothesis. For this plotting, the GraphPad Prism software (version 6.0 for Windows, San  
34 DIEGO, CA-USA) was used.  
35  
36  
37  
38  
39  
40

## 41 **RESULTS AND DISCUSSION**

42  
43  
44  
45 The 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide showed a significant capacity to  
46 prevent the formation of *K. pneumoniae* biofilms, as shown in Figure 1. The average  
47 inhibition in biofilm formation, among the five *K. pneumoniae* strains evaluated, was 89% at  
48 the concentration corresponding to the MIC (512 µg/ mL) and 93.9% at concentrations  
49 corresponding to 2 x MIC and 4 x MIC (1024 and 2048 µg/ mL, respectively).  
50  
51  
52  
53

54  
55 [Figure 1]  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Biofilm microorganisms can tolerate much higher concentrations of antimicrobials  
4 and disinfectants, reaching rates 10 to 1000 times higher than planktonic cells. Several  
5 conventional antibacterials drugs are ineffective against biofilms, even in high concentrations  
6 (Carlson *et al.*, 2008; Jamal *et al.*, 2018; Ranieri *et al.*, 2018). The 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-  
7 nitrophenyl)acetamide was able to prevent the biofilm formation, already from the MIC,  
8 which represents a significant potential against biofilms.  
9

10  
11  
12  
13 The fact that this synthetic acetamide is capable of acting on planktonic cells and  
14 biofilms is clinically relevant, given the differences between infections related to these  
15 groups. Planktonic cells are mainly related to acute infections. On the other hand, the  
16 successive changes that occur in these cells to form biofilms make them part of an  
17 arrangement much more resistant to conventional drugs, contributing to persistent infections.  
18 It is estimated that among all microbial and chronic infections, 65% and 80%, respectively,  
19 are associated with biofilm formation (Carlson *et al.*, 2008; Jamal *et al.*, 2018; Ranieri *et al.*,  
20 2018).  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

28 One of the challenges in the treatment of biofilm-related infections is that several  
29 classes of antibiotics used in clinical practice, including  $\beta$ -lactams, are capable of promoting  
30 changes in the expression of bacterial virulence factors when administered in subinhibitory  
31 concentrations. It has been observed, for example, that suboptimal concentrations of these  
32 compounds increase the potential for biofilm formation in various bacterial species, by  
33 different mechanisms (Kaplan *et al.*, 2012; Goneau *et al.*, 2015; Ranieri *et al.*, 2018).  
34  
35  
36  
37  
38

39 The induction of biofilm formation in subinhibitory concentrations is a clinically  
40 relevant process, because, during the treatment of the infection, part of the population of  
41 microorganisms is exposed to suboptimal concentrations, even when the recommended  
42 conditions for using the drug are followed. Thus, low doses of these drugs can interfere with  
43 the course of the infection, complicating the treatment of these diseases (Kaplan *et al.*, 2012;  
44 Goneau *et al.*, 2015).  
45  
46  
47  
48  
49

50 Based on this, it is necessary to evaluate the action of a substance on biofilms also at  
51 subinhibitory concentrations. As can be seen in Figure 2, the 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-  
52 nitrophenyl)acetamide did not promote an increase in biofilm formation when it was in  
53 subinhibitory concentrations, and is important to note that the observed effect was similar in  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 all strains analyzed in this study. Even in suboptimal concentrations, there was a 49.5%  
4 reduction in biofilm formation when the strains were exposed to 1/8 MIC (64 µg/ mL), 63.0%  
5 and 68.4% when exposed to 1/4 MIC (128 µg/ mL) and 1/2 MIC (256 µg/ mL), respectively.  
6  
7 This reduction is observed in comparison with the control group, in which the bacteria strains  
8  
9 do not receive any type of treatment.  
10

11  
12 [Figure 2]  
13

14  
15 In addition to not inducing an increase in biofilm levels, the 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-  
16 nitrophenyl)acetamide promotes its reduction, even at subinhibitory concentrations, which  
17 reinforces the pharmacological potential of this molecule.  
18  
19

20  
21 When investigating the action of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide on  
22 preformed *K. pneumoniae* biofilms, it was possible to observe that the acetamide was also  
23 able to act in this situation, in a significant way, as shown in Figure 3. There was a reduction  
24 of 52.2%, 72.8% and 91.6% in biofilm levels in groups treated with the substance at  
25 concentrations corresponding to MIC, 2x MIC and 4x MIC, when compared to the untreated  
26 group (negative control).  
27  
28  
29  
30

31  
32 [Figure 3]  
33

34  
35  
36  
37 There is a great concern to prevent the formation of biofilm by pathogenic species.  
38 However, few studies are conducted to assess the potential against the already formed biofilm  
39 which, once established, are difficult to remove and are responsible for high rates of  
40 therapeutic failure (Wu *et al.*, 2015).  
41  
42  
43

44 Although 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide was able to act even in  
45 mature biofilms in the concentrations used in this study, this activity was less evident than  
46 the ability of this substance to reduce the formation of biofilms, as shown previously - which  
47 is expected, due to these structures being already established.  
48  
49  
50

51 As demonstrated by Cordeiro *et al.* (2020), this acetamide has good potential for oral  
52 administration, according to preliminary results, in addition to presenting low cytotoxicity  
53 and mutagenicity, favorable for future *in vivo* analyzes. Thus, it is interesting for future  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 research that the mechanism of action of this acetamide is investigated, in addition to serving  
4 as a basis for several structural modifications to improve this activity.  
5  
6

7  
8 In view of the above, it is possible to observe that 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-  
9 nitrophenyl)acetamide has a notorious antibiofilm activity, which had not yet been explored.  
10 In this way, this study sheds light on this compound and opens perspectives for its potential  
11 to be better elucidated, as it can become a promising drug candidate for application in clinical  
12 practice against biofilm-related infections.  
13  
14  
15  
16  
17  
18

## 19 REFERENCES

20  
21  
22  
23 Balasubramanian D, Schneper L, Merighi M, Smith R, Narasimhan G, Lory S, *et al.* The  
24 Regulatory Repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC  $\beta$ -Lactamase Regulator AmpR  
25 Includes Virulence Genes. *Plos one*. 2012;7: e34067.  
26  
27  
28

29  
30 Belousoff MJ, Venugopal H, Wright A, Seoner S, Stuart I, Stubenrauch C, *et al.* CryoEM-  
31 guided development of antibiotics for drug-resistant bacteria. *Chem. Med. Chem.*  
32 2019;14:527-531.  
33  
34

35  
36 Carlson RP, Taffs R, Davison WM, Stewart PS. Anti-biofilm properties of chitosan-coated  
37 surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2008;19:1035-1046.  
38  
39

40  
41 Cordeiro L, Diniz-Neto H, Figueiredo P, Souza H, Sousa A, Andrade-Júnior F, *et al.* Potential  
42 of 2-chloro-*N*-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide against *Klebsiella pneumonia* and in vitro  
43 toxicity analysis. *Molecules*. 2020;25:3959.  
44  
45

46  
47 Goneau LW *et al.* Subinhibitory Antibiotic Therapy Alters Recurrent Urinary Tract Infection  
48 Pathogenesis through Modulation of Bacterial Virulence and Host Immunity. *Mbio*. 2015;6.  
49  
50

51  
52 Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, *et al.* Bacterial biofilm and  
53 associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* 2018; 81: 7-11.  
54  
55  
56  
57  
58  
59

1  
2  
3 Kaplan JB, Izano EA, Gopal P, Karwacki MT, Kim S, Bose JL, *et al.* Low Levels of  $\beta$ -  
4 Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in  
5 *Staphylococcus aureus*. *Mbio.* 2012;3.  
6  
7

8  
9 Katke SA, Amrutkar SV, Bhor RJ, Khairnar MV. Synthesis of biologically active 2-chloro-  
10 N-alkyl/aryl acetamide derivatives. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2011;2:148-156.  
11  
12

13  
14 Liu Z, Hong C, Yang Y, Dai L, Ho CL. Advances in bacterial biofilm management for  
15 maintaining microbiome homeostasis. *Biotechnol. J.* 2020;1900320.  
16  
17

18 Mahamuni-Badiger PP, Patil PM, Badiger MV, Patel PR, Thorat-Gadgil BS, *et al.* Biofilm  
19 formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. *Mat Sci Eng C-MATER*  
20 2020;108:1-72.  
21  
22

23  
24 Murtaza S, Altaf AA, Hamayun M, Iftikhar K, Tahir MN, Tariq J, *et al.* Synthesis,  
25 antibacterial activity and docking studies of chloroacetamide derivatives. *Eur. J. Chem.*  
26 2019;10:358-366.  
27  
28

29  
30 Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, Prévost G, Bernardi T, Jehl F. Clinical impact of  
31 antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *Front.*  
32 *Microbiol.* 2020;10:1-12.  
33  
34

35  
36 Patel RV, Kumari P, Rajani DP, Chikhaliya KH. Synthesis of coumarin-based 1, 3, 4-  
37 oxadiazol-2-ylthio-N-phenyl/benzothiazolyl acetamides as antimicrobial and antituberculosis  
38 agents. *Med. Chem. Res.* 2013;22:195-210.  
39  
40

41  
42 Peixoto IN, Souza HDS, Lira BF, Silva DF, Lima EO, Barbosa-Filho JM, *et al.* Synthesis  
43 and Antifungal Activity Against Candida Strains of Mesoionic System Derived From 1,3-  
44 Thiazolium-5-thiolate. *J. Braz. Chem. Soc.* 2016;27:1807-1813.  
45  
46

47  
48 Rajasekharan SK, Ramesh S, Satish AS, Lee J. Antibiofilm and Anti- $\beta$ -Lactamase Activities  
49 of Burdock Root Extract and Chlorogenic Acid against *Klebsiella pneumoniae*. *J. Microbiol.*  
50 *Biotechn.* 2017;27:542-551.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Ranieri MRM, Whitchurch CB, Burrows LL. Mechanisms of biofilm stimulation by  
4 subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018;45:164-169.

6  
7 Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020;1-16.

9  
10 Silva D, Diniz-Neto H, Cordeiro L, Silva-Neta M, Silva S, Andrade-Júnior F, *et al.* (R)-(+)-  
11  $\beta$ -Citronellol and (S)-(-)- $\beta$ -Citronellol in Combination with Amphotericin B against  
12 *Candida* spp. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:1785.

13  
14  
15  
16 Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial biofilm eradication agents: a current  
17 review. *Front. Chem.* 2019;7:1-17.

18  
19  
20  
21 Wu H, Moser C, Wang HZ, Høiby N, Song ZJ. Strategies for combating bacterial biofilm  
22 infections. *Int. J. Oral Sci.* 2015;7:1-7.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

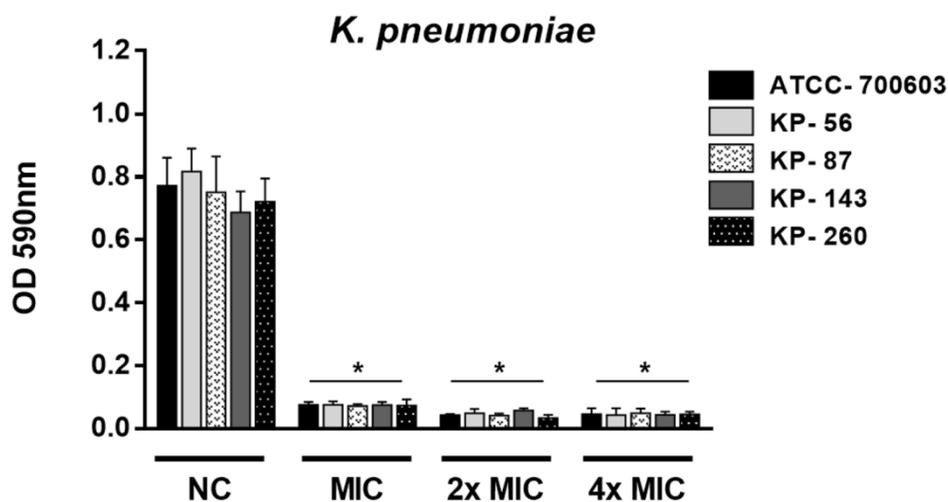


Figure 1. Effect of 2-chloro-N- (4-fluoro-3-nitrophenyl) acetamide on the inhibition of biofilm formation by *K. pneumoniae*. Statistical analysis compared to the negative control group (NC). The results were considered significant when  $p \leq 0.05$  (\*). Error bars: standard deviation of mean (SD).

259x157mm (150 x 150 DPI)

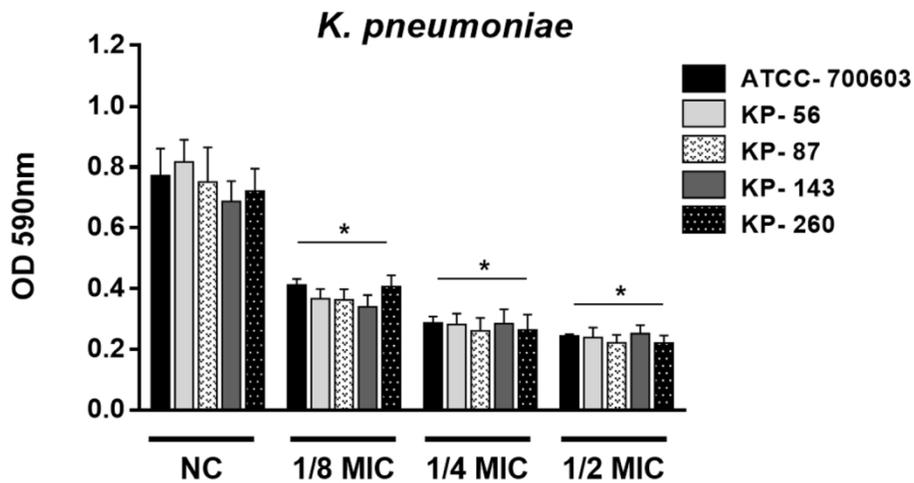


Figure 2. Effect of subinhibitory concentrations of 2-chloro-N-(4-fluoro-3-nitrophenyl) acetamide on the biofilms formation by *K. pneumoniae*. Statistical analysis compared to the negative control group (NC). The results were considered significant when  $p \leq 0.05$  (\*). Error bars: standard deviation of mean (SD).

267x156mm (150 x 150 DPI)

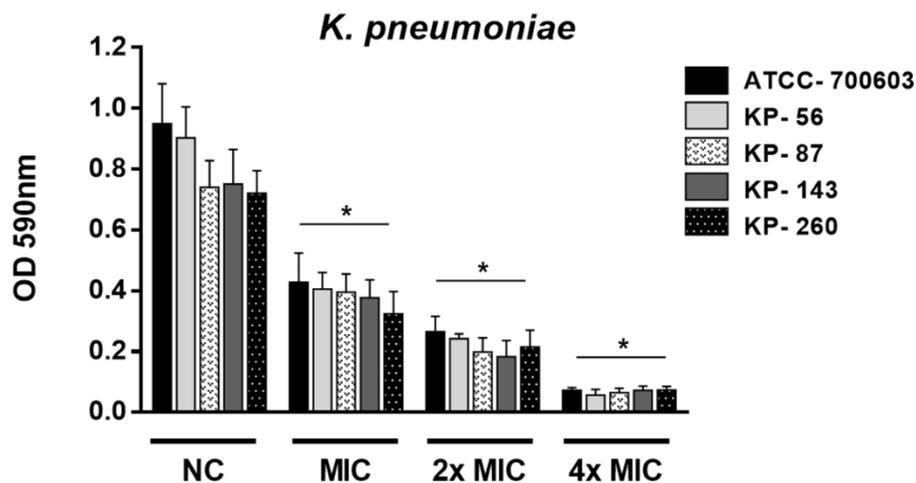


Figure 3. Effect of 2-chloro-N-(4-fluoro-3-nitrophenyl)acetamide on the preformed biofilms by *K. pneumoniae*. Statistical analysis compared to the negative control group (NC). The results were considered significant when  $p \leq 0.05$  (\*). Error bars: standard deviation of mean (SD).

267x156mm (150 x 150 DPI)

## 6 CONCLUSÃO

Com base no exposto, conclui-se que a substância 2-cloro-*N*-(4-flúor-3-nitrofenil)acetamida:

- Possui potencial antibacteriano frente a cepas de *K. pneumoniae*, com ação bactericida a partir da CIM, e o átomo de cloro presente em sua estrutura possivelmente contribui para essa atividade, estabilizando a molécula no sítio ativo da enzima-alvo e levando à lise celular bacteriana;
- Apresenta baixa citotoxicidade *in vitro* sobre hemácias e baixa mutagenicidade em células da mucosa bucal, indicando promissor potencial para futuros estudos *in vivo* de avaliação da toxicidade;
- Demonstra, através da análise *in silico*, um perfil farmacocinético favorável para administração por via oral, com boa biodisponibilidade teórica e boa solubilidade, sugerindo adequada absorção e distribuição *in vivo*;
- Potencializa o efeito dos antibacterianos ciprofloxacino, cefepima, meropenem e imipenem *in vitro*, de modo sinérgico ou aditivo, indicando a possibilidade de reduzir a viabilidade bacteriana utilizando menores concentrações dessas substâncias *in vivo*;
- Possui atividade contra biofilmes, impedindo a formação e também atuando sobre biofilmes previamente formados por *K. pneumoniae*.

## REFERÊNCIAS

- ASCHALE, M. Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel substituted 2-chloroacetanilides. **International Journal of ChemTech Research**, v. 4, n. 4, p. 1437-1441, 2012.
- ASHURST, J.V.; DAWSON, A. *Klebsiella pneumoniae*. In: **StatPearls**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2018.
- BALASUBRAMANIAN, D. *et al.* The Regulatory Repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC  $\beta$ -Lactamase Regulator AmpR Includes Virulence Genes. **Plos one**, v. 7, n. 3, p. e34067, 2012.
- BARZEGARI, A. *et al.* The battle of probiotics and their derivatives against biofilms. **Infection and drug resistance**, v. 13, p. 659, 2020.
- BEITELSHEES, M. *et al.* Phenotypic variation during biofilm formation: implications for anti-biofilm therapeutic design. **Materials**, v. 11, n. 7, p. 1086, 2018.
- BELLON, S. *et al.* Crystal structures of Escherichia coli topoisomerase IV ParE subunit (24 and 43 kilodaltons): A single residue dictates differences in novobiocin potency against topoisomerase IV and DNA gyrase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 1856–1864, 2004.
- BONAPACE, C.R. *et al.* Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, p. 363-366, 2002.
- BRAVO, H.R. *et al.* Chemical basis for the antimicrobial activity of acetanilides. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 48, n. 4, p. 27-30, 2003.
- BROWN, S.P.; CORNFORTH, D.M.; MIDEO, N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 7, 2012.
- CALFEE, D.P. Recent advances in the understanding and management of *Klebsiella pneumoniae*. **F1000Research**, v. 6, 2017.
- CIOFU, O. *et al.* Antibiotic treatment of biofilm infections. **Apmis**, v. 125, n. 4, p. 304-319, 2017.
- CLEGG, S.; MURPHY, C.N. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Urinary Tract Infections: **Molecular Pathogenesis and Clinical Management**, p. 435-457, 2017.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents**. Approved Guideline M26-A; Pennsylvania, United States of America: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved standard M07-A10. Pennsylvania, United States of America: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2015.

COLEMAN, S. *et al.* Comparative metabolism of chloroacetamide herbicides and selected metabolites in human and rat liver microsomes. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 12, 2000.

COTTAREL, G.; WIERZBOWSKI, J. Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. **Trends in biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 547-555, 2007.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. Investigation of haemostasis. *In: Practical Haematology*, 9th ed.; Harcourt Publishers Limited: London, UK, 2001; pp. 444–451.

DADGOSTAR, P. Antimicrobial resistance: implications and costs. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 3903, 2019.

DEVAR, M.J. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 7, p. 3902-39091, 1985.

DEVI, K. P. *et al.* Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107-115, 2010.

DORON, S.; GORBACH, S. L. Bacterial infections: overview. **International Encyclopedia of Public Health**, p. 273, 2008.

EGAN, W.J.; MERZ, K.M.; BALDWIN, J.J. Prediction of Drug absorption using multivariate Statistics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 3867–3877, 2000.

ELSHIKH, M. *et al.* Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 1015-1019, 2016.

EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST) OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES (ESCMID). Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. **Clinical microbiology and infection**, v. 6, n. 9, p. 503-508, 2000.

EXNER, M. *et al.* Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? **GMS Hygiene and Infection Control**, v. 12, 2017.

FEHLBERG, L.C.C. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 577-580, 2012.

FLAMM, R.K. *et al.* Gepotidacin (GSK2140944) *in vitro* activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, p. e00468-17, 2017.

FLEMING, D; RUMBAUGH, K. The consequences of biofilm dispersal on the host. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2018.

FLEMMING, H.; NEU, T.R.; WOZNIAK, D.J. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 7945-7947, 2007.

GABRIEL, H.E. *et al.* Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 835–841, 2006.

GEBREYOHANNES, G. *et al.* Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. **Heliyon**, v. 5, n. 8, p. e02192, 2019.

GHOSE, A.K.; VISWANADHAN, V.N.; WENDOLOSKI, J.J. A Knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 1, p. 55–68, 1999.

GONEAU, L.W. *et al.* Subinhibitory Antibiotic Therapy Alters Recurrent Urinary Tract Infection Pathogenesis through Modulation of Bacterial Virulence and Host Immunity. **Mbio**, v. 6, n. 2, 2015.

GUILHEN, C. *et al.* Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 1-15, 2016.

HAN, S. *et al.* Structural basis for effectiveness of siderophore-conjugated monocarbams against clinically relevant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 22002–22007, 2010.

HOLDGATE, G.A. *et al.* The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: A thermodynamic and crystallographic study. **Biochemistry**, v. 36, p. 9663–9673, 1997.

JETTI, V.; CHIDURALA, P.; MESHARAM, J. S. Synthesis of new Acetamide-conjugated Monobactam antibiotics. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 4, p. 1553-1561, 2015.

KAPLAN, J.B. *et al.* Low Levels of  $\beta$ -Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. **Mbio**, v. 3, n.4, 2012

KASSIE, F. *et al.* Khat (*Catha edulis*) consumption causes genotoxic effects in humans. **International Journal of Cancer**, v. 92, p. 329–332, 2001.

- KATKE, S.A. *et al.* Synthesis of biologically active 2-chloro-N-alkyl/aryl acetamide derivatives. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 2, p. 148-156, 2011.
- KING, D.T. *et al.* Structural insights into inhibition of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, p. 979–993, 2017.
- KLONTZ, E.H. *et al.* Structure and dynamics of FosA-mediated fosfomycin resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, p. e01572-17, 2017.
- LEE, C. *et al.* Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 483, 2017.
- LIPINSKI, C.A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3–26, 1997.
- LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, p. a000398, 2010.
- LUEPKE, K.H. *et al.* Past, present, and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 37, n. 1, p. 71-84, 2017.
- MARRA, A.R. *et al.* Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n.7, p. 1866-1871, 2011.
- MARTIN, R.M.; BACHMAN, M.A. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 1-15, 2018.
- MCFARLANE, M.D.; MOODY, D.J.; SMITH, D.M. o-Nitroaniline Derivatives. Part 10. 5- and 6-Amino-1H-benzimidazole-3-Oxides. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 1, p. 691-696, 1988.
- MOUILLERON, S.; BADET-DENISOT, M.A.; GOLINELLI-PIMPANEAU, B. Ordering of C-terminal loop and glutaminase domains of glucosamine-6-phosphate synthase promotes sugar ring opening and formation of the ammonia channel. **Journal of Molecular Biology**, v. 377, p. 1174–1185, 2008.
- MUHAMMAD, M.H. *et al.* Beyond risk: Bacterial biofilms and their regulating approaches. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 928, 2020.
- NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, p. 252-275, 2017.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, p. 252-275, 2017.

NUKAGA, M. *et al.* Inhibition of class A Beta-lactamases by carbapenems: Crystallographic observation of two conformations of meropenem in SHV-1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, p. 12656–12662, 2008.

OCTAVIA, S.; LAN, R. The family Enterobacteriaceae. **The prokaryotes**, v. 9, p. 223-286, 2014.

OLIVEIRA D.M.P. *et al.* Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 2020.

OLSZEWSKA, A. *et al.* Chloroacetamide-linked nucleotides and DNA for cross-linking with peptides and proteins. **Bioconjugate Chemistry**, v. 27, p. 2089-2094.

PACZOSA, M.K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, 2016.

PATEL, R.V. *et al.* Synthesis of coumarin-based 1, 3, 4-oxadiazol-2-ylthio-N-phenyl/benzothiazolyl acetamides as antimicrobial and antituberculosis agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 1, p. 195-210, 2013.

PATRO, L.P.P.; RATHINAVELAN, T. Targeting the Sugary Armor of *Klebsiella* Species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 367.

PAZ, M.C.F. *et al.* Análise da infecção hospitalar em um hospital universitário na paraíba no período de 2012 a 2014. **Revista Saúde e Ciência**, v. 4, n. 3, p. 31-43, 2015.

PEIXOTO, I.N. *et al.* Synthesis and antifungal activity against *Candida* strains of mesoionic system derived from 1, 3-Thiazolium-5-thiolate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 1807-1813, 2016.

PIDDOCK, L.J.V. Understanding drug resistance will improve the treatment of bacterial infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 639-640, 2017.

PIPERAKI, E. *et al.* *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 36, n. 10, p. 1002-1005, 2017.

QURESHI, Z.A., *et al.* Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 2108-2113, 2012.

RAJASEKHARAN, S.K. *et al.* Antibiofilm and Anti- $\beta$ -Lactamase Activities of Burdock Root Extract and Chlorogenic Acid against *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 542-551, 2017.

RANGEL, M. *et al.* Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, p. 305–309, 1997.

- RANIERI, M.R.M. *et al.* Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 164-169, 2018.
- RUIDER, S.A.; MAULIDE, N. Strong bonds made weak: towards the general utility of amides as synthetic modules. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 47, p. 13856-13858, 2015.
- RUMBAUGH, K.P.; SAUER, K. Biofilm dispersion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 571-586, 2020.
- SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.
- SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.
- SILVA, D. *et al.* (R)-(+)- $\beta$ -Citronellol and (S)-(-)- $\beta$ -Citronellol in Combination with Amphotericin B against *Candida* spp. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 1785, 2020.
- TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018.
- THOMAS, P. *et al.* The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. **Mutation Research**, v. 638, p. 37-47, 2008.
- THORPE, K.E.; JOSKI, P.; JOHNSTON, K.J. Antibiotic-resistant infection treatment costs have doubled since 2002, now exceeding \$2 billion annually. **Health Affairs**, v. 37, n. 4, p. 662-669, 2018.
- TOMIC, A.D. *et al.* Small-molecule inhibitor of FosA expands fosfomicin activity to multidrug-resistant Gram-negative pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, p. e01524-18, 2019.
- VEBER, D.F. *et al.* Molecular properties that influence the oral Bioavailability of Drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2615-2623, 2002.
- WILLYARD, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. **Nature News**, v. 543, n. 7643, p. 15, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>>. Acesso em: 28/12/2020.
- WRIGHT, P.M.; SEIPLE, I.B.; MYERS, A.G. The evolving role of chemical synthesis in antibacterial drug discovery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 34, p. 8840-8869, 2014.

WU, X. *et al.* Synergistic effects of antimicrobial peptide DP7 combined with antibiotics against multidrug-resistant bacteria. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 939-946, 2017.

WYRES, K.L.; HOLT, K.E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 131-139, 2018.

WYRES, K.L.; LAM, M.M.C.; HOLT, K.E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature Reviews**, v. 18, p. 344-359, 2020.

## APÊNDICE – PRODUÇÃO ACADÊMICA

Principais artigos publicados em revistas científicas e  
patentes submetidas para análise

Article

# Antibacterial and Antibiofilm Activity of Myrtenol against *Staphylococcus aureus*

Laísa Cordeiro <sup>1,\*</sup>, Pedro Figueiredo <sup>1</sup>, Helivaldo Souza <sup>2</sup>, Aleson Sousa <sup>1</sup>,  
Francisco Andrade-Júnior <sup>1</sup>, José Barbosa-Filho <sup>1</sup> and Edeltrudes Lima <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58033-455, Paraíba, Brazil; pedrotrfigueiredo@gmail.com (P.F.); aleson\_155@hotmail.com (A.S.); juniorfarmacia.ufcg@outlook.com (F.A.-J.); jbarbosa@ltf.ufpb.br (J.B.-F.); edelolima@yahoo.com.br (E.L.)

<sup>2</sup> Chemistry Department, Exact and Natural Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58033-455, Brazil; helivaldog3@gmail.com

\* Correspondence: laisavilar@gmail.com; Tel.: +55-83-3216-7347

Received: 8 May 2020; Accepted: 25 May 2020; Published: 25 June 2020



**Abstract:** The increase in *Staphylococcus aureus* resistance to conventional antibacterials and persistent infections related to biofilms, as well as the low availability of new antibacterial drugs, has made the development of new therapeutic alternatives necessary. Medicinal plants are one of the main sources of bioactive molecules and myrtenol is a natural product with several biological activities, although its antimicrobial activity is little explored. Based on this, the objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of myrtenol against *S. aureus*, determining the minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC), investigating the possible molecular target through the analysis of molecular docking. It also aimed to evaluate the effect of its combination with antibacterial drugs and its activity against *S. aureus* biofilms, in addition to performing an in silico analysis of its pharmacokinetic parameters. Myrtenol showed MIC and MBC of 128 µg/mL (bactericidal action) and probably acts by interfering with the synthesis of the bacterial cell wall. The effects of the association with antibacterials demonstrate favorable results. Myrtenol has remarkable antibiofilm activity and in silico results indicate a good pharmacokinetic profile, which make myrtenol a potential drug candidate for the treatment of infections caused by *S. aureus*.

**Keywords:** myrtenol; *Staphylococcus aureus*; antibacterial; molecular docking; antibiofilm; checkerboard method

## 1. Introduction

*Staphylococcus aureus* is an important human pathogen that causes community and nosocomial infections, associated with high morbidity and mortality, resulting in considerable costs for health systems [1]. This species is naturally susceptible to virtually all antibiotics that have ever been developed. However, it also demonstrates a unique ability to quickly develop an antibiotic resistance mechanism. The finding of *S. aureus* resistance to commonly used antibiotics, especially beta-lactams, the emergence of strains resistant to methicillin and vancomycin, and the presence of mobile genetic elements involved in the transmission of multiple antibiotic resistance genes, are complicating factors for the treatment of these infections [2]. Currently, finding new drugs to treat infections caused by *S. aureus* resistant to methicillin and vancomycin is considered a high priority [3].

One of the reasons that makes infections caused by *S. aureus* more delicate in its prognosis and treatment is the ability of this microorganism to form biofilms [4]. These structures represent a clinical challenge, as they are highly resistant to antimicrobial therapies and host defenses, generally occurring in locations that are not easily accessible for treatment and which contribute to persistent infections [5].



Article

# Terpinen-4-ol as an Antibacterial and Antibiofilm Agent against *Staphylococcus aureus*

Laís Cordeiro <sup>1,\*</sup> , Pedro Figueiredo <sup>1</sup> , Helivaldo Souza <sup>2</sup> , Aleson Sousa <sup>1</sup> ,  
Francisco Andrade-Júnior <sup>1</sup> , Dianne Medeiros <sup>1</sup> , Jefferson Nóbrega <sup>1</sup> , Daniele Silva <sup>1</sup> ,  
Evandro Martins <sup>3</sup> , José Barbosa-Filho <sup>1</sup> and Edeltrudes Lima <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Science, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58033-455, Brazil; pedrotrfigueiredo@gmail.com (P.F.); aleson\_155@hotmail.com (A.S.); juniorfarmacia.ufcg@outlook.com (F.A.-J.); daiannemedeiros1@gmail.com (D.M.); jeffersonrodriguesn@hotmail.com (J.N.); danielufigueredo31@gmail.com (D.S.); jbarbosa@ltf.ufpb.br (J.B.-F.); edelolima@yahoo.com.br (E.L.)

<sup>2</sup> Chemistry Department, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58033-455, Brazil; helivaldog3@gmail.com

<sup>3</sup> Chemistry Department, State University of Piauí, Piri-piri 64260-000, Brazil; evandropaulo@prp.uespi.br

\* Correspondence: laisavilar@gmail.com; Tel.: +55-83-3216-7347

Received: 8 May 2020; Accepted: 20 May 2020; Published: 25 June 2020



**Abstract:** *Staphylococcus aureus* is able to rapidly develop mechanisms of resistance to various drugs and to form strong biofilms, which makes it necessary to develop new antibacterial drugs. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* is used as an antibacterial, a property believed to be mainly due to the presence of terpinen-4-ol. Based on this, the objective of this study was to evaluate the antibacterial and antibiofilm potential of terpinen-4-ol against *S. aureus*. The Minimal Inhibitory and Minimal Bactericidal Concentrations (MIC and MBC) of terpinen-4-ol were determined, and the effect of its combination with antibacterial drugs as well as its activity against *S. aureus* biofilms were evaluated. In addition, an in silico analysis of its pharmacokinetic parameters and a molecular docking analysis were performed. Terpinen-4-ol presented a MIC of 0.25% (*v/v*) and an MBC of 0.5% (*v/v*) (bactericidal action); its association with antibacterials was also effective. Terpinen-4-ol has good antibiofilm activity, and the in silico results indicated adequate absorption and distribution of the molecule in vivo. Molecular docking indicated that penicillin-binding protein 2a is a possible target of terpinen-4-ol in *S. aureus*. This work highlights the good potential of terpinen-4-ol as an antibacterial product and provides support for future pharmacological studies of this molecule, aiming at its therapeutic application.

**Keywords:** terpinen-4-ol; *Staphylococcus aureus*; antibacterial; antibiofilm; molecular docking; checkerboard method

## 1. Introduction

*Staphylococcus aureus* is a Gram-positive bacterial species capable of efficiently circumventing the body's defense barriers, through its virulence mechanisms [1]. This pathogen can cause a wide range of infections and has a high rate of morbidity and mortality, which generates high costs for health systems [2]. Although *S. aureus* is naturally susceptible to practically all antibiotics that have already been developed, it is also capable of rapidly developing mechanisms of resistance to various drugs, compromising the use of even the most potent antibacterials agents, such as methicillin and vancomycin [3]. Despite the spreading of bacterial drug resistance, few antibacterial drugs have been introduced in recent years. This means that there is a high need for new drugs to treat infections [4].

Another complicating factor in infections caused by *S. aureus* is the strong ability of this pathogen to form biofilms, which occur in sites that are difficult to access and are highly resistant to drugs,



Article

# Isoeugenol and Hybrid Acetamides against *Candida albicans* Isolated from the Oral Cavity

Daianne Medeiros <sup>1</sup>, José Oliveira-Júnior <sup>1</sup> , Jefferson Nóbrega <sup>1</sup>, Laísa Cordeiro <sup>1</sup> ,  
 Jeane Jardim <sup>2</sup>, Helivaldo Souza <sup>2,\*</sup> , Gracielle Silva <sup>2</sup>, Petrônio Athayde-Filho <sup>2</sup>,  
 José Barbosa-Filho <sup>1</sup> , Luciana Scotti <sup>1</sup> and Edeltrudes Lima <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, 58033-455 João Pessoa, Paraíba, Brazil; daiannemedeiros1@gmail.com (D.M.); joseklidemberg@gmail.com (J.O.-J.); jeffersonrodriguesn@hotmail.com (J.N.); laisavilar@gmail.com (L.C.); jbarbosa@ltf.ufpb.br (J.B.-F.); luciana.scotti@gmail.com (L.S.); edelolima@yahoo.com.br (E.L.)

<sup>2</sup> Chemistry Department, Exact and Natural Sciences Center, Federal University of Paraíba, 58033-455 João Pessoa, Brazil; jeanegalindo@hotmail.com (J.J.); gracielletavares@ltf.ufpb.br (G.S.); athayde-filho@quimica.ufpb.br (P.A.-F.)

\* Correspondence: helivaldog3@gmail.com; Tel.: +55-83-3216-7347

Received: 1 August 2020; Accepted: 1 September 2020; Published: 3 October 2020



**Abstract:** Isoeugenol is a phytoconstituent found in several essential oils. Since many natural products are potent antimicrobials, the synthesis of hybrid molecules—combining the chemical skeleton of the phytochemical with synthetic groups—can generate substances with enhanced biological activity. Based on this, the objective of this study was to evaluate the antifungal activity of isoeugenol and hybrid acetamides against *Candida albicans* isolated from the oral cavity. The methodologies used were the determination of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum fungicidal concentration (MFC), action on fungal micromorphology, interaction test with nystatin by the checkerboard method and molecular docking study with important enzymes in the maintenance of fungal viability. The synthetic molecules did not demonstrate significant antifungal activity in vitro. The isoeugenol MIC and MFC varied between 128 and 256 µg/mL, being the phytoconstituent able to interfere in the formation of blastoconid and chlamydoconid structures, important in the pathogenic process of the species. The molecular docking study revealed that isoeugenol is a potential inhibitor of the enzymes 14- $\alpha$ -demethylase and delta-14-sterol reductase, interfering in the fungal cell membrane biosynthesis. Thus, this research provides clearer expectations for future pharmacological studies with isoeugenol and derived molecules, aiming at its therapeutic application against infections caused by *Candida* spp.

**Keywords:** *Candida albicans*; isoeugenol; checkerboard method; molecular docking; antifungal activity; oral candidiasis

## 1. Introduction

Candidiasis is an infectious process of clinical importance caused by dimorphic, commensal, opportunistic fungi, belonging to the genus *Candida* [1]. It is an infection of considerable public relevance, since yeasts of this genus are responsible for about 80% of hospital fungal infections [2], representing the fourth most common nosocomial pathogen in systemic infections [3], with morbidity and mortality rates between 30–50% [4].

The genus *Candida* comprises of about 150–200 described species, however only fifteen can be pathogenic to humans, with *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. krusei* being the most prevalent in different types of candidiasis [5–7]. Several virulence factors are directly related to the capacity of these species to infect their hosts, including: the ability to morphological transition



Article

# (R)-(+)- $\beta$ -Citronellol and (S)-(–)- $\beta$ -Citronellol in Combination with Amphotericin B against *Candida* Spp.

Daniele Silva <sup>1,\*</sup> , Hermes Diniz-Neto <sup>1</sup>, Laís Cordeiro <sup>1</sup>, Maria Silva-Neta <sup>1</sup>, Shellygton Silva <sup>1</sup>, Francisco Andrade-Júnior <sup>1</sup>, Maria Leite <sup>1</sup> , Jefferson Nóbrega <sup>1</sup>, Maria Morais <sup>1</sup>, Juliana Souza <sup>2</sup>, Lyvia Rosa <sup>1</sup>, Thamara Melo <sup>1</sup>, Helivaldo Souza <sup>2</sup> , Aleson Sousa <sup>3</sup> , Gregório Rodrigues <sup>4</sup>, Abrahão Oliveira-Filho <sup>5</sup> and Edeltrudes Lima <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, Brazil; hermes.dn@hotmail.com (H.D.-N.); laisavilar@gmail.com (L.C.); neves\_neta@hotmail.com (M.S.-N.); shellygton@hotmail.com (S.S.);

juniorfarmacia.ufcg@outlook.com (F.A.-J.); denisecaiana@yahoo.com.br (M.L.); jeffersonrodriguesn@hotmail.com (J.N.); franccillysimoies@gmail.com (M.M.);

lyvinhasr14@hotmail.com (L.R.); th.rmelo@ltf.ufpb.br (T.M.); edelolima@yahoo.com.br (E.L.)

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, Brazil;

julianakelly71@gmail.com (J.S.); helivaldog3@gmail.com (H.S.)

<sup>3</sup> Postgraduate Program in Drug Development and Technological Innovation, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, Brazil; aleson\_155@hotmail.com

<sup>4</sup> Postgraduate Program in Dentistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, Brazil;

gregorio\_marcio1@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Health and Rural Technology Center, Federal University of Campina Grande, Patos 58700-970, Brazil; abrahao.farm@gmail.com

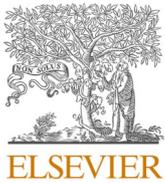
\* Correspondence: daniefigueredo31@gmail.com; Tel.: +55-83-99981-1977

Received: 13 December 2019; Accepted: 13 January 2020; Published: 5 March 2020



**Abstract:** The enantiomers (R)-(+)- $\beta$ -citronellol and (S)-(–)- $\beta$ -citronellol are present in many medicinal plants, but little is understood about their bioactivity against *Candida* yeasts. This study aimed to evaluate the behavior of positive and negative enantiomers of  $\beta$ -citronellol on strains of *Candida albicans* and *C. tropicalis* involved in candidemia. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicide concentration (MFC) were determined. The evaluation of growth kinetics, mechanism of action, and association studies with Amphotericin B (AB) using the checkerboard method was also performed. R-(+)- $\beta$ -citronellol and S-(–)- $\beta$ -citronellol presented a MIC<sub>50%</sub> of 64  $\mu$ g/mL and a MFC<sub>50%</sub> of 256  $\mu$ g/mL for *C. albicans* strains. For *C. tropicalis*, the isomers exhibited a MIC<sub>50%</sub> of 256  $\mu$ g/mL and a MFC<sub>50%</sub> of 1024  $\mu$ g/mL. In the mechanism of action assay, both substances displayed an effect on the fungal membrane but not on the fungal cell wall. Synergism and indifference were observed in the association of R-(+)- $\beta$ -citronellol and AB, while the association between S-(–)- $\beta$ -citronellol and AB displayed synergism, additivity, and indifference. In conclusion, both isomers of  $\beta$ -citronellol presented a similar profile of antifungal activity. Hence, they can be contemplated in the development of new antifungal drugs providing that further research is conducted about their pharmacology and toxicity.

**Keywords:** isomers; (R)-(+)- $\beta$ -citronellol; (S)-(–)- $\beta$ -citronellol; *candida* spp.; antifungal activity



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## Investigation of ethnomedicinal use of *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett (Burseraceae) in treatment of diarrhea

Rayane Fernandes Pessoa<sup>a</sup>, Indyra Alencar Duarte Figueiredo<sup>a</sup>, Sarah Rebeca Dantas Ferreira<sup>a</sup>, Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Silva<sup>a</sup>, Rafael Lima Marinho Paiva<sup>b</sup>, Laísa Vilar Cordeiro<sup>a</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>a,c</sup>, Sonia Pereira Cabrera<sup>d</sup>, Tania Maria Sarmento Silva<sup>d</sup>, Fabiana de Andrade Cavalcante<sup>a,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação Em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/Universidade Federal da Paraíba, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas/Universidade Federal da Paraíba, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Química/Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Fisiologia e Patologia/Universidade Federal da Paraíba, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Commiphora leptophloeos*

Diarrheal

Rat ileum

## ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett, popularly known as “imburana”, “imburana-de-cheiro” or “imburana-de-espinho”, has been used in folk medicine for the treatment of gastrointestinal diseases, such as diarrhea. The indian tribes “Kairir-Shokó and shokó use the bark to treat diarrhea. However, there is no scientific evidence to justify the therapeutic use of this species.

**Aim of the study:** To investigate the ethnomedicinal use of *Commiphora leptophloeos*, with respect to the antimicrobial, antisecretory, antitoxicity and antispasmodic activities of the crude ethanolic extract obtained from its leaves (CL-EtOH<sub>L</sub>) and the mechanism underlying this action in rodents.

**Material and methods:** In the evaluation of antibacterial and antifungal activities was determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract, against different strains of bacteria and fungi. All experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Paraíba (045/2016). In addition, behavioral screening and acute toxicity assessment of CL-EtOH<sub>L</sub> were performed in female mice (n = 6). In the investigation of antidiarrheal activity (n = 6), frequency of defecation and number of liquid stools, were classified during 4 h, and intestinal fluid and transit were measured. In addition, the antispasmodic effect on rat ileum (n = 5) was also investigated.

**Results:** The ethanolic extract is rich in flavonoids and the main were identified as C-glycosylated flavonoids (isoorientin, orientin, and vitexin). In the evaluation of antimicrobial and antifungal activity, the extract showed moderate efficacy only against the tested strains of *Candida krusei* ATCC-6258, *Candida parapsilosis* ATCC-22019 and *Candida glabrata* ATCC-90030. The extract had no toxic effect until 2000 mg/kg. In castor oil-induced diarrhea, CL-EtOH<sub>L</sub> inhibited, in a dose-dependent manner, both total defecation frequency (ED<sub>50</sub> = 380.4 ± 145.4 mg/kg) and the number of watery stools (ED<sub>50</sub> = 151.2 ± 76.3 mg/kg). The extract showed no effect on fluid accumulation or normal intestinal transit. On the other hand, when the animals were pretreated with castor oil, the extract decreased the distance traveled by the activated charcoal (ED<sub>50</sub> = 177.0 ± 50.3 mg/kg). In the investigation of antispasmodic effect, CL-EtOH<sub>L</sub> antagonized the contractions induced by KCl 30 mM (IC<sub>50</sub> = 208.2 ± 25.9 µg/mL) and CCh 10<sup>-6</sup> M (IC<sub>50</sub> = 95. ± 22.0 µg/mL). To verify the participation of muscarinic receptors in this effect, cumulative carbachol curves were performed in the absence and presence of the extract, and a non-competitive pseudo-irreversible antagonism of these receptors was observed.

**Abbreviations:** CL-EtOH<sub>L</sub>, crude ethanolic extract obtained from its leaves; DMSO, dimethylsulfoxide; BHI, Brain Heart Infusion; ASD, medium and fungi in Agar Sabouraud Dextrose; MIC, Minimal inhibitory concentration; ED<sub>50</sub>, dose of a drug that produces 50% of the maximal response; EC<sub>50</sub>, concentration of a drug that produces 50% of the maximal response; UPLC-DAD-QTOF-MS/MS, ultra-high-performance liquid chromatography).

\* Corresponding author. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Patologia, Jardim Universitário, s/n, Castelo Branco, João Pessoa, Paraíba, 58051-970, Brazil

E-mail address: [fabianacavalcante@ltf.ufpb.br](mailto:fabianacavalcante@ltf.ufpb.br) (F. de Andrade Cavalcante).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113564>

Received 13 May 2020; Received in revised form 7 October 2020; Accepted 5 November 2020

Available online 7 November 2020

0378-8741/© 2020 Published by Elsevier B.V.



BRIEF REPORT



## Antifungal action of $\alpha$ -pinene against *Candida* spp. isolated from patients with otomycosis and effects of its association with boric acid

Jefferson Rodrigues Nóbrega<sup>a</sup> , Daniele de Figuerêdo Silva<sup>a</sup>,  
Francisco Patricio de Andrade Júnior<sup>a</sup>, Paula Mariane Silva Sousa<sup>b</sup>, Pedro Thiago  
Ramalho de Figueiredo<sup>a</sup>, Laís Vilar Cordeiro<sup>a</sup>  and Edeltrudes de Oliveira  
Lima<sup>a</sup> 

<sup>a</sup>Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; <sup>b</sup>Academic Unit of Health, Education and Health Center, Federal University of Campina Grande, Cuité, Brazil

### ABSTRACT

The genus *Candida* is one of the main causes of otomycosis. The growing index of fungal strains resistant to antifungals makes necessary the search for new agents and  $\alpha$ -pinene is a phytoconstituent present in plants with remarkable antimicrobial activity, which becomes an interesting object of study. Thus, the objective of this research was to evaluate the antifungal activity of  $\alpha$ -pinene against *Candida* species isolated from otomycosis, determining the Minimum Inhibitory and Fungicide Concentrations, micromorphological analysis and verifying the effects of the association with boric acid.  $\alpha$ -pinene showed significant antifungal activity, with greater inhibitory activity against *C. parapsilosis*, fungicidal action and proved to be effective in inhibiting fungal structures, such as pseudo-hyphae and promoting a marked decrease in blastoconidia. The combination of  $\alpha$ -pinene with boric acid produced additive effects that may be interesting for use in clinical practice.

### ARTICLE HISTORY

Received 14 February 2020  
Accepted 11 October 2020

### KEYWORDS

$\alpha$ -pinene; antifungal activity; *Candida* spp; boric acid

**CONTACT** Laís Vilar Cordeiro  [laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com)  Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, 58033-455, João Pessoa, Brazil

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1837803>.

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

SHORT COMMUNICATION



## The impact that $\beta$ -citronellol isomers have on the biofilm formation of *Candida* yeasts

Daniele de Figueredo Silva<sup>a</sup> , Laísa Vilar Cordeiro<sup>a</sup> , Pedro Thiago Ramalho Figueiredo<sup>a</sup> , Hermes Diniz-Neto<sup>a</sup> , Helivaldo Diógenes da Silva Souza<sup>b</sup>  and Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>a</sup> 

<sup>a</sup>Post-Graduation Program in Natural Products and Bioactive Synthetics, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil; <sup>b</sup>Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

### ABSTRACT

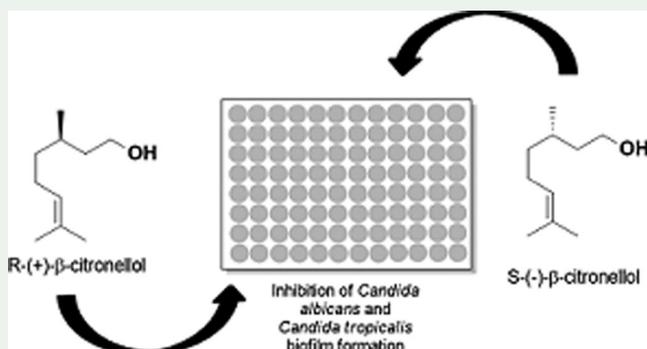
Infections associated with biofilms developed by *Candida* spp. are becoming a great problem due to its resistance against the immune response of the host and the action of antifungal agents. Hence, finding substances that can inhibit the development of biofilms increases the likelihood that these compounds one day can become good antifungals applied in the clinic. The aim of this study was to evaluate the effect of  $\beta$ -citronellol enantiomers on the biofilm formation by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolated from bloodstream infections. Inhibition was evaluated by reading microplates treated with different concentrations of R-(+)- $\beta$ -citronellol, S-(-)- $\beta$ -citronellol and amphotericin B, compared to negative control, in spectrophotometer at 590 nm. All tested concentrations of  $\beta$ -citronellol enantiomers inhibited the biofilm formation of *Candida*. However, it is still necessary to evaluate the behavior of these isomers on mature biofilms, so that they can become more viable as antifungal therapeutical agents.

### ARTICLE HISTORY

Received 6 January 2020  
Accepted 9 August 2020

### KEYWORDS

Anti-biofilm activity;  
 $\beta$ -citronellol; *Candida* spp; isomers



**CONTACT** Daniele de Figueredo Silva  [danielefigueredo@ltf.ufpb.br](mailto:danielefigueredo@ltf.ufpb.br)

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1813131>.  
These authors contributed equally to this work.

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

## Synthesis, *in silico* Study, Theoretical Stereochemistry Elucidation and Antifungal Activity of New Imides Derived from Safrole

Raquel F. Vilela,<sup>a</sup> Normando A. S. Costa,<sup>b</sup> Helivaldo D. S. Souza,<sup>b</sup> Luiz E. G. Cruz,<sup>a</sup>  
Kelyonara M. S. de Assis,<sup>a</sup> Edeltrudes O. Lima,<sup>b</sup> Laísa V. Cordeiro,<sup>b</sup> Bruno F. Lira,<sup>a</sup>  
Petronio F. de Athayde-Filho,<sup>a</sup> Gerd B. Rocha<sup>a</sup> and José M. Barbosa-Filho<sup>b</sup>\*,<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba,  
58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

Ten imides derived from safrole, **4a-4j**, were synthesized and their structures were fully characterized by infrared (IR) spectroscopy, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and high resolution mass spectrometry (HRMS) analysis. Among the ten imides studied, eight are new. The compounds were evaluated in an *in silico* study and showed strong to moderate antifungal activity against various strains of *Candida* and *Cryptococcus*. In particular, compounds **4b**, **4c** and **4h** exhibited strong antifungal activity, with minimum inhibitory concentration (MICs) between 0.17-0.73 μmol mL<sup>-1</sup>. The compound **4j** exhibited antifungal activity with MIC 1.28 μmol mL<sup>-1</sup> for all strains tested. *In silico* studies of the parameters of Lipinski's rule of five indicated that these compounds are potential new drug candidates. The predict oral bioavailability can be evaluated through these parameters. In addition, a computational study helped assigning the stereochemistry of compound **4j**, where the synthesized mixture is composed by two stereoisomers, **4j**(1) (*SRR*) and **4j**(2) (*RSS*).

**Keywords:** imides, safrole, *Candida*, *Cryptococcus*

### Introduction

There is a need for more research on the development of new antifungal drugs as indicated by worrisome increase in the frequency of opportunistic fungal infections, particularly those caused by *Candida* spp. and *Cryptococcus* spp.<sup>1</sup> Opportunistic infections are a serious public health problem, affecting mainly the hospital setting. Meanwhile, the most susceptible patients are those who are immunocompromised with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or tuberculosis or transplanted. In these patients, the function of polymorphonuclear leukocytes is depressed, so leukocyte adhesion along with chemotaxis and phagocytosis can be affected leading to possible opportunistic fungal infections.<sup>2</sup>

Cyclic imides represent one of the important classes of compounds characterized as substances that contain the CO–NR–CO– group, where R is a hydrogen, alkyl group or aryl group. Among them are the maleimides, succinimides,

phthalimides and glutarimides, which make up an important group of compounds that are biologically active and of substantial importance in medicinal chemistry. Heterocyclic imide analogues of the natural alkaloid phyllanthimide, isolated from *Phyllanthus sellowianus*<sup>3</sup> were described by various research groups.<sup>4</sup> However, the structures of the imides depend on the conditions of the environment. Studies carried out by Sortino *et al.*<sup>5</sup> with *N*-phenyl and *N*-phenylalkyl against fungi, where the stability of the structures to the aqueous medium was evaluated, show that the substituted maleimides do not suffer from ring opening, unlike the unsubstituted maleimides that suffer opening the imidic ring in aqueous medium.<sup>6</sup> Among these and other imides, several synthesized compounds exert important biological activities, including antibacterial,<sup>7</sup> antifungals,<sup>7</sup> analgesics,<sup>8</sup> anticancer<sup>9</sup> and others.

Safrole is a phenolic ether of the arylpropanoid class. It is a slightly yellow liquid with a characteristic odor of natural occurrence and shows higher concentrations in plants of the families Aristolochiaceae, Lauraceae and Piperaceae.<sup>10</sup> Many studies have been carried out with

\*e-mail: jbarbosa@lft.ufpb.br

## Synthesis, *in silico* Study and Antimicrobial Evaluation of New Diesters Derived from Phthaloylglycine

Rafael F. de Oliveira,<sup>1a</sup> Helivaldo D. S. Souza,<sup>a</sup> Francinara S. Alves,<sup>a</sup> Abraão P. de Sousa,<sup>a</sup> Priscila S. V. de Lima,<sup>a</sup> Min-Fu N. Huang,<sup>a</sup> Laísa V. Cordeiro,<sup>b</sup> Hermes Diniz Neto,<sup>1b</sup> Edeltrudes O. Lima,<sup>b</sup> Emmely O. Trindade,<sup>a</sup> José M. Barbosa-Filho<sup>1b,\*b</sup> and Petrônio F. de Athayde-Filho<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

New diesters derived from phthaloylglycine (**7a-7i**) were synthesized and their structures characterized by infrared, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The compounds were evaluated in an *in silico* study, which demonstrated positive features indicating a possible drug candidate. The diesters showed antifungal activity ranging from moderate to strong against strains of *Candida*. Compounds **7a**, **7b**, **7c**, **7e** and **7i** had a moderate minimum inhibitory concentration (MIC) of 1024 µg mL<sup>-1</sup> against all fungal strains, while **7h** showed a very good MIC of 256 µg mL<sup>-1</sup> against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* and 64 µg mL<sup>-1</sup> against *Candida tropicalis*. However, only **7h** and **7i** were able to inhibit bacterial growth of strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* with an MIC of 1024 µg mL<sup>-1</sup>.

**Keywords:** phthalimide, phthaloylglycine, antibacterial activity, antifungal activity

### Introduction

Multidrug-resistance is posing a great threat to health care services worldwide, where infections caused by resistant bacteria and/or fungi are very difficult to treat, usually leading to therapeutic failure with high mortality rates. The development of new drugs is a prominent alternative in the control of these infections, aiming to prevent or decrease pathogen resistance to achieve better treatment outcomes.<sup>1,2</sup> Several heterocyclic compounds possess antimicrobial properties and have been studied and evaluated as potential drug candidates. Among such compounds is phthalimide, with a distinct and valuable structure for the design and development of new varieties of drugs.

Phthalimides have an imide ring, which is responsible for their biological activity.<sup>3</sup> These molecules have drawn attention because of their versatile range of biological applications including antibacterial, antifungal, analgesic, anti-inflammatory, antiviral, antitumor and anticonvulsant.<sup>4</sup>

It is widely reported that phthalimide is an important biologically active pharmacophore and its derivatives have great antimicrobial activities.<sup>5-7</sup>

To counter the mechanisms of microbial resistance already known, it is necessary to employ molecular modification strategies such as molecular lipophilicity control, which influences the biological activity of new drug candidates.<sup>8</sup> This is achieved by altering the number of carbons in the alkyl chain of an ester, for example.

Due to these merits, nine diester compounds derived from phthalimide were synthesized as potential new drug candidates. The compounds initially went through a design stage and *in silico* evaluation, and they were then taken to the organic synthesis stage, and finally tested for antimicrobial activity.

### Results and Discussion

#### Chemical

The synthesis of the target molecules **7a-7i** involved four synthetic stages, which are described in Scheme 1.

\*e-mail: jbarbosa@lft.ufpb.br

## Synthesis, Spectroscopic Characterization, DFT Calculations and Preliminary Antifungal Activity of New Piperine Derivatives

Joselito S. Souza Jr.,<sup>a</sup> Evandro P. S. Martins,<sup>ib</sup> Helivaldo D. S. Souza,<sup>ib a</sup>  
Rafael F. de Oliveira,<sup>ib a</sup> Francinara S. Alves,<sup>a</sup> Edeltrudes O. Lima,<sup>c</sup> Laísa V. Cordeiro,<sup>c</sup>  
Emmely O. Trindade,<sup>a</sup> Bruno F. Lira,<sup>a</sup> Gerd B. Rocha,<sup>a</sup> Petronio F. de Athayde-Filho<sup>a</sup>  
and José M. Barbosa-Filho<sup>ib \*c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual do Piauí, 64260-000 Piripiri-PI, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba,  
58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

Four new piperine derivatives, **PC1-PC4**, were synthesized, and their structures were fully characterized by infrared (IR) and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopies. Quantum chemical calculations were performed using density functional theory (DFT) with the B3LYP-D3/6-31G(d,p) and 6-311+G(2d,p) basis sets. Electronic properties, such as the energy gap between the highest occupied molecular orbital (HOMO) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) and some global chemical reactivity descriptors, were evaluated to study the reactivity and stability of the compounds. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR chemical shifts were calculated by using the gauge-invariant atomic orbital (GIAO) method and compared with experimental values. In addition, the compounds were evaluated in an antifungal study against *Candida*, *Trichophyton* and *Microsporum* strains, and only **PC4** showed 70% inhibition in ten tested strains, with a minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 1.23-2.46 μmol mL<sup>-1</sup> and a minimum fungicide concentration (MFC) ranging from 9.84-19.68 μmol mL<sup>-1</sup>, and presented a fungistatic effect.

**Keywords:** piperine, synthesis, NMR, DFT, antifungal activity

### Introduction

The rates of fungal resistance to drugs highlight an increasingly serious health problem and make it necessary to develop new therapeutic alternatives to treat these infections, since the options available today are mainly limited to azoles and echinocandins. More than one billion individuals worldwide are affected by fungal infections, and the associated mortality is over 1.5 million deaths each year. In this context, traditional medicine can serve as a guide during the process of discovering antifungal drugs, using the knowledge of plants used historically as anti-infectious agents.<sup>1,2</sup>

Plants, which are a major source of traditional medicines, are also promising sources for new drugs due to the presence of secondary metabolites with a wide range of biological activity, such as antimicrobial activity. In

many cases, these substances play a role in plant defense mechanisms against predation by microorganisms, insects, and herbivores. Some plants used for their odor (terpenoids), pigment (quinones and tannins), and flavor (terpenoid capsaicin from chili peppers) have been found to also possess medicinal properties. There is an enormous chemical diversity of natural products from plants, and these products can be used directly or used as a precursor for developing better molecules.<sup>3,4</sup>

Piperine (C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>) is a naturally occurring alkaloid and is one of the main secondary metabolites found in *Piper nigrum* and *P. longum*.<sup>5</sup> However, piperine can also be found in other species of the genus *Piper*, such as *P. guineense*,<sup>6</sup> *P. interruptum*,<sup>7</sup> *P. sarmentosum*<sup>8</sup> and *P. chaba*.<sup>9</sup> Amide alkaloids have pharmacological efficacies, such as antifungal,<sup>10</sup> antibacterial,<sup>11</sup> analgesic,<sup>12</sup> antipyretic,<sup>12</sup> anti-inflammatory,<sup>12</sup> antileishmanial,<sup>13</sup> and larvicidal<sup>14</sup> activities. Piperine can be isolated by various methods, such as maceration using acetic acid, extraction

\*e-mail: jbarbosa@lft.ufpb.br

## EPIDEMIOLOGY OF SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME (SARS) CAUSED BY COVID-19 IN THE STATE OF BAHIA

D. A. FERREIRA<sup>1</sup>, W. B. DA SILVA<sup>2</sup>, A. P. DA SILVA<sup>3</sup>, M. A. ELOY<sup>4</sup>, L. V. CORDEIRO<sup>5</sup>, F. P. DE ANDRADE JR<sup>6</sup>

Universidade Federal de Campina Grande<sup>1-4</sup>, Universidade Federal da Paraíba<sup>5,6</sup>

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5262-6262><sup>1</sup>

E-mail: [daviazavedoferreira@hotmail.com](mailto:daviazavedoferreira@hotmail.com)<sup>1</sup>

Submetido 15/08/2020 - Aceito xx/xx/20xx

DOI: 10.15628/holos.2020.10979

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the epidemiological profile of people affected with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) caused by COVID-19 in the state of Bahia, from March 7 to June 5, 2020. It is an epidemiological, retrospective and documentary study, in which data collection was performed through the "Monitora Covid-19". The variables analyzed were: week of notification, sex, age and the number of deaths. The absolute and relative frequencies were analyzed and the Chi-Square test of Independence was applied, in which  $p < 0.05$  was considered statistically significant. There were 26,418 cases of covid-19 in the State of Bahia,

with 1,977 of those affected developing SARS. Male individuals (54.9%) and above 60 years of age (50.9%) were the most prevalent, but there was no statistically significant association between the variables ( $p = 0.372$ ). Among the 806 deaths, there was a higher mortality in men (56.7%), with a lethality rate of 42.1%. In addition, there was a positive association for death in individuals aged 60 years or older and a positive association for absence of death between individuals aged 0 to 19 years and 20 to 59 years ( $p < 0.001$ ). Based on what has been exposed, there is an accelerated growth in the number of people affected by COVID-19 in Bahia in the three months analyzed.

**KEYWORDS:** Coronavirus infections, COVID-19, SARS-CoV-2, Epidemiology, Coronavirus.

## EPIDEMIOLOGIA DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE (SARS) CAUSADA POR COVID-19 NO ESTADO DA BAHÍA

### RESUMO

Objetivou-se avaliar o perfil epidemiológico de acometidos com Síndrome Aguda Respiratória Grave (SARS) advinda da COVID-19 no estado da Bahia, no período de 7 de Março a 5 de Junho de 2020. Trata-se de um estudo epidemiológico, retrospectivo e documental, em que a coleta de dados do "Monitora Covid-19". As variáveis analisadas foram: semana de notificação, gênero, idade e o número de óbitos. Analisou-se as frequências absoluta e relativa e o teste do Qui-Quadrado de Independência foi aplicado, em que  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Foram evidenciados 26.418 casos da covid-19 no Estado da Bahia, sendo que 1.977 dos acometidos desenvolveram

SARS. Indivíduos do sexo masculino (54,9%) e de idade a partir de 60 anos (50,9%) foram os mais prevalentes, porém não foi observado associação estatisticamente significativa entre as variáveis ( $p=0,372$ ). Dos 806 óbitos, observou-se maior mortalidade em homens (56,7%) com taxa de letalidade de 42,1%. Além disso, evidenciou-se associação positiva para óbito em indivíduos com 60 anos ou mais e associação positiva para ausência de óbito entre indivíduos de 0 a 19 anos e 20 a 59 anos ( $p < 0,001$ ). A partir do que foi exposto, constata-se que houve crescimento acelerado do número de acometidos pela COVID-19 na Bahia nos três meses analisados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Infecções por Coronavirus, COVID-19, SARS-CoV-2, Epidemiologia, Coronavírus.



ANTIFUNGAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF 2-BROMO-N-PHENYLACETAMIDE AGAINST *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*THAMARA RODRIGUES DE MELO<sup>1\*</sup>, LAÍSA VILAR CORDEIRO<sup>1</sup>, HELIVALDO DIÓGENES DA SILVA SOUZA<sup>2</sup>,  
PETRÔNIO FILGUEIRAS DE ATHAYDE-FILHO<sup>2</sup>, ABRAHÃO ALVES DE OLIVEIRA-FILHO<sup>3</sup>,  
SÁVIO BENVINDO FERREIRA<sup>4</sup>, EDELTRUDES DE OLIVERIA LIMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil. <sup>2</sup> Department of Chemistry, Exact and Natural Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil. <sup>3</sup>Department of , Federal University of Campina Grande, Patos, Brazil. <sup>4</sup>Federal University of Campina Grande, Cajazeiras, Brazil. Email: th.rmelo@outlook.com

Received: 28 August 2020, Revised and Accepted: 28 September 2020

## ABSTRACT

**Objective:** This study aimed to evaluate the antifungal and antibiofilm of 2-bromo-*N*-phenylacetamide (A1Br) against *Cryptococcus neoformans* *in vitro*.

**Methods:** The compound was characterized by infrared and <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectrometry data. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the plate dilution method and biofilm formation inhibition of the crystal violet assay.

**Results:** A1Br inhibited the growth of *C. neoformans* with MIC of 0.25 and 0.5 µg/ml and has good antibiofilm activity MIC ×4, with ≥80% inhibition growth.

**Conclusions:** Thus, A1Br shows potential antifungal and antibiofilm agents for the treatment of infections caused by *C. neoformans*, as well as the eradication of cryptococcal colonization of medical prosthetic devices.

**Keywords:** Antifungal, Biofilm, 2-Bromo-*N*-phenylacetamide, *Cryptococcus neoformans*, *In vitro*.

© 2020 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2020.v13i12.39834>

## INTRODUCTION

Cryptococcosis is a predominantly opportunistic fungal infection caused by yeasts of *Cryptococcus* genus, belonging to *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* complexes. This disease is associated with one of the main causes of mortality in immunocompromised individuals, predominantly HIV/AIDS [1-3].

Infection occurs through inhalation of the yeast's infectious forms, the basidiospores, usually in soil contaminated with decomposing bird and vegetable excrement. As a result, the manifestations usually occur in the pulmonary and cerebral form, often causing the most severe state of the disease, meningoencephalitis [4].

The pathogenicity of species of the genus *Cryptococcus* is facilitated by the expression of several virulence factors that play an important role in colonization, adhesion, invasion, dissemination, and evasion of the fungus from the defense mechanisms of the host's immune system [5]. Among these, factors are the ability to adhere to host cells and/or medical devices, production of exoenzymes, and biofilm formation [5-8].

Biofilms are defined as communities of highly organized microorganisms involved in a matrix polymeric, which are composed mainly of DNA, proteins, and polysaccharides [9].

Biofilm formation is an important virulence factor and is associated with increased antifungal resistance as it makes it harder for antifungal agents to penetrate the extracellular matrix, in addition to protecting the fungal cells from the host's immune response and environmental stress [10,11]. The eradication of biofilms *in vivo* generally requires concentrations of antimicrobials that are generally toxic to the host. In *C. neoformans*, biofilms are more resistive than planktonic cells to amphotericin B, in addition to being generally resistant to fluconazole

and voriconazole [12]. To reverse this scenario, several studies have been carried out to screen for new compounds that have antifungal activity.

The amide group is widely found in natural and synthetic products and important biological properties are described. Among the amides, some studies verified the efficacy of acetanilide derivatives, related to a wide range of biological activities, such as anti-inflammatory [13,14], analgesic [13,15], antibacterial [13,16,17], antiparasitic [13,18,19], and antifungal [13,16].

Considering, *C. neoformans* biofilm infections are increasingly recognized as a clinical problem. The discovery of new chemical entities effective in combating fungal resistance and with low toxicity is necessary and urgent. This work aims to investigate antifungal activity and the ability of 2-bromo-*N*-phenylacetamide (A1Br) to interfere in the inhibition of biofilm formation in *C. neoformans* isolates.

## METHODS

## Test substance and antifungal drugs

Aniline, bromoacetyl bromide, potassium carbonate (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), chloroform, and ethanol were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). The substance A1Br was prepared in a 50 mL flask containing aniline (1.86 g; 0.020 moles) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.31 g; 0.024 moles) solubilized in 20 ml of CHCl<sub>3</sub> at a temperature of 0°C, 2-bromoacetyl bromine (4.84 g; 0.024 moles) is added slowly. The bath ice is removed and the reaction is stirred for 20 h at room temperature environment. The reaction mixture is accompanied by thin-layer chromatographic (1:1 hexane/ethyl acetate). At the end of the reaction, the reaction mixture was subjected to extraction. The phrase organic is washed with water (3 ml × 25 ml), dried over anhydrous sodium sulfate, and then concentrated at reduced pressure, providing the precipitate

## Aloe gel: manipulation and characterization of physical-chemical quality adjustment

Italy Heibe Mendes Aciole<sup>1</sup>, Francisco Patricio de Andrade Júnior<sup>2</sup>, Laísa Vilar Cordeiro<sup>3</sup>, Júlia Beatriz Pereira de Souza<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Academic Unit of Health, Education and Health Center, Universidade Federal de Campina Grande, 58175-000, Cuité, Paraíba, Brazil. E-mail: italmendes@hotmail.com

<sup>2</sup>PhD student of Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos at Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: juniorfarmacia.ufcg@outlook.com

<sup>3</sup>PhD student of Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos at Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: laisavilar@gmail.com

<sup>4</sup>Professor PhD at Universidade Federal de Campina Grande, 58429-900, Cuité, Paraíba, Brazil. E-mail: juliabtriz@gmail.com

Received: 14 July 2019

Revised: 24 July 2020

Accepted: 27 July 2020

### SUMMARY

The objective of the study was to develop and characterize the gel based on *Aloe vera* for the Manoel Casado de Almeida Pharmacy School. The research was done at the Education and Health Center off the Federal University of Campina Grande, located in the city of Cuité (PB). For the quality control, chemical physical tests were carried out as determine pH, apparent density, viscosity, spreadability and centrifugation test. The gel demonstrated acceptable physicochemical characteristics exhibiting pH 5, bulk density 0.1018 ( $\pm$  0.0008), viscosity above 10 000 cP, and adequate stability. Complementary studies on microbiological quality are suggested, to give safety on their therapeutic potential in wound management.

*Key words:* *Aloe*, phytotherapy, medicinal plants, complementary therapies.

DOI: 10.35621/23587490.v7.n1.p1461-1479

## **AVALIAÇÃO DAS POSSÍVEIS INTERAÇÕES POR *DOCKING* MOLECULAR DOS FITOCONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* L. EM ENZIMAS DE *CANDIDA* SPP**

*EVALUATION OF POSSIBLE INTERACTIONS BY MOLECULAR DOCKING OF PHYTOCHEMICALS OF THE ESSENTIAL OIL OF ROSMARINUS OFFICINALIS L. IN ENZYMES OF CANDIDA SPP*

Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo<sup>1</sup>  
Laísa Vilar Cordeiro<sup>2</sup>  
Thamara Rodrigues de Melo<sup>3</sup>  
Giulian César da Silva Sá<sup>4</sup>  
Aleson Pereira de Sousa<sup>5</sup>

**RESUMO:** A grande biodiversidade de plantas medicinais encontradas no Brasil apresenta grande importância para a medicina popular, pois diversas espécies de plantas medicinais são utilizadas para o tratamento e cura de doenças. Dessa maneira, as plantas medicinais apresentam potencial na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Para auxiliar nos estudos de desenvolvimentos de novos fármacos, as técnicas quimioinformáticas se tornaram uma aliada dos pesquisadores ao reduzir tempo e gastos durante este processo. Neste sentido, o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) é conhecida popularmente como alecrim-de-jardim, alecrim-de-cheiro e apresenta importante atividade antifúngica sendo um grande fator para a descoberta de novas substâncias químicas com potencial antifúngico. Este trabalho tem como objetivo, analisar por *docking* molecular as interações de metabólitos secundários encontrados no óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* em diferentes enzimas de *Candida* spp. Os metabólitos secundários do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* foram obtidos da literatura, as enzimas foram adquiridas do Protein Data Bank sob código 5TZ1 (14 $\alpha$ -lanosterol-demetilase) e 1EQC (exo-beta-(1,3)-glucanase) com seus respectivos ligantes. O *docking* molecular foi realizado utilizando o software Molegro Virtual Docker. Após análise do *docking* molecular, as substâncias tiveram melhor afinidade pela enzima

<sup>1</sup> Doutorando em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, UFPB.

<sup>2</sup> Doutorando em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, UFPB.

<sup>3</sup> Doutorando em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, UFPB.

<sup>4</sup> Doutorando em Bioquímica, UFRN.

<sup>5</sup> Doutorando em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, UFPB.

DOI: 10.35621/23587490.v7.n1.p1480-1492

## O ATUAL PAPEL DAS PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DOS ALIMENTOS NA SAÚDE DAS POPULAÇÕES

*THE CURRENT ROLE OF NUTRITIONAL PROPERTIES IN FOODS IN THE HEALTH OF POPULATIONS*

Aleson Pereira de Sousa<sup>1</sup>

Laísa Vilar Cordeiro<sup>2</sup>

Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo<sup>3</sup>

Giulian César da Silva Sá<sup>4</sup>

Thamara Rodrigues de Melo<sup>5</sup>

**RESUMO: Objetivo:** A pesquisa pretende realizar uma revisão de literatura sobre o papel das propriedades nutricionais dos alimentos e o atual impacto na saúde das populações. **Métodos:** Foi realizada uma pesquisa do tema em revistas eletrônicas de cunho científico sendo elas Scientific Electronic Library Online (SciELO), National Library of Medicine (PubMed) e Medline, além de sites institucionais e livros para a obtenção de conteúdo científico sobre as propriedades nutricionais dos alimentos e a saúde das populações. **Resultados:** Há grande desafios impostos para os profissionais de saúde aliarem o campo da nutrição no contexto da promoção da saúde. No entanto, tais desafios apontam para a possibilidade de compatibilizar diferentes olhares e perspectivas sobre uma atuação interdisciplinar. Trazer e incentivar o reconhecimento da alimentação saudável como medida de promoção da saúde não pode ser dissociada da adoção de hábitos de vida saudáveis, especialmente a prática de atividade física. **Considerações Finais:** As políticas de saúde e a população passam por constantes processos de mudança, onde primeiro havia um processo curativo de saúde visando apenas tratamento de patologias, hoje já torna-se antiquado trazer o processo de saúde apenas em caráter preventivo, atualmente busca-se exercer a promoção da saúde na prática profissional. Utilizar o

---

<sup>1</sup> Doutorando do programa de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB. E-mail: aleson.pereira.sousa@gmail.com.

<sup>2</sup> Doutoranda do programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB.

<sup>3</sup> Doutorando do programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB.

<sup>4</sup> Doutorando programa de Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN.

<sup>5</sup> Doutoranda do programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB.

DOI: 10.35621/23587490.v7.n1.p1358-1370

## PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA HEPATITE C NO BRASIL NO PERÍODO 2013 - 2018

*EPIDEMIOLOGICAL PROFILE OF HEPATITIS C IN BRAZIL IN THE PERIOD 2013-2018*

Thamara Rodrigues de Melo<sup>1</sup>  
Giulian César da Silva Sá<sup>2</sup>  
Laísa Vilar Cordeiro<sup>3</sup>  
Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo<sup>4</sup>  
Sávio Benvindo Ferreira<sup>5</sup>  
Aleson Pereira de Sousa

**RESUMO:** A hepatite C é uma das principais causas de doença hepática crônica em todo o mundo. A estimativa indica que o Brasil é um país com prevalência intermediária, variando entre 1% e 2%. Diante desse contexto, o objetivo deste estudo relatar perfil epidemiológico da hepatite C no Brasil com enfoque nos aspectos relacionados na distribuição da infecção por gênero, faixa etária, etnia, região do país e fontes de transmissão. Trata-se de um estudo documental, descritivo, de coleta retrospectiva, por meio de casos notificados pelo DATASUS referentes aos agravos de hepatite C diagnosticados no Brasil entre 2013 a 2018. Nesse estudo, a maior prevalência da faixa etária de 40 a 59 anos (53,4%), do sexo masculino (57%), da raça branca (53,6%). No entanto, a escolaridade e fonte de transmissão foram notificados maioria como “ignorado”. Pela ausência de vacina ou profilaxia pós-exposição eficaz, o foco principal da prevenção está na investigação epidemiológica, como uma ferramenta imprescindível para reconhecimento e o entendimento da dinâmica para controle da epidemia por HCV.

**Palavras chave:** Brasil. Doenças transmissíveis. Epidemiologia. Hepatite C.

<sup>1</sup> Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB)/ UFPB (Área de concentração: Farmacologia).

<sup>2</sup> Doutorando do Programa de Pós-graduação em Bioquímica PPGBIOQ/ UFRN (Área de concentração: Bioquímica).

<sup>3</sup> Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB)/ UFPB (Área de concentração: Farmacologia).

<sup>4</sup> Doutorando do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB)/ UFPB (Área de concentração: Farmacoquímica).

<sup>5</sup> Professor Doutor da Unidade Acadêmica de Ciências da Vida da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Formação de Professores.

DOI: 10.35621/23587490.v7.n1.p1332-1346

## RUMO À OTIMIZAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE MANEJO DE ARBOVIROSES: POTENCIAL BIOINSETICIDA DE EXTRATOS VEGETAIS CONTRA *Aedes* SPP. (DIPTERA: CULICIDAE)

*TOWARDS THE OPTIMIZATION OF ARBOVIRUSES MANAGEMENT STRATEGIES: BIOINSECTICIDE POTENTIAL OF PLANT EXTRACTS AGAINST Aedes SPP. (DIPTERA: CULICIDAE)*

Giulian César da Silva Sá<sup>1</sup>  
 Laísa Vilar Cordeiro<sup>2</sup>  
 Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo<sup>3</sup>  
 Tamara Rodrigues de Melo<sup>4</sup>  
 Aleson Pereira de Sousa<sup>5</sup>

**RESUMO:** Mosquitos medicamente desafiadores do gênero *Aedes* são vetores de potenciais patógenos de doenças que assolam populações ao redor do mundo, como dengue, febre amarela, zika e febre chikungunya. Das estratégias de controle comumente disponíveis, tem-se os pesticidas sintéticos. Porém, efeitos colaterais ao ecossistema e aos organismos não-alvo são perceptíveis e seu uso excessivo contribuiu para o desenvolvimento de resistência nos mosquitos. Reconhecendo a relevância dessa problemática, a presente pesquisa objetivou apresentar uma revisão sistemática que abordasse a necessidade imediata do desenvolver novas medidas de controle de vetores, apontando os inseticidas botânicos como escolha ecologicamente mais viável. Das investigações realizadas, demarcou-se 554

<sup>1</sup> Biólogo, Especialista em Ciências Ambientais, Mestre em Biologia Celular e Molecular, e Doutorando em Bioquímica (UFRN). Pesquisador do Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte. E-mail: giuliancesarsa@gmail.com.

<sup>2</sup> Farmacêutica, Especialista em Atenção Farmacêutica e Farmácia Clínica, Mestre em Biologia Celular e Molecular, e Doutoranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (área de concentração: Farmacologia) (UFPB). E-mail: laisavilar@gmail.com.

<sup>3</sup> Farmacêutico, Mestre e Doutorando em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (área de concentração: Farmacologia) (UFPB). E-mail: pedrotrfigueiredo@hotmail.com.

<sup>4</sup> Farmacêutica, Especialista em Análises Clínicas, Mestre em Ciências Farmacêuticas, e Doutoranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (área de concentração: Farmacologia) (UFPB). E-mail: th.rmelo@outlook.com.

<sup>5</sup> Biomédico, Especialista em Citologia Clínica, Mestre em Biologia Celular e Molecular, e Doutorando em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamento (UFPB). E-mail: aleson\_155@hotmail.com.

DOI: 10.35621/23587490.v7.n1.p577-593

## A RESISTÊNCIA AOS ANTIMONIAIS PODE LEVAR AO AUMENTO DA VIRULÊNCIA EM *LEISHMANIA* SPP.?

CAN RESISTANCE TO ANTIMONIALS LEAD TO INCREASED VIRULENCE IN *LEISHMANIA* SPP.?

Laísa Vilar Cordeiro<sup>1</sup>  
Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo<sup>2</sup>  
Thamara Rodrigues de Melo<sup>3</sup>  
Giulian César da Silva Sá<sup>4</sup>  
Aleson Pereira de Sousa<sup>5</sup>

**RESUMO:** Leishmanioses são doenças negligenciadas, que acometem principalmente países tropicais e populações de baixa condição socioeconômica. Na prática clínica, a principal ferramenta para o combate da leishmaniose ainda é a farmacoterapia. Contudo, o arsenal terapêutico é bastante limitado. Na maioria dos países, como no Brasil, as drogas de primeira escolha para o tratamento das infecções por *Leishmania* sp. são os antimoniais e o tratamento possui várias limitações, dentre elas o crescente surgimento de parasitos resistentes a estas drogas. Estudos em procaríotos e eucariotos demonstram que a resistência a drogas está relacionada a alterações no fitness dos micro-organismos, onde é possível observar modificações no crescimento, virulência e transmissibilidade entre hospedeiros. Visto que tais alterações podem influenciar diretamente no curso da infecção, alterando o prognóstico clínico, é relevante que essa associação entre resistência a drogas e virulência/fitness parasitário seja melhor estudada. Esta revisão bibliográfica objetivou avaliar se a resistência aos antimoniais está correlacionada com o aumento da virulência de parasitos do gênero *Leishmania*. Trata-se de um estudo descritivo, realizado a partir das pesquisas bibliográficas e documentais para subsidiar a discussão do tema. A pesquisa foi realizada entre os meses de dezembro a fevereiro de 2020. Estudos apontam que parasitos resistentes aos antimoniais apresentam maiores parâmetros de virulência *in vitro* e *in vivo*. Tais estudos ainda são escassamente encontrados na literatura, mas apontam a

<sup>1</sup> Doutorandos em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB);

<sup>2</sup> Doutorandos em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB);

<sup>3</sup> Doutorandos em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB);

<sup>4</sup> Doutorando em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN);

<sup>5</sup> Doutorando em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB).



## Antifungal activity of carvacrol and antifungal agent combinations against non-*albicans* *Candida* species

Atividade antifúngica do carvacrol e associação entre agentes antifúngicos contra espécies de *Candida* não-*albicans*

J. R. Nóbrega<sup>1,\*</sup>; P. M. S. Sousa<sup>2</sup>; K. S. L. Mota<sup>3</sup>; L. V. Cordeiro<sup>1</sup>; F. P. Andrade Júnior<sup>1</sup>; W. A. Oliveira<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

<sup>2</sup> Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Sítio Olho D'água da Bica, 58175-000, Cuité, Paraíba, Brazil.

<sup>3</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 59200-000, Santa Cruz, Rio Grande do Norte, Brazil.

<sup>4</sup> Universidade Federal de Campina Grande, 58429-900, Cuité, Paraíba, Brazil

\*jeffersonrodriguesn@hotmail.com

(Recebido em 13 de agosto de 2019; aceito em 29 de outubro de 2019)

The aim of this study was to determine the minimum inhibitory concentration of carvacrol and to evaluate the antifungal activity of carvacrol when combined with fluconazole, ketoconazole or amphotericin B against non-*albicans* *Candida* species. MICs were determined using microdilution method, and the combination study was conducted using the checkerboard method. The carvacrol MIC ranged between 128 and 512 µg/mL. The greatest antifungal activity was displayed with ketoconazole. Conversely, fluconazole displayed the lowest activity. Amphotericin B showed MICs ranging from 0.5 to 2 µg/mL. The best combinations were observed against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*, which presented synergistic effects. Additive effect was observed in three combinations, whereas, indifferent interactions were seen in six combinations. No antagonistic effects were observed. Based on these results, we conclude that carvacrol retains high activity against non-*albicans* *Candida* strains, and the combinations between carvacrol and the antifungals tested yielded significant effects.

Keywords: antifungal, association, terpene.

O objetivo deste estudo foi determinar a concentração inibitória mínima de carvacrol e avaliar a atividade antifúngica desse fitoconstituente quando combinado com fluconazol, cetoconazol ou anfotericina B contra espécies de *Candida* não-*albicans*. As CIMs foram determinadas usando o método de microdiluição, e o estudo da combinação foi conduzido usando o método de *checkerboard*. A CIM carvacrol variou entre 128 e 512 µg / mL. A maior atividade antifúngica foi demonstrada com cetoconazol. Por outro lado, o fluconazol exibiu a menor atividade. A anfotericina B mostrou CIM variando de 0,5 a 2 µg / mL. As melhores combinações foram observadas contra *Candida guilliermondii* e *Candida parapsilosis*, que apresentaram efeitos sinérgicos. Efeito aditivo foi observado em três combinações, enquanto, interações indiferentes foram vistas em seis combinações. Nenhum efeito antagonico foi observado. Com base nesses resultados, concluímos que o carvacrol retém alta atividade contra cepas de *Candida* não-*albicans*, e as combinações entre o carvacrol e os antifúngicos testados produziram efeitos significativos.

Palavras-chave: antifúngicos, associação, terpeno.

### 1. INTRODUCTION

The incidence and prevalence of fungal infections caused by species of *Candida* are increasing rapidly, especially in large populations of immunocompromised patients and/or those hospitalized with underlying grave diseases [1]. *Candida* spp. are considered opportunistic microorganisms present in the normal microbiota of the oral cavity, gastrointestinal tract and urogenital tract in humans. They can become pathogenic species when there is weakening of the host defense system through multiple risk factors [2]. Although *C. albicans* is the most prevalent species involved in invasive fungal infections, the incidence of infections caused by non-*albicans* species has increased significantly in recent years [3]. The high prevalence of non-*albicans* *Candida* species

## Contamination of chickens by *Salmonella* spp., in Brazil: an important public health problem

Contaminação de frangos comercializados no Brasil por *Salmonella* spp.: um importante problema de saúde pública  
Contaminación de pollos comercializados en Brasil por *Salmonella* spp.: un importante problema de salud pública

Francisco Patrício de **ANDRADE JÚNIOR**<sup>1</sup>

Brenda Tamires de Medeiros **LIMA**<sup>2</sup>

Thiago Willame Barbosa **ALVES**<sup>2</sup>

Bren Carla de Medeiros **LIMA**<sup>3</sup>

Laísa Vilar **CORDEIRO**<sup>4</sup>

Vanessa Santos de Arruda **BARBOSA**<sup>5</sup>

Edeltrudes de Oliveira **LIMA**<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Master's Degree, Post-Graduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa – PB, Brazil

<sup>2</sup>Graduated on the Department of Pharmacy, Center of Education and Health, Federal University of Campina Grande, Cuité – PB, Brazil

<sup>3</sup>Graduating in Food Engineering, Agro-Food Science and Technology Center, Federal University of Campina Grande, Pombal – PB, Brazil

<sup>4</sup>Doctor student, Post-Graduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa – PB, Brazil

<sup>5</sup>Center of Education and Health, Federal University of Campina Grande, Cuité - PB, Brazil

<sup>6</sup>Prof. Dr. and Advisor, Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa-PB, Brazil

### Abstract

Introduction: Bacteria of the genus *Salmonella* are important pathogens involved in the contamination of various foods, such as chickens, and may cause food poisoning. Aim: The present study aimed to review the literature on the prevalence of chickens contaminated with *Salmonella* spp., which are commercialized in different Brazilian states. Material and methods: This was a literary review. The absolute frequency and the total percentage of contaminated samples was calculated and the Qui-square statistical test was applied, considering statistically significant  $p < 0.05$ . Results: 616 publications were retrieved, but only 10 articles were included to compose the results. The cataloged studies were carried out in 14 different Brazilian states, and it was observed that of 5,030 chicken samples analyzed, the mean prevalence of samples contaminated with *Salmonella* was 7.3% ( $n = 365$ ). In addition, the prevalence of samples in the different studies ranged from 2.5% to 44.6%. The most prevalent serotype was *S. Enteritidis* (28.7%) and a statistically significant association between the type of raw material for commercialization and the result of the chicken samples microbiological analysis was observed ( $p < 0.001$ ), where the carcasses represented 90.1% of the contaminated samples. Conclusion: Thus, the data presented in this study can serve as subsidy for the development of necessary, political or legislative, measures that allow a better control of commercialized chickens in Brazil.

**Descriptors:** Salmonella; Foodborne Diseases; Epidemiology.

### Resumo

Introdução: Bactérias do gênero *Salmonella* são importantes patógenos envolvidos na contaminação de diversos alimentos, a exemplo de frangos, podendo ocasionar em intoxicação alimentar. Objetivo: O presente estudo teve como objetivo fazer uma revisão de literatura acerca da prevalência de frangos contaminados por *Salmonella* spp., comercializados em diferentes estados brasileiros. Material e métodos: Tratou-se de uma revisão literária. Analisou-se a frequência absoluta e calculou-se o percentual total de amostras contaminadas; o teste Qui-Quadrado foi aplicado, considerando  $p < 0,05$  estatisticamente significativo. Resultados: Na revisão de literatura houve a recuperação de 616 publicações, porém somente 10 artigos foram incluídos para compor os resultados. Os estudos catalogados foram realizados em 14 estados distintos, e foi observado que de 5.030 amostras de frango analisadas, a prevalência média de amostras contaminadas por *Salmonella* foi de 7,3% ( $n=365$ ). Além disso, a prevalência de amostras nos diferentes estudos variou entre 2,5% a 44,6%. O sorotipo mais prevalente foi *S. Enteritidis* (28,7%) e associação estatisticamente significativa, entre o tipo de matéria prima para comercialização e o resultado da análise microbiológica das amostras de frango foi observada ( $p < 0,001$ ), em que as carcaças representaram 90,1% das amostras contaminadas. Conclusão: Assim, os dados apresentados neste estudo podem servir de subsídio para o desenvolvimento de medidas cabíveis, sejam elas políticas ou legislativas, que permitam maior fiscalização dos frangos comercializados no Brasil.

**Descritores:** Salmonella; Doenças Transmitidas por Alimentos; Epidemiologia.

### Resumen

Introducción: las bacterias del género *Salmonella* son patógenos importantes involucrados en la contaminación de varios alimentos, como los pollos, y pueden causar intoxicación alimentaria. Objetivo: El objetivo de este estudio fue revisar la literatura sobre la prevalencia de *Salmonella* spp. en pollos contaminados comercializados en diferentes estados brasileños. Material y métodos: se trata de una revisión literaria. Se analizó la frecuencia absoluta y se calculó el porcentaje total de muestras contaminadas; Se aplicó la prueba de chi-cuadrado, considerando  $p < 0.05$  estadísticamente significativo. Resultados: En la revisión de la literatura recuperó 616 publicaciones, pero solo se incluyeron 10 artículos para componer los resultados. Los estudios catalogados se realizaron en 14 estados diferentes, y se observó que de 5.030 muestras de pollo analizadas, la prevalencia promedio de muestras contaminadas con *Salmonella* fue del 7.3% ( $n=365$ ). Además, la prevalencia de muestras en diferentes estudios varió de 2.5% a 44.6%. El serotipo más prevalente fue *S. Enteritidis* (28.7%) y se observó una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de materia-prima para comercialización y el resultado del análisis microbiológico de muestras de pollo ( $p < 0.001$ ), donde los cadáveres representaron 90,1% de muestras contaminadas. Conclusión: Por lo tanto, los datos presentados en este estudio pueden usarse como un subsidio para el desarrollo de medidas apropiadas, ya sean políticas o legislativas, que permitan una mayor supervisión de los pollos de engorde comercializados en Brasil.

**Descriptor:** Salmonella; Enfermedades Transmitidas por los Alimentos; Epidemiología.

### INTRODUCTION

The poultry industry is responsible for the supply of meats and products derived from poultry, with an annual production of over 106 million tons and presenting as one of the main difficulties the control of microorganisms in their products, such as chicken meat<sup>1-3</sup>.

In the nutritional aspect, chicken meat is an excellent source of protein, B complex, vitamins and minerals. However, due to its intrinsic characteristics

such as high nutrient content, high water activity, pH near neutrality and meat storage sites, this favors the growth of microorganisms such as bacteria of the genus *Salmonella*<sup>4</sup>.

*Salmonella* genus is characterized by rod-shaped bacteria, belonging to the family Enterobacteriaceae, mobile, facultative anaerobic and non-spore-producing. In addition, these microorganisms are extremely important for public health

## Study of the antifungal activity of ibuprofen and its association with amphotericin B or ketoconazole against *Candida* spp.

Paula Mariane Silva Sousa<sup>1</sup>, Jefferson Rodrigues Nóbrega<sup>2</sup>, Laísa Vilar Cordeiro<sup>3</sup>, Francisco Patricio de Andrade Júnior<sup>4</sup>, Wylly Araújo de Oliveira<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Academic Unit of Health, Education and Health Center, Federal University of Campina Grande, 58175-000, Cuité, Paraíba, Brazil. E-mail: paullamaryanne@hotmail.com

<sup>2</sup>Academic Unit of Health, Education and Health Center, Federal University of Campina Grande, 58175-000, Cuité, Paraíba, Brazil. E-mail: jeffersonrodriguesn@hotmail.com

<sup>3</sup>PhD student of Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos at Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: laisavilar@gmail.com

<sup>4</sup>Master in Natural and Synthetic Bioactive Products at Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: juniorfarmacia.ufcg@outlook.com

<sup>5</sup>Professor PhD at Universidade Federal de Campina Grande, 58429-900, Cuité, Paraíba, Brazil. E-mail: wylly@ufcg.edu.br

Received: 9 September 2019

Revised: 5 May 2020

Accepted: 5 May 2020

### SUMMARY

The objective was evaluating the antifungal activity of ibuprofen alone and when associated with amphotericin B or ketoconazole against *Candida* species. Strains of *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* were used. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method and the association study performed through the checkerboard assay. The concentration of 512 µg/mL inhibited approximately 65% of the tested strains, while against 35% of the strains presented MIC values above 2048 µg/mL. Associations of ibuprofen with amphotericin B against *C. tropicalis* and ibuprofen with ketoconazole against *C. krusei* showed synergistic effect. Antagonistic effects were evidenced in the combination of ibuprofen with amphotericin B against *C. guilliermondii* and *C. albicans*, as well as in the association of ibuprofen with ketoconazole against *C. albicans* and *C. tropicalis*. Through the experiments, it was found that ibuprofen showed antifungal activity against most of the *Candida* species tested. The combinations of ibuprofen and antifungals had synergistic effects. However, antagonistic results were evidenced in the association with ibuprofen, which would make clinical applicability difficult. Therefore, studies of this combined activity should be investigated, considering that this association may be positive for antifungal therapy.

ORIGINAL ARTICLE

# In silico, in vitro and ex-vivo Toxicological Profiling of 5,7,4'-Trihydroxyflavone-8-C- $\beta$ -Glucopyranoside - Vitexin

Aleson Pereira de Sousa<sup>1,4</sup> \* , Maria Denise Leite Ferreira<sup>2</sup> , Diégina Araújo Fernandes<sup>2</sup> , Laísa Vilar Cordeiro<sup>2</sup> , Maria de Fátima Vanderlei de Souza<sup>1,2</sup> , Hilzeth de Luna Freire Pessoa<sup>1,2</sup> , Abrahão Alves de Oliveira Filho<sup>3</sup> , Rita de Cássia da Silveira e Sá<sup>1,4</sup> 

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

<sup>3</sup>Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

\*Corresponding author: aleson\_155@hotmail.com

## Abstract

This study aimed to evaluate the *in silico*, *in vitro*, and *ex-vivo* toxicity of vitexin, the flavonoid 5,7,4'-trihydroxyflavone-8-C- $\beta$ -glucopyranoside from *Waltheria viscosissima*. The chemical structure and predicted bioactive properties were also *in silico* analyzed. The *in vitro* and *ex-vivo* assays were performed according to the Ethics Code of the World Medical Association and were approved by the Ethics Committee of University Center of Patos (protocol number: 3.621.284). *In silico* analysis suggested that the molecule presents good oral bioavailability and good absorption; penetrating biological membranes. The toxicity tests revealed the potential effectiveness of the molecule in cellular protection against free radicals, in addition to possible antimutagenic, anticarcinogenic, antioxidant, antineoplastic, anti-inflammatory, anti-hemorrhagic and apoptosis agonist activity. Hemolytic and genotoxic assessment detected low hemolysis rates in human red blood cells and no cellular toxicity against oral mucosa cells. The data suggest that vitexin is a safe molecule for possible therapeutic application and its toxicity profile indicates viability for future studies.

**Keywords:** Hemolytic. Genotoxicity. Toxicity. *Waltheria viscosissima*.

## How to cite

Sousa AP, Ferreira MDL, Fernandes DA, Cordeiro LV, Souza MFV, Pessoa HLF, Oliveira Filho AA, Silveira e Sá RC. In silico, in vitro and ex-vivo Toxicological Profiling of 5,7,4'-Trihydroxyflavone-8-C- $\beta$ -Glucopyranoside - Vitexin. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2021;42:e709. <https://doi.org/10.4322/2179-443X.0709>

## INTRODUCTION

The development of medicines originating from naturally-derived products involves study of a wide variety of plant species, identifying their constituents (phytochemistry), and analyzing the bioactive efficacy of the isolated substances through their interactions with target molecules, to elucidate possible pharmacological mechanisms (Monks et al., 2002).

Financial support: APS, CAPES for financial support and the PhD scholarship; DAF, CAPES for financial support and the PhD scholarship; LVC, CAPES for financial support and the PhD scholarship.

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interest.

Received on October 09 2020. Accepted on December 04, 2020.



Copyright © Sousa et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Silva Neto, FM, Sobreira, ALC, Cordeiro, LV & Carmo, ES (2020). Microbiological evaluation performed in hospital aerosoltherapy equipment. *Research, Society and Development*, 9(7): 1-12, e615974473.

**Avaliação microbiológica realizada em equipamentos de aerossolterapia hospitalar**  
**Microbiological evaluation performed in hospital aerosoltherapy equipment**  
**Evaluación microbiológica realizada en equipos hospitalarios de terapia de aerosol**

Recebido: 13/05/2020 | Revisado: 13/05/2020 | Aceito: 20/05/2020 | Publicado: 28/05/2020

**Firmino Marcelino da Silva Neto**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6913-5363>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [Firmino.neto@hotmail.com](mailto:Firmino.neto@hotmail.com)

**Ana Laura de Cabral Sobreira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2091-0437>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [lauracabralas@gmail.com](mailto:lauracabralas@gmail.com)

**Laísa Vilar Cordeiro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8884-7331>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com)

**Egberto Santos Carmo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1396-4645>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [egbertosantos@ufcg.edu.br](mailto:egbertosantos@ufcg.edu.br)

**Resumo**

A investigação da contaminação microbiológica em equipamentos de uso hospitalar permite avaliar se os processos de descontaminação adotados pelo serviço de saúde são adequados e contribui para minimizar os riscos de infecções relacionadas à assistência à saúde. Com base nisso, este estudo teve como objetivo avaliar a contaminação microbiológica de nebulizadores em três serviços de saúde e fazer uma breve associação entre métodos de contaminação e reprocessamento. Dez amostras de nebulizadores (máscara e copo reservatório) foram coletadas, com swabs umedecidos em solução salina e semeado em meio de cultura seletivo

**A importância da atuação do farmacêutico na orientação e acolhimento ao paciente com HIV: será que podemos fazer a diferença?**

**The importance of pharmaceutical performance in orientation and reception to HIV patients: can we make a difference?**

**La importancia del rendimiento farmacéutico para guiar y recibir a los pacientes con VIH: ¿podemos hacer la diferencia?**

Recebido: 10/07/2020 | Revisado: 04/08/2020 | Aceito: 07/08/2020 | Publicado: 14/08/2020

**Francisco Patricio de Andrade Júnior**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0681-8439>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [juniorfarmacia.ufcg@outlook.com](mailto:juniorfarmacia.ufcg@outlook.com)

**Brenda Tamires de Medeiros Lima**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6646-9686>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [brendatamiresml@gmail.com](mailto:brendatamiresml@gmail.com)

**Thalyta Karem Ferreira Romano**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5481-0250>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [thalytakarem@outlook.com](mailto:thalytakarem@outlook.com)

**Joice Milena dos Santos Neves**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3304-4846>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [milenevesj@gmail.com](mailto:milenevesj@gmail.com)

**Amanda Dantas Pereira Gouveia**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2282-3828>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [amanda\\_dpg@hotmail.com](mailto:amanda_dpg@hotmail.com)

**Laísa Vilar Cordeiro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8884-7331>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com)

**Associação do carvacrol com ceftazidima e cefepima contra *Klebsiella pneumoniae***  
**Association of carvacrol with ceftazidime and cefepime against *Klebsiella pneumoniae***  
**Asociación de carvacrol con ceftazidima y cefepima contra *Klebsiella pneumoniae***

Recebido: 08/04/2020 | Revisado: 09/05/2020 | Aceito: 010/05/2020 | Publicado: 12/05/2020

**Laísa Vilar Cordeiro**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8884-7331>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com)

**Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6132-6248>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [pedrotrfigueiredo@gmail.com](mailto:pedrotrfigueiredo@gmail.com)

**Aleson Pereira de Sousa**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3430-477X>

E-mail: [aleson\\_155@hotmail.com](mailto:aleson_155@hotmail.com)

**Francisco Patricio de Andrade Júnior**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0681-8439>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [juniorfarmacia.ufcg@outlook.com](mailto:juniorfarmacia.ufcg@outlook.com)

**Helivaldo Diógenes da Silva Souza**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1708-4066>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [helivaldog3@gmail.com](mailto:helivaldog3@gmail.com)

**Daniel Lopes Araújo**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1625-0368>

Centro Universitário de Patos, Brasil

E-mail: [daniel124.dl718@gmail.com](mailto:daniel124.dl718@gmail.com)

**Ana Laura de Cabral Sobreira**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2091-0437>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

**Características botânicas, agronômicas, fitoquímicas e biológicas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.: Uma revisão**

**Botanical, agronomic, phytochemical and biological characteristics of *Aspidosperma pyrifolium* Mart.: A review**

**Características botánicas, agronómicas, fitoquímicas y biológicas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.: Una revisión**

Recebido: 23/04/2020 | Revisado: 24/04/2020 | Aceito: 25/04/2020 | Publicado: 26/04/2020

**Francisco Patricio de Andrade Júnior**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0681-8439>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [juniorfarmacia.ufcg@outlook.com](mailto:juniorfarmacia.ufcg@outlook.com)

**Maria das Neves Silva Neta**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0580-3385>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [neves\\_neta@hotmail.com](mailto:neves_neta@hotmail.com)

**Maria Franncielly Simões de Moraes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7850-002X>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [frannciellysimoes@gmail.com](mailto:frannciellysimoes@gmail.com)

**Laísa Vilar Cordeiro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8884-7331>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com)

**Helivaldo Diógenes da Silva Souza**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1708-4066>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [helivaldog3@gmail.com](mailto:helivaldog3@gmail.com)

**Ana Laura de Cabral Sobreira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2091-0437>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [lauracabralas@gmail.com](mailto:lauracabralas@gmail.com)

***Microsporum* spp como causador de dermatofitoses: uma revisão**

***Microsporum* spp as a cause of dermatophytosis: a review**

***Microsporum* spp como causa de dermatofitosis: una revisión**

Recebido: 24/03/2020 | Revisado: 25/03/2020 | Aceito: 31/03/2020 | Publicado: 31/03/2020

**Francisco Patricio de Andrade Júnior**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0681-8439>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [juniorfarmacia.ufcg@outlook.com](mailto:juniorfarmacia.ufcg@outlook.com)

**Helivaldo Diógenes da Silva Souza**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1708-4066>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [helivaldog3@gmail.com](mailto:helivaldog3@gmail.com)

**Laísa Vilar Cordeiro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8884-7331>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com)

**Daniele de Figueredo Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2647-2594>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [danielefigueredo31@gmail.com](mailto:danielefigueredo31@gmail.com)

**Edeltrudes de Oliveira Lima**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9547-0886>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [edelolima@yahoo.com.br](mailto:edelolima@yahoo.com.br)

**Resumo**

As dermatofitoses são infecções superficiais que caracterizam-se pelo acometimento de pele, pelo e unhas, apresentando fungos do gênero *Microsporum* como importantes causadores dessas afecções. Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre o gênero *Microsporum*, destacando-se as possíveis dermatofitoses que espécies desse gênero podem causar, assim como, características epidemiológicas,



## Profile of tuberculosis patients in Natal-RN, Brazil, from 2010 to 2018: a documentary study

Perfil de acometidos por tuberculose em Natal-RN, Brasil, entre os anos de 2010 a 2018: um estudo documental

F. P. Andrade Júnior<sup>1\*</sup>; T. W. B. Alves<sup>2</sup>; I. H. M. Aciole<sup>2</sup>; B. K. S. Farias<sup>3</sup>; L. V. Cordeiro<sup>1</sup>; E. O. Lima<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa-PB, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Campina Grande, 58175-000, Cuité-PB, Brasil

<sup>3</sup> Faculdade de Enfermagem e de Medicina Nova Esperança, 58067-695, João Pessoa-PB, Brasil.

\*juniorfarmacia.ufcg@outlook.com

(Recebido em 26 de julho de 2019; aceito em 28 de outubro de 2019)

The present study aimed to elucidate the epidemiological profile of tuberculosis patients in Natal-RN between the years 2010 and 2018. This was an epidemiological, retrospective and documentary study, in which the recovery of the secondary data occurred from the “Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS)” in Brazil. The following variables were studied: year of notification, gender, age, schooling, area of residence, ethnicity and factors that facilitate the onset of tuberculosis. Statistical association was performed using the Chi-Square test. In the year 2011, the highest percentage of notifications for tuberculosis was received (12.4%) in Natal-RN. The profile of the affected individuals was predominantly male (69.5%), between 20 and 39 years of age (43.8%), low educational levels (41.3%), mulattoes (68.2%) and urban residents (94.1%). When gender was associated with factors that facilitate the onset of tuberculosis, it was observed that males presented higher percentages of positivity for Human Immunodeficiency Virus (HIV) (16.3%), Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) (15.8%), alcoholism (34%) and smoking (13.5%), while in females the highest rates of this correlation were with Diabetes mellitus (10.4%). In addition, a statistically significant association was found between gender with tobacco and alcohol consumption (<0.001) and with the presence of diabetes and Aids (<0.001). The data found in this study may serve as an auxiliary for developing more specific public policies for those most susceptible to tuberculosis in Natal-RN. Key words: Tuberculosis, *Mycobacterium*, Epidemiology.

O presente trabalho teve como objetivo elucidar o perfil epidemiológico de acometidos por tuberculose em Natal-RN, entre os anos de 2010 a 2018. Tratou-se de um estudo epidemiológico, retrospectivo e documental, em que a recuperação dos dados secundários se deu a partir do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil. Foram estudadas as variáveis: ano de notificação, gênero, faixa etária, escolaridade, zona de residência, etnia e fatores facilitadores para o surgimento da tuberculose. A associação estatística foi realizada por meio do teste Qui-Quadrado. O ano de 2011 foi aquele em evidenciou-se o maior percentual de notificações (12,4%) para tuberculose em Natal-RN. O perfil de acometidos foi de indivíduos majoritariamente do gênero masculino (69,5%), entre 20 a 39 anos de idade (43,8%), baixa escolaridade (41,3%), pardos (68,2%) e residentes da zona urbana (94,1%). Ao associar o gênero com fatores que facilitam o desenvolvimento da tuberculose, observou-se que os homens apresentaram maiores porcentagens de positividade para o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) (16,3%), Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (15,8%), alcoolismo (34%) e tabagismo (13,5%), enquanto que no gênero feminino as maiores taxas dessa correlação foram com *Diabetes mellitus* (10,4%). Além disso, observou-se associação estatisticamente significativa entre o gênero e o consumo de tabaco e álcool (<0,001) e da presença de diabetes e SIDA (<0,001). Assim, os dados disponibilizados nesta pesquisa podem servir como subsídio para o desenvolvimento de políticas públicas mais específicas para os segmentos mais suscetíveis a tuberculose em Natal-RN.

Palavras-chave: Tuberculose, *Mycobacterium*, Epidemiologia.

## Avaliação *in silico* e *in vitro* dos flavonoides vitexina, tilirosideo e 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi: Avaliação do FPS e predição da atividade anti câncer

*In silico* and *in vitro* evaluation of vitexin, tiliroside and 5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxy flavonoids: FPS evaluation and prediction of anti cancer activity

A. P. de Sousa<sup>1\*</sup>; M. K. dos S. Nunes<sup>1</sup>; M. da S. Oliveira<sup>1</sup>; D. A. Fernandes<sup>2</sup>; M. D. L. Ferreira<sup>2</sup>; L. V. Cordeiro<sup>2</sup>; H. D. da Silva Souza<sup>3</sup>; M. de F. V. de Souza<sup>2</sup>; H. de L. F. Pessoa<sup>1</sup>; A. A. de Oliveira Filho<sup>4</sup>; R. de C. da Silveira e Sá<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa-PB, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa-PB, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Federal Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa-PB, Brasil

<sup>4</sup>Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, 58708-110, Patos-PB, Brasil

\*aleson\_155@hotmail.com

(Recebido em 03 de novembro de 2020; aceito em 15 de dezembro de 2020)

Os produtos naturais têm sido utilizados para combater os crescentes efeitos danosos causados pela exposição solar, adicionando fórmulas químicas a compostos ou substâncias naturais para potencializar o efeito protetor na pele. Através de análises *in silico* e *in vitro*, o presente estudo avaliou o efeito farmacológico contra o câncer de pele e o fator de proteção solar de três flavonoides: Hv-1 (Kaempferol-3-O-β-D- (6''-Ep-coumaril) glucopiranosídeo), Pg-1 (5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi) e Wv-1 (5,7,4'-trihidroxi-flavona-8-C-β-glucopiranosídeo), bem como seus respectivos compostos naturais (extratos etanólicos brutos – EEBs e frações diclorometano/clorofórmio – FC/FD), oriundos de processos de extração em espécies da família Malvaceae. Os resultados da análise *in silico* demonstraram que o Pg-1 possui maior probabilidade no potencial antineoplásico para o tratamento do sarcoma, do carcinoma, do melanoma e do câncer de células escamosas, enquanto o Hv-1 apresenta efeito antineoplásico no combate ao melanoma e ao câncer nas células escamosas. O Wv-1 apresentou baixa ativação antineoplásica em neoplasias do sistema tegumentar. A análise *in vitro* revelou que os compostos dos EEBsHv e FDHv, e as frações (FCWv, FDHv e FCPg) tiveram elevado fator de proteção solar (25,01<sub>FPS</sub>). O estudo das substâncias isoladas mostrou que o Wv-1 não produziu efeito protetor significativo no espectro UVB, contudo o Hv-1 e o Pg-1 apresentaram efeitos semelhantes, com alto nível de proteção (25,01<sub>FPS</sub>). Os dados indicam que os compostos analisados poderiam tornar-se alternativas terapêuticas como fitoterápicos e as moléculas isoladas, candidatas promissoras a fitofármacos com efeito fotoprotetor e atividade anticâncer no sistema tegumentar.

Palavras-chave: produtos naturais, antineoplásico, fator de proteção solar

Natural products have been used to combat the increasing damaging effects of sun exposure with the addition of chemical formulas to natural compounds or substances to enhance the protective effect on the skin. Using *in silico* and *in vitro* analyzes, the present study evaluated the pharmacological effect on the treatment of skin cancer and the solar protection factor of three flavonoids: Hv-1 (Kaempferol-3-O-β-D- (6''-Ep-coumaril) glucopyranoside), Pg-1 (5,7-dihydroxy- 3,8,4'-trimethoxy) and Wv-1 (5,7,4'-trihydroxyflavone-8-C-β-glucopyranoside) as well as their respective natural compounds (crude ethanolic extracts - CEEs and dichloromethane/chloroform fractions - DF/CF) obtained by extraction processes from species of the Malvaceae family. The results of the *in silico* analysis demonstrated that Pg-1 has greater probability in the antineoplastic potential against sarcoma, carcinoma, melanoma and squamous cell cancer, while Hv-1 exhibited an antineoplastic effect against melanoma and squamous cells cancer. Wv-1 showed low antineoplastic activation against neoplasms of the integumentary system. The *in vitro* analysis revealed that the CEEsHv and DFHv compounds and the fractions (CFWv, DFHv and CFPg) displayed high solar protection factor (25.01<sub>SPF</sub>). The analysis of the isolated substances showed that Wv-1 did not produce a significant protective effect on the UVB spectrum; however Hv-1 and Pg-1 presented similar effects with a

Faculdades Integradas de Patos  
 Curso de Medicina  
 v. 4, n. 3, jul/set 2019, p. 1242-1253.  
 ISSN: 2448-1394



Journal of Medicine  
 and Health Promotion

## PRESEÇA DE *ASPERGILLUS* EM HOSPITAIS BRASILEIROS: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

*PRESENCE OF ASPERGILLUS IN BRAZILIAN HOSPITALS: AN INTEGRATIVE REVIEW*

Francisco Patricio de Andrade Júnior

Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil

[juniorfarmacia.ufcg@outlook.com](mailto:juniorfarmacia.ufcg@outlook.com)

Vanessa Santos de Arruda Barbosa

Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Cuité – Paraíba – Brasil

[vanessabarbosa@ufcg.edu.br](mailto:vanessabarbosa@ufcg.edu.br)

Laísa Vilar Cordeiro

Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil

[laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com)

Cássio Ilan Soares Medeiros

Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil

[cassioism@hotmail.com](mailto:cassioism@hotmail.com)

Abrahão Alves de Oliveira Filho

Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba – Brasil

[abrahao.farm@gmail.com](mailto:abrahao.farm@gmail.com)

### RESUMO

**Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura acerca de fungos do gênero *Aspergillus* em hospitais brasileiros. **Métodos:** Tratou-se de um estudo de revisão do tipo integrativa realizada nas bases de dados Lilacs e Scielo, em que utilizou-se os softwares *Microsoft Excel 2010* e *Statistical Package for Social Sciences (SPSS)* versão 13.0, para a construção de gráficos e tabelas e análise de número absoluto, frequência relativa e associação estatística. **Resultados:** Houve a recuperação de 707 publicações, porém somente 7 artigos foram incluídos para compor os resultados. Nos diferentes hospitais brasileiros, notou-se que a prevalência para espécies de fungos do gênero *Aspergillus* variou entre 3,2% a 57,9% das amostras contaminadas por fungos. Assim, ao total observou-se que, das 906 amostras de fungos encontradas em diferentes habitats 23,5% eram *Aspergillus*. Detectou-se a presença de *Aspergillus* na água (4,7%), objetos (28,6%) e ar (66,7%), sendo *Aspergillus niger* (16,9%), *A. fumigatus* (9,4%) e *A. flavus* (6,5%) as principais espécies observadas. Houve significância estatística entre a presença de fungos e as fontes nas quais foram detectados ( $p < 0,001$ ). **Conclusões:** A alta prevalência de fungos do gênero *Aspergillus* serve como alerta para a necessidade do desenvolvimento de políticas públicas que permitam diminuir a presença desses patógenos em ambiente hospitalar.

**Palavras-Chave:** *Aspergillus*. Infecção hospitalar. Epidemiologia.

Centro Universitário de Patos - UNIFIP  
 Curso de Medicina  
 v. 5, n. 2, abr/jun 2020, p. 13-19.  
 ISSN: 2448-1394



## USO DE GRISEOFULVINA FRENTE A FUNGOS DO GÊNERO *Microsporium*

*USE OF GRISEOFULVINE AGAINST FUNGI OF THE GENDER Microsporium*

Francisco Patricio de Andrade Júnior  
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba - Brasil  
[juniorfarmacia.ufcg@outlook.com](mailto:juniorfarmacia.ufcg@outlook.com)

Láisa Vilar Codeiro  
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba - Brasil  
[laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com)

Edeltrudes de Oliveira Lima  
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba - Brasil  
[edelolima@yahoo.com.br](mailto:edelolima@yahoo.com.br)

### RESUMO

**Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo, elucidar o grau de sensibilidade de isolados clínicos e adquiridos comercialmente de cepas de *M. canis* e *M. gypseum*.

**Métodos:** Para avaliar o grau de sensibilidade das cepas analisadas, utilizou-se o método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio de microdiluição seriada, na razão 1:2.

**Resultados:** Das 15 cepas estudadas, observou-se que todas se apresentaram resistentes a griseofulvina, uma vez que, verificou-se CIM superior a 3 µg/mL para todos os micro-organismos investigados.

**Conclusões:** Os resultados expostos nesta pesquisa servem como fonte de alerta para a necessidade da busca de novas moléculas com atividade anti-*Microsporium*.

**Palavras-Chave:** Farmacologia. Antimicrobianos. Dermatofitos.

### ABSTRACT

**Objective:** The present study aimed to elucidate the degree of sensitivity of clinical isolates and commercially acquired strains of *M. canis* and *M. gypseum*.

**Methods:** To assess the degree of sensitivity of the strains analyzed, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method was used by means of serial microdilution, in the ratio 1: 2.

**Results:** Of the 15 strains studied, it was observed that all were resistant to griseofulvin, since MIC was found to be greater than 3 µg / mL for all investigated microorganisms.

**Conclusions:** The results exposed in this research serve as an alert for the need to search for new molecules with anti-*Microsporium* activity.

**Keywords:** Pharmacology. Antimicrobials. Dermatophytes.

Centro Universitário de Patos - UNIFIP  
Curso de Medicina  
v. 1, n. 1, jan/mar 2020, p. 01-13.  
ISSN: 2448-1394



## INCIDÊNCIA DE ANEMIA FERROPRIVA EM MULHERES NO PERÍODO GESTACIONAL

*INCIDENCE OF IRON DEFICIENCY ANEMIA IN WOMEN IN THE GESTATIONAL PERIOD*

Patrícia Pereira de Araújo  
Centro Universitário de Patos - UNIFIP - Patos - Paraíba - Brasil  
[pathyheloise87@gmail.com](mailto:pathyheloise87@gmail.com)

Laísa Vilar Cordeiro  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB - João Pessoa - Paraíba - Brasil  
[laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com)

Vanessa Morais Muniz  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB - João Pessoa - Paraíba - Brasil  
[nessammuniz@hotmail.com](mailto:nessammuniz@hotmail.com)

Aleson Pereira de Sousa  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB - João Pessoa - Paraíba - Brasil  
[aleson\\_155@hotmail.com](mailto:aleson_155@hotmail.com)

Abrahão Alves de Oliveira Filho  
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG - Patos - Paraíba - Brasil  
[abrahao.farm@gmail.com](mailto:abrahao.farm@gmail.com)

### RESUMO

**Objetivo:** o presente estudo analisou a recente literatura reunindo informações sobre a incidência da anemia ferropriva no período gestacional e seu significado clínico para gestante e feto.

**Método:** trata-se de uma revisão narrativa da literatura realizada no ano de 2019. Para a sua produção, foram consultadas as bases de dados: Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Publicações Médicas (PubMed), Medline e biblioteca virtual Scientific Electronic Library online (SCIELO), foram utilizados os Descritores em Ciência da Saúde (DECS): *anemia, deficiência de ferro e gestação*.

**Resultados:** O hemograma é sensível para diagnóstico da anemia microcítica, mas outros fatores endógenos e exógenos podem contribuir para resultados com precisão. Fatores endógenos como idade, sexo, jejum, efeitos de exercício físico, ritmo cardíaco, altitude, estilo de vida e gravidez. Na gestação, ocorre um aumento do volume plasmático médio que leva à hemodiluição. Também ocorre a diminuição dos níveis de ferro e ferritina.

**Conclusão:** Durante o período gestacional deve-se acompanhar os níveis eritrocitários, ferro e ferritina do corpo das mães para que não haja carência nutricional para o feto, desenvolvendo uma gestação plena irá diminuir por consequência a anemia infantil.

**Palavras-chaves:** Anemia. Deficiência de Ferro. Gestação.

Centro Universitário de Patos - UNIFIP  
 Curso de Medicina  
 v. 4, n. 4, out/dez 2019, p. 1351-1363.  
 ISSN: 2448-1394



## **INTERFERÊNCIA NO CONSUMO DE BEBIDA ALCOÓLICA NO DIAGNÓSTICO DE ANEMIAS: REVISÃO DE LITERATURA**

*INTERFERENCE ON ALCOHOLIC DRINK CONSUMPTION IN ANEMIA DIAGNOSIS: REVIEW*

Niedja Alves de Araújo  
 Centro Universitário de Patos - UNIFIP – Patos – Paraíba – Brasil  
[niedjaalves1989@yahoo.com.br](mailto:niedjaalves1989@yahoo.com.br)

Laísa Vilar Cordeiro  
 Universidade Federal da Paraíba - UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil  
[laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com)

Vanessa Morais Muniz  
 Universidade Federal da Paraíba - UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil  
[nessammuniz@hotmail.com](mailto:nessammuniz@hotmail.com)

Aleson Pereira de Sousa  
 Universidade Federal da Paraíba - UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil  
[aleson\\_155@hotmail.com](mailto:aleson_155@hotmail.com)

Abrahão Alves de Oliveira Filho  
 Universidade Federal de Campina Grande - UFCG – Patos – Paraíba – Brasil  
[abrahao.farm@gmail.com](mailto:abrahao.farm@gmail.com)

### **RESUMO:**

**Objetivo:** o presente estudo analisou a recente literatura reunindo informações sobre a interferência do consumo de bebidas alcoólicas no diagnóstico de anemias e seu significado clínico.

**Método:** trata-se de uma revisão narrativa da literatura realizada no ano de 2019. Para a sua produção, foram consultadas as bases de dados: Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Publicações Médicas (PubMed), Medline e biblioteca virtual Scientific Electronic Library online (SCIELO), foram utilizados os Descritores em Ciência da Saúde (DECS): *anemia, interferentes no hemograma e alcoolismo*.

**Resultados:** A interferência de fatores externos como: alimentação, medicação, processos patológicos, uso de substâncias tóxicas e principalmente bebidas alcoólicas, irão provocar hepatotoxicidade sobre os hepatócitos, haverá déficit de produção de novos eritrócitos e os de nível sistêmico ficaram por mais tempo em circulação, aumentando de tamanho e perdendo sua hemoglobina e capacidade total/eficaz de transporte. A anemia de etiologia alcoólica pode estar, ou não, associada a doença hepática, sendo que a sintomatologia relacionada com o alcoolismo ou hepatopatias é mais evidente do que a sintomatologia associada à anemia.

**Conclusão:** O hemograma é o exame sensível para diagnóstico da anemia, mas as bebidas alcoólicas podem ocasionar um falso-positivo para anemia macrocítica, uma vez que essa substância altera o funcionamento normal dos hepatócitos e sequestro elementos necessários no metabolismo e maturação eritrocitária. Para fim de diagnóstico

Centro Universitário de Patos - UNIFIP  
 Curso de Medicina  
 v. 4, n. 4, out/dez 2019, p. 1254-1266.  
 ISSN: 2448-1394



## ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA VAGINAL NA GESTAÇÃO E SEU SIGNIFICADO CLÍNICO: REVISÃO DE LITERATURA

*VAGINAL MICROBIOTA CHANGES IN PREGNANCY AND ITS CLINICAL MEANING: REVIEW*

Aleson Pereira de Sousa  
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB - João Pessoa – Paraíba – Brasil  
[aleson\\_155@hotmail.com](mailto:aleson_155@hotmail.com)

Daniele Barbosa de Medeiros  
 Centro Universitário de Patos –UNIFIP - Patos – Paraíba – Brasil  
[dhany\\_BHI@hotmail.com](mailto:dhany_BHI@hotmail.com)

Laísa Vilar Cordeiro  
 Universidade Federal da Paraíba –UFPB - João Pessoa – Paraíba – Brasil  
[laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com)

Vanessa Morais Muniz  
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB - João Pessoa – Paraíba – Brasil  
[nessammuniz@hotmail.com](mailto:nessammuniz@hotmail.com)

Abrahão Alves de Oliveira Filho  
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG - Patos – Paraíba – Brasil  
[abrahao.farm@gmail.com](mailto:abrahao.farm@gmail.com)

### RESUMO

**Objetivo:** o presente estudo analisou a recente literatura reunindo informações que possam contribuir para o conhecimento sobre as alterações da microbiota vaginal na gestação e seu significado clínico.

**Método:** trata-se de uma revisão narrativa da literatura realizada no ano de 2019. Para a sua produção, foram consultadas as bases de dados: Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Publicações Médicas (PubMed), Medline e biblioteca virtual Scientific Electronic Library online (SCIELO), foram utilizados os Descritores em Ciência da Saúde (DECS): *microbiota vaginal, vaginose, vaginite e gestação*.

**Resultados:** as mulheres e principalmente gestantes acometidas por vaginoses e vaginite devem seguir o tratamento até o estabelecimento da sua cura. Este acompanhamento deve avaliar aspectos clínicos e microbiológicos, a microbiota residente deve se recompor em 30 dias. Portanto, a avaliação da sintomatologia, pH vaginal, teste das aminas (Whiff), teste do KOH, e da recolonização do epitélio vaginal pelos *Lactobacillus* (exame bacterioscópico). Mas o exame de cultura de secreção vaginal continua sendo o mais sensível para diagnóstico das alterações em microbiota vaginal, este nos permite evidenciar o tipo de micro-organismo invasor, seu grau de crescimento e potencial efeito contra antibióticos pré-estabelecidos no combate ao seu desenvolvimento patológico.

**Conclusão:** durante o período gestacional deve-se acompanhar a mulher e suas mudanças fisiológicas ao longo do desenvolvimento do feto, episódios de vaginose

### A importância do Pré-Natal na gestante com infecção urinária

Adriana de Siqueira Leite Batista <sup>1</sup>  
 Francielly Negreiros de Araújo <sup>2</sup>  
 Vanessa de Melo Cavalcanti Dantas <sup>3</sup>  
 Laísa Vilar Cordeiro <sup>4</sup>  
 Cristina Costa Melquíades Barreto <sup>5</sup>  
 Aleson Pereira de Sousa <sup>6</sup>

**RESUMO: Introdução:** O Pré-Natal deve ser compreendido como a realização de atos preventivos em seu mais alto grau e na sua mais pura definição, cujo principal objetivo é assegurar da melhor maneira possível uma gestação isenta de complicações e o nascimento de um bebê saudável. **Objetivos:** Este estudo objetivou analisar a interferência do pré-natal na assistência da gestante com infecção urinária. **Métodos:** Realizou-se através de um estudo exploratório, descritivo com abordagem quantitativa, realizado no período de outubro de 2009, na Unidade de Saúde da Família Maria Marques, na cidade de Patos, onde a coleta de dados foi feita mediante um roteiro de entrevista. A amostra por sua vez, foi constituída por 06 gestantes maiores de 18 anos, que estavam com infecção urinária e que aceitaram participar da pesquisa. **Resultados e Discussão:** Os resultados demonstraram que (50%) das gestantes pertenciam à faixa etária de 18 a 20 anos, (50%) das gestantes tinham o ensino fundamental incompleto, (100%) eram donas de casa, (66,40%) achavam que o fato de estarem realizando o pré-natal influenciou para o tratamento de infecção urinária, (100%) das gestantes avaliaram como muito importante o pré-natal para o tratamento da infecção, (66,40%) das gestantes tinham não conhecimento sobre o que é infecção urinária e como ela se desenvolve, (100%) das gestantes realizaram exames para detectar a infecção urinária, (83,40%) receberam orientações e tratamento para infecção urinária, (66,40%) das gestantes não colocaram em prática as orientações e cuidados recomendados para infecção urinária. **Considerações Finais:** A partir dos resultados pôde-se observar que as gestantes não têm o conhecimento do que é infecção urinária, como ela se desenvolve, porém sabem da importância que o pré-natal tem durante a gestação. Este estudo foi fundamental para sabermos o quanto o pré-natal é importante para a detecção de patologias como infecção urinária, e que a interferência deste pode gerar consequências para a saúde materno-fetal.

**Palavras-chaves:** Gestante; Infecção urinária; Pré-Natal.

**ABSTRACT: Introduction:** Prenatal care should be understood as performing preventive acts to the highest degree and in their purest definition, the main purpose of which is to ensure the best possible complication-free pregnancy and the birth of a healthy baby. **Aims:** This study aimed to analyze the interference of prenatal care in pregnant women with urinary tract infection. **Methods:** This was an exploratory, descriptive study with a quantitative approach, conducted in October 2009, at the Maria Marques Family Health Unit, in the city of Patos, where data collection was done through an interview script. The sample, in turn, consisted of 06 pregnant women over 18 years, who had urinary tract infection and agreed to participate in the research. **Results and Discussion:** The results showed that (50%) of the pregnant women belonged to the age group of 18 to 20 years, (50%) of the pregnant women had incomplete elementary school, (100%) were housewives, (66.40% ) felt that the fact that they were undergoing prenatal care influenced the treatment of urinary infection, (100%) of the pregnant women considered prenatal care very important for the treatment of the infection, (66.40%) of the pregnant women had no knowledge about what is urinary tract infection and how it develops, (100%) of pregnant women performed tests to detect urinary infection, (83.40%) received guidance and treatment for urinary infection, (66.40%) of pregnant women implemented the recommended urinary infection guidelines and

## O cuidado da enfermagem na assistência aos pacientes com epilepsia

Maria Dannyle Andrade da Silva<sup>1</sup>

Pierre Andrade Pereira de Oliveira<sup>2</sup>

Francielly Negreiros de Araújo<sup>3</sup>

Laísa Vilar Cordeiro<sup>4</sup>

Vanessa de Melo Cavalcanti Dantas<sup>5</sup>

Aleson Pereira de Sousa<sup>6</sup>

**RESUMO: Introdução:** A epilepsia é um distúrbio cerebral crônico muito comum, caracterizado por manifestações recorrentes, entre elas as convulsões. No cuidado empreendido pela enfermagem para a pessoa com epilepsia, os esforços mais valiosos são aqueles para modificar as atividades do paciente e da família no sentido da própria doença. **Objetivo:** Assim, este estudo teve por objetivo investigar a assistência de enfermagem voltada aos portadores de epilepsia no centro de apoio psicossocial (CAPS) de um município do sertão paraibano, de caráter exploratório descritivo, com abordagem quantitativa. **Método:** A amostra composta de 10 pacientes com epilepsia, cadastrados na referida central, onde se realizou a pesquisa por meio de um questionário de múltipla escolha estruturado, foi coletado dados por meio de entrevista. **Resultados e Discussão:** Com isso, os resultados apontaram que prevalece o gênero feminino na incidência da doença, em sua maioria (50% dos casos), os epiléticos percebem quando irá ocorrer uma crise e a alteração mais comum pós-crise são os distúrbios do sono. Estas crises costumam durar, em 60% das ocorrências, um tempo maior que 60 segundos. A atenção de enfermagem tem sido regular, boa ou ótima, satisfazendo o usuário, contudo estes reconhecem a necessidade de mais atenção durante as consultas. **Considerações Finais:** Mediante esses dados, vê-se que ninguém melhor do que a enfermagem para falar das necessidades e auxiliar o epilético a compreender este problema. Para isso, devem fornecer informações valiosas para refletir sobre a qualidade da assistência que vem sendo dispensada a eles.

**Palavras-chaves:** Assistência de enfermagem; Epilepsia; Portadores;

**ABSTRACT: Introduction:** Epilepsy is a very common chronic brain disorder characterized by recurrent manifestations, including seizures. In nursing care for the person with epilepsy, the most valuable efforts are those to modify the activities of the patient and family towards the disease itself. **Aims:** Thus, this study aimed to investigate nursing care aimed at people with epilepsy in the psychosocial support center (CAPS) of a descriptive exploratory municipality of the Paraíba hinterland, with a quantitative approach. **Method:** The sample composed of 10 patients with epilepsy, registered at the referred center, where the research was conducted through a structured multiple-choice questionnaire, was collected through interviews. **Results and Discussion:** Thus, the results indicated that the female gender prevails in the incidence of the disease, mostly (50% of cases), epileptics realize when a seizure will occur and the most common post-seizure disorder is sleep disorders. These crises usually last, in 60% of the occurrences, a time greater than 60 seconds. Nursing attention has been regular, good or excellent, satisfying the user, however they recognize the need for more attention during consultations. **Final Considerations:** From these data, it is seen that no one better than nursing to talk about the needs and help the epileptic to understand this problem. To do so, they must provide valuable information to reflect on the quality of care being provided to them.

**Keywords:** Nursing care; Epilepsy; Bearers;

## Acidentes Perfurocortantes na Odontologia: Revisão de Literatura

Nayara Kelly Almeida Gomes<sup>1</sup>  
Rodrigo Felipe de Souza Bastos<sup>2</sup>  
Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo<sup>3</sup>  
Laísa Vilar Cordeiro<sup>4</sup>  
Aleson Pereira de Sousa<sup>5</sup>

**RESUMO: Introdução:** Procedimentos realizados em locais que prestam assistência à saúde expõem os profissionais a acidentes de trabalho. Servidores como dentistas, técnicos e auxiliares em saúde bucal estão expostos principalmente a acidentes causados por materiais perfurocortantes e fluidos biológicos. **Objetivo:** Analisar a recente literatura publicada através de periódicos disponíveis nos sites da Lilacs, Scielo e Pubmed, reunindo informações no intuito de fornecer elementos que possam contribuir para o conhecimento científico sobre acidentes perfurocortantes na odontologia. Abordando os fatores de risco associados aos acidentes perfurocortantes, além da biossegurança e a prevenção dos acidentes e a notificação dos acidentes no ambiente de trabalho. **Métodos:** Os dados descritos neste estudo foram oriundos artigos científicos publicados nas bases de dados: Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Scientific Eletronic Library Online (SCIELO) e National Library of Medicine (PUBMED). **Resultados e Discussão:** No consultório odontológico encontramos uma variedade de instrumentos cortantes que com facilidade podem lacerar ou perfurar a pele. Dentre eles podemos citar agulhas, bisturi, exploradores, materiais de periodontia, brocas e instrumentos de endodontia. Os trabalhadores devem seguir algumas orientações para evitar acidentes perfurocortantes, tais como: o descarte imediato de agulhas e instrumentos afiados, evitar o contato dos dedos com instrumentos rotatórios, não reencapar agulhas e para a lavagem dos instrumentais utilizar luvas de jardinagem. Como também utilizar o EPI e manter a caderneta de vacinação atualizada. **Considerações Finais:** Sendo bastante prevalente entre os profissionais da área da saúde, os acidentes perfurocortantes, requerem um olhar mais atencioso, já que podem afetar a saúde física e mental do trabalhador, o qual deste modo, terá também o exercício de sua profissão afetado significativamente. Assim, torna-se necessário o permanente incentivo à educação continuada, a construção de ambientes de trabalho que sejam adequados e seguros para os trabalhadores e pacientes.

**Palavras-chaves:** Odontologia. Saúde bucal. Acidentes.

**ABSTRACT: Introduction:** Procedures performed in health care settings expose professionals to occupational accidents. Servers such as dentists, dental technicians and dental assistants are mainly exposed to accidents caused by sharps and biological fluids. **Aims:** To analyze the recent literature published through journals available on the Lilacs, Scielo and Pubmed websites, gathering information in order to provide elements that can contribute to the scientific knowledge about sharps injuries in dentistry. Addressing the risk factors associated with sharps injuries, biosecurity and accident prevention and notification of accidents in the workplace. **Methods:** The data described in this study came from scientific articles published in the databases: Latin American and Caribbean Health Sciences Literature (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SCIELO) and National Library of Medicine (PUBMED). **Results and Discussions:** In the dental office we find a variety of sharp instruments that can easily tear or puncture the skin. These include needles, scalpels, explorers, periodontal materials, drills and endodontic instruments. Workers should follow

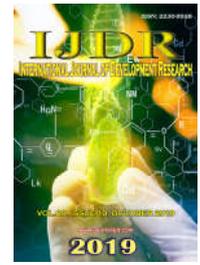
## A prática sexual e fatores associados à sua disfunção em indivíduos acometidos por lesão medular

Willy Silva de Araújo Medeiros<sup>1</sup>  
 Maria José de Medeiros<sup>2</sup>  
 Murillo Marinho Costa<sup>3</sup>  
 Ana Renata da Silva Rodrigues<sup>4</sup>  
 Laísa Vilar Cordeiro<sup>5</sup>  
 Aleson Pereira de Sousa<sup>6</sup>

**RESUMO: Introdução:** A Lesão Medular (LM), pode ser definida como uma afecção neurológica que gera uma interrupção parcial ou total do sistema neurológico através da medula que resulta em alterações motoras, sensitivas e neurovegetativas abaixo do nível da lesão, comprometendo a sensibilidade superficial e profunda, a motricidade e as funções autonômicas desses indivíduos. **Objetivo:** Relacionar a prática sexual com os fatores que influenciam na satisfação sexual de pessoas acometidas por lesão medular. **Método:** Trata-se de uma pesquisa de campo de natureza descritiva, que envolve abordagem qualitativa, desenvolvida nas Salas de Avaliação, situado na Clínica Escola de Fisioterapia, do curso de Fisioterapia de uma faculdade particular de Patos-PB. Para a sua produção, foi realizado questionários com participantes contendo questões de múltipla escolha sobre o tema em discussão no trabalho, os dados foram quantificados e tabulados para apresentar a resposta do grupo as questões propostas. **Resultados e Discussão:** Foi aplicado um questionário sociodemográfico e clínico com o objetivo de relacionar a prática sexual com os fatores que influenciam na satisfação sexual de pessoas acometidas por lesão medular. Prevaleram na amostra, homens (100%), pardos (54,5%), com baixa escolaridade (36,4%) e renda mínima de um salário mínimo (90,9%). O tipo de LM predominante foi incompleta, bem como o nível neurológico sensório-motor que prevaleceu no segmento medular acima de L2. **Considerações Finais:** Por meio deste estudo foi possível notar a importância de ferramentas práticas de avaliação neurofisiológica, que permite classificar o paciente de acordo com os achados encontrados na avaliação, permitindo conhecer e compreender suas potencialidades e incapacidades nessa perspectiva. No entanto é preciso entender que tanto a atividade sexual quanto a expressão da sexualidade é uma temática pouco abordada pelos terapeutas e profissionais da saúde.

**Palavras-chaves:** Prática Sexual; Disfunções Sexuais; Lesão Medular.

**ABSTRACT: Introduction:** Spinal cord injury (LM) can be defined as a neurological disorder that generates a partial or total interruption of the neurological system through the medulla that results in motor, sensory and neurovegetative alterations below the level of the lesion, compromising the Superficial and profound sensitivity, motricity and autonomic functions of these individuals. **Aims:** To relate the sexual practice with the factors that influence the sexual satisfaction of people affected by spinal cord injury. **Method:** This is a descriptive field research, which involves a qualitative approach, developed in the Evaluation Rooms, located in the Clinical School of Physiotherapy, of the Physiotherapy course of a private college in Patos-PB. For its production, questionnaires were conducted with participants containing multiple choice questions on the topic under discussion at work, data were quantified and tabulated to present the group's answer to the proposed questions. **Results and Discussion:** A socio-demographic and clinical questionnaire was applied in order to relate the sexual practice with the factors influencing the sexual satisfaction of people affected by spinal cord injury. They prevailed in the sample, men (100%), Brown (54.5%), with low schooling (36.4%) and minimum income of one minimum wage (90.9%). The predominant LM type was incomplete, as



## RESEARCH ARTICLE

## OPEN ACCESS

## ISOEUGENOL EFFICACY AGAINST *Staphylococcus aureus*

<sup>1</sup>Lyvia Layanne Silva Rosa, <sup>2</sup>José Lucas Ferreira Marques Galvão, <sup>1</sup>Hermes Diniz Neto, <sup>2</sup>Jefferson Rodrigues Nóbrega, <sup>1</sup>Daniele de Figuerêdo Silva, <sup>2</sup>Francisco Patricio de Andrade Júnior, <sup>1</sup>Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo, <sup>1</sup>Shellygton Lima Silva, \*<sup>1</sup>Láisa Vilar Cordeiro, <sup>3</sup>Abrahão Alves de Oliveira Filho and <sup>4</sup>Edeltrudes de Oliveira Lima

<sup>1</sup>PhD student of Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

<sup>2</sup>Master's Degree student of Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

<sup>3</sup>Professor PhD at Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

<sup>4</sup>Professor PhD at Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

## ARTICLE INFO

**Article History:**

Received 17<sup>th</sup> July, 2019

Received in revised form

21<sup>st</sup> August, 2019

Accepted 03<sup>rd</sup> September, 2019

Published online 30<sup>th</sup> October, 2019

**Key Words:**

*Staphylococcus aureus*,  
 Medicinal plants, Gentamicin.

## ABSTRACT

**Background:** *Staphylococcus aureus* is a Gram-positive bacterium responsible for the development of infections of varying degrees of complexity. In addition, due to resistance phenomena, treatment against this pathogen has become increasingly ineffective, making it necessary to search for new molecules with antibacterial activity. **Objective:** The present study aims to evaluate isoeugenol antibacterial activity against clinical strains of *Staphylococcus aureus* through in vitro assays. **Methodology:** It was held Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), Time-kill curve and checkerboard association of isoeugenol with standard antibiotic (gentamicin). **Results:** Isoeugenol presented 512 µg/mL MIC, > 4096 µg / mL in the MBC assay and demonstrated non-concentration-dependent bacteriostatic activity. The substance had synergistic and additive results when associated with gentamicin. **Conclusion:** Isoeugenol is an interesting alternative to be better understood, and further studies are needed to better investigate its mechanism of antibacterial action.

**Copyright** © 2019, Lyvia Layanne Silva Rosa et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Citation:** Lyvia Layanne Silva Rosa, José Lucas Ferreira Marques Galvão, Hermes Diniz Neto, et al. 2019. "Isoeugenol efficacy against *Staphylococcus aureus*", *International Journal of Development Research*, 09, (10), 30877-30879.

## INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* is an important human pathogen and causes community and hospital infections. In addition, several resistance phenomena have been associated with this pathogen, making it necessary to search for new drugs with antibacterial activity (MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017). Among the drug candidates, it is possible to highlight the phenylpropanoid isoeugenol, which has shown antimicrobial activity against several pathogens (HYLDGAARD *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017). However, there are only few studies on the microbicide role of this phytoconstituent against *S. aureus*. Thus, the present study aimed to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of isoeugenol against clinical strains of *S. aureus*.

## MATERIAL AND METHODS

**Cultures:** This work investigated the antibacterial activity of isoeugenol against 15 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* obtained from different anatomical sites, as reported in Table 1. All strains were isolated and kindly provided by Darci de Magalhães Melo, Pharmacist at the Laboratory of Clinical Pathology "HEMATO", located in João Pessoa-PB/Brazil. The cultures belong to the MICOTECA collection of the "Research Laboratory of Antibacterial and Antifungal Activity of Natural and Synthetic Bioactive Products/ Universidade Federal da Paraíba". As control, one standard strains was used: ATCC-13150. The cultures were maintained at 4°C in Nutrient Agar (NA) (DIFCO Laboratories/ USA /France). For use in the tests, these cultures were reactivated on Brain Heart Infusion (BHI) agar (DIFCO Laboratories / USA / France) for 24 hours

\*Corresponding author: Láisa Vilar Cordeiro,  
 PhD student of Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos



CODEN [USA]: IAJPB

ISSN: 2349-7750

## INDO AMERICAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

<http://doi.org/10.5281/zenodo.3497438>

Available online at: <http://www.iajps.com>

Research Article

### INVESTIGATION OF THE ACTIVITY AND MECHANISM OF ACTION OF CARVACROL AGAINST RHODOTORULA RUBRA

Jefferson Nóbrega<sup>1</sup>, Paula Sousa<sup>2</sup>, Kelly Mota<sup>3</sup>, Laísa Cordeiro<sup>4\*</sup>, Francisco Andrade Júnior<sup>5</sup>, Wylly Oliveira<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, Paraíba, 58175-000, Brazil, [jeffersonrodriguesn@hotmail.com](mailto:jeffersonrodriguesn@hotmail.com) and +55 (83) 998023932., <sup>2</sup>Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, Paraíba, 58175-000, Brazil, [paullamaryanne@hotmail.com](mailto:paullamaryanne@hotmail.com) and +55 (83) 999087741, <sup>3</sup>Escola Multicampi de Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Caicó, Rio Grande do Norte, 59300000, Brazil, [kellylira@gmail.com](mailto:kellylira@gmail.com) and +55 (83) 98787-7129, <sup>4</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58033-455, Brazil, [laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com) and +55 (83) 998040825., <sup>5</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58033-455, Brazil, [juniorfarmacia.ufcg@outlook.com](mailto:juniorfarmacia.ufcg@outlook.com) and +55 (84) 981357242, <sup>6</sup>Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, Paraíba, 58175-000, Brazil, [wylly@ufcg.edu.br](mailto:wylly@ufcg.edu.br) and +55 (83) 991039024.

**Article Received:** August 2019

**Accepted:** September 2019

**Published:** October 2019

**Abstract:**

*The genus Rhodotorula is considered saprophytes. However, in recent decades they have been emerging with the ability to colonize and infect susceptible patients. Most cases of Rhodotorula infections are fungemia associated to catheters, endocarditis, cancer, acquired immunodeficiency syndrome, meningitis, and pleural tuberculosis. With increasing fungal resistance and the reduced spectrum of antifungal drugs available for clinical use, it is important that new alternatives be sought. In the context of this search for new drugs, carvacrol emerges as an option of natural origin, which has a wide range of biological activities. Thus, this study aimed to evaluate the antifungal activity of carvacrol against Rhodotorula rubra and to investigate the mode of action of this phytoconstituent. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by the broth microdilution method and the mechanism of action on the membrane and on the cell wall of the microorganism was evaluated by the addition of ergosterol and sorbitol to the culture medium, respectively, with subsequent verification of carvacrol MIC in the presence of these two substances. Carvacrol showed significant antifungal activity, and the concentration of 128 µg/mL inhibited the growth of all strains, while 64 µg/mL inhibited half of them. The results suggest that the mechanism of action of carvacrol occurs through binding to ergosterol present in the cell membrane and not by modifying the cell wall of the microorganism. Further studies are needed for further clarification and, thus, allow possible use of carvacrol against R. rubra.*

**Key-words:** Rhodotorula rubra; carvacrol; ergosterol, sorbitol, monoterpene.

**Corresponding author:**

**Laísa Cordeiro,**

Departamento de Ciências Farmacêuticas,

Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58033-455, Brazil,

[laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com) and +55 (83) 998040825.

QR code



Please cite this article in press Jefferson Nobrega et al., *Investigation of the Activity and Mechanism of Action of Carvacrol against Rhodotorula Rubra.*, Indo Am. J. P. Sci, 2019; 06(10).

## Potencial bioativo dos flavonoides vitexina, tilirosídeo e 5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi no tratamento de doenças crônicas e neoplasias do sistema gastrointestinal e excretor

*Properties of the flavonoids vitexin, tiliroside and 5,7-dihydroxy-3,8,4' trimethoxy in the treatment of chronic diseases and neoplasia of the gastrointestinal and excretory systems*

*Propiedades de los flavonoides vitexina, tilirosídeo y 5,7-dihidroxi-3,8,4' trimetoxi en el tratamiento de enfermedades crónicas y neoplasias de los sistemas gastrointestinal y excretorio*

Aleson Pereira de **SOUSA**<sup>1</sup>  
Diégina Araújo **FERNANDES**<sup>2</sup>  
Maria Denise Leite **FERREIRA**<sup>2</sup>  
Láisa Vilar **CORDEIRO**<sup>2</sup>  
Helivaldo Diógenes da Silva **SOUZA**<sup>2</sup>  
Maria de Fátima Vanderlei de **SOUZA**<sup>2</sup>  
Hilzeth de Luna Freire **PESSOA**<sup>2</sup>  
Abrahão Alves de **OLIVEIRA FILHO**<sup>3</sup>  
Rita de Cássia da Silveira e **SA**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba (DITM/UFPB) 58051-970 - João Pessoa - PB, Brasil

<sup>2</sup>Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58033-455, João Pessoa-PB, Brasil

<sup>3</sup>Professor Doutor, Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande - UFCG 58428-830 Campina Grande - PB, Brasil

### Resumo

As doenças crônicas representam o principal grupo de doenças com elevados índices de mortalidade. Dessa forma, a utilização de plantas medicinais por adultos no tratamento de enfermidades ou amenização de seus sintomas é uma prática alternativa que vem sendo adotada mundialmente. O avanço científico e a modernização contribuem substancialmente para descoberta de substâncias naturais para produção de novos fármacos, com uma grande possibilidade de terem menor grau de toxicidade. Algumas dessas plantas são ricas em moléculas dotadas de potencial biotecnológico, como os flavonoides. O presente estudo avaliou o perfil bioativo *in silico* de três flavonoides: tilirosídeo (Kaempferol-3-O-β-D-(6"-Ep-coumaril) glucopiranosídeo), Pg-1 (5,7-dihidroxi-3,8,4'-trimetoxi) e vitexina (5,7,4'-trihidroxiflavona-8-C-β-glucopiranosídeo). Foi abordada a ação preditiva antineoplásica em órgãos do sistema gastrointestinal e urinário e a atividade protetora contra doenças crônicas (diabetes, hipertensão, catarata, osteoporose, hipercolesterolemia, disfunção de tireoide e doenças renais). O estudo demonstrou que a vitexina apresentou efeito antidiabetes (tipo II) e antihipercolesterolemia; o tilirosídeo, atividade antidiabetes (tipo I), antihipercolesterolemia, antihipóxico, antinefrítico e antiosteoporótico, e o Pg-1, ação anticatarata, anti-hipertensiva e antitiroideana. A avaliação da probabilidade do potencial antineoplásico mostrou que a vitexina possui melhor potencial anticâncer no pâncreas, estômago, bexiga e rim, e efeito anti-*Helicobacter pylori*. O Pg-1 apresentou maior atividade anticâncer no cólon e na região cólon-retal. O tilirosídeo, apesar de exibir menor efeito em relação às demais substâncias, evidenciou atividade satisfatória anticâncer pancreática e cólon-retal. Portanto, estas moléculas podem tornar-se importantes candidatas a fármacos naturais como recurso terapêutico de combate a doenças crônicas e ao câncer do sistema gastrointestinal e urinário.

**Descritores:** Produtos Naturais; Simulação por Computador; Doença Crônica.

### Abstract

The chronic diseases represent the main group of diseases with high mortality rates. Thus, the use of medicinal plants to treat different ailments or to ameliorate their symptoms by the adult population is an alternative practice that is being used worldwide. Scientific advances and modernization contribute substantially to the discovery of natural substances for the production of new drugs with a possible low toxicity risk. Some of these plants are rich in molecules with biotechnological potential, such as flavonoids. The present study evaluated the *in silico* bioactive profile of three flavonoids: tiliroside (Kaempferol-3-O-β-D-(6"-Ep-coumaryl) glucopyranoside), Pg-1 (5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxy) and vitexin (5,7,4'-trihydroxyflavone-8-C-β-glucopyranoside). The antineoplastic predictive action on organs of the gastrointestinal and urinary systems and the protective activity against chronic diseases (diabetes, hypertension, cataracts, osteoporosis, hypercholesterolemia, thyroid dysfunction and kidney diseases) were addressed. The study demonstrated that vitexin had anti-diabetes (type II) and anti-hypercholesterolemia action; tiliroside exhibited antidiabetes (type I), antihypercholesterolemia, antihypoxic, antinephritic and antiosteoporotic activity, and Pg-1 showed anti-cataract, anti-hypertensive and anti-thyroid effect. The evaluation of the probability of the antineoplastic potential demonstrated that vitexin has a better anticancer potential in the pancreas, stomach, bladder and kidney in addition to anti-*Helicobacter pylori* effect. Pg-1 showed higher activity against colon and colorectal cancer. Tilioside, despite exhibiting lower effect than the other substances, displayed satisfactory pancreatic and colorectal anticancer activity. Therefore, these molecules are possible important new drug candidates from natural products as a therapeutic resource against chronic diseases and the gastrointestinal and urinary systems cancers.

**Descriptors:** Biological Products; Computer Simulation; Chronic Disease.

### Resumen

Las enfermedades crónicas representan el principal grupo de enfermedades con altas tasas de mortalidad. Así, el uso de plantas medicinales por parte de adultos en el tratamiento de enfermedades o el alivio de sus síntomas es una práctica alternativa que se ha adoptado a nivel mundial. Los avances científicos y la modernización contribuyen sustancialmente al descubrimiento de sustancias naturales para la producción de nuevos fármacos, con una gran posibilidad de tener un menor grado de toxicidad. Algunas de estas plantas son ricas en moléculas con potencial biotecnológico, como los flavonoides. El presente estudio evaluó el perfil bioactivo *in silico* de tres flavonoides: tilirosida (Kaempferol-3-O-β-D-(6"-Ep-cumaril) glucopiranosídeo), Pg-1 (5,7-dihidroxi-3,8, 4'-trimetoxi) y vitexina (5,7,4'-trihidroxiflavona-8-C-β-glucopiranosídeo). Se abordó la acción predictiva antineoplásica sobre órganos del aparato gastrointestinal y urinario y la actividad protectora frente a enfermedades crónicas (diabetes, hipertensión, cataratas, osteoporosis, hipercolesterolemia, disfunción tiroidea y enfermedades renales). El estudio demostró que la vitexina tenía un efecto anti-diabetes (tipo II) y anti-hipercolesterolemia; tilirosida, actividad anti-diabética (tipo I), antihipercolesterolemia, antihipóxico, antinefrítica y antiosteoporótica, y Pg-1, anti-atarata, antihipertensiva y anti-tiroidea. La evaluación de la probabilidad del potencial antineoplásico mostró que la vitexina tiene un mejor potencial anticancerígeno en el páncreas, estómago, vejiga y riñón, y tiene un efecto anti-*Helicobacter pylori*. Pg-1 mostró una mayor actividad anticancerígena en el colon y en la región colon-rectal. La tilirosida, a pesar de mostrar menos efecto que otras sustancias, mostró una actividad anticancerosa pancreática y colon-rectal satisfactoria. Por tanto, estas moléculas pueden convertirse en importantes candidatas a fármacos naturales como recurso terapéutico para combatir enfermedades crónicas y el cáncer de los sistemas gastrointestinal y urinario.

**Descritores:** Productos Biológicos; Simulación por Computador; Enfermedad Crónica.

### INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve uma mudança epidemiológica no padrão de morbimortalidade da população mundial, com o

aumento da carga de mortalidade por doenças crônicas em comparação às doenças infecciosas<sup>1</sup>. As neoplasias, as doenças

## Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 13 (3)

March 2021

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/14320211313>

Article link: <https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/1313>



## Properties of vitexin, tiliroside and 5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxy flavonoids in the treatment of diseases of the female reproductive system: an *in silico* approach

**Aleson Pereira de Sousa**

Universidade Federal da Paraíba  
[aleson\\_155@hotmail.com](mailto:aleson_155@hotmail.com)

**Micaelly da Silva Oliveira**

Universidade Federal da Paraíba

**Diégina Araújo Fernandes**

Universidade Federal da Paraíba

**Maria Denise Leite Ferreira**

Universidade Federal da Paraíba

**Laísa Vilar Cordeiro**

Universidade Federal da Paraíba

**Helivaldo Diógenes da Silva Souza**

Universidade Federal da Paraíba

**Maria de Fátima Vanderlei de Souza**

Universidade Federal da Paraíba

**Hilzeth de Luna Freire Pessoa**

Universidade Federal da Paraíba

**Abrahão Alves de Oliveira Filho**

Universidade Federal de Campina Grande

**Rita de Cássia da Silveira e Sá**

Universidade Federal da Paraíba

---

**Abstract.** Problems in the female reproductive system appear at the beginning of the reproductive cycle and persist until hormonal regulation in menopause. The drug therapies currently used can cause intolerance and susceptibility to other diseases, making it important to search for alternative therapeutic approaches that can be adopted during your reproductive life. Women use several species of plants to treat reproductive disorders. Some species are rich in bioactive molecules, such as flavonoids. The present study evaluated the bioactive *in silico* profile of three flavonoids: tyroside (Kaempferol-3-O- $\beta$ -D-(6''-Ep-coumaryl) glucopyranoside), Pg-1 (5,7-dihydroxy-3,8, 4'-trimethoxy) and vitexin (5,7,4'-trihydroxyflavone-8-



## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 021911 4

### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 24098477000110

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Cidade Universitária

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58059-900

**País:** Brasil

**Telefone:** (83) 32167558

**Fax:**

**Email:** inova@reitoria.ufpb.br

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** COMPOSTO E FORMULAÇÃO ACETAMIDICA PARA MEDICAMENTOS ANTIMICROBIANOS

**Resumo:** A presente invenção trata de uma patente de invenção e que descreve a síntese e formula farmacêutica de compostos acetamidicos apropriados para remédios para tratar infecções causadas por fungos e bactérias inclusive bactérias resistentes a antibióticos de uso humano e/ou veterinário, devido a potente atividade farmacológica, facilidade de síntese, baixa toxicidade e baixo custo de produção. A presente invenção se situa nos campos da Farmácia, Química Medicinal e Síntese Orgânica.

**Figura a publicar:** 1

**Dados do Inventor (72)**

---

**Inventor 1 de 12****Nome:** EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA**CPF:** 05810795404**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Alcebíades da Cunha nº 33, Bancários**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58051-080**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 989 103357**Fax:****Email:** edelolima@yahoo.com.br**Inventor 2 de 12****Nome:** PETRÔNIO FILGUEIRAS DE ATHAYDE FILHO**CPF:** 20606680420**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Av. Bahia nº 859, Bairro dos Estados**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58030-130**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 999 319245**Fax:****Email:** athayde-filho@quimica.ufpb.br**Inventor 3 de 12**

**Nome:** LAÍSA VILAR CORDEIRO

**CPF:** 08576186446

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua João Murilo Leite, nº 141, Apt. 401, Jardim Oceania

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58037-548

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 998 040825

**Fax:**

**Email:** laisavilar@gmail.com

**Inventor 4 de 12**

**Nome:** HELIVALDO DIÓGENES DA SILVA SOUZA

**CPF:** 06061533497

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua Professor Pereira Lira, nº 410, Bairro Popular

**Cidade:** Santa Rita

**Estado:** PB

**CEP:** 58301-025

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 996 157518

**Fax:**

**Email:** helivaldog3@gmail.com

**Inventor 5 de 12**

**Nome:** RAFAEL FARIAS DE OLIVEIRA

**CPF:** 06496383448

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua José Dimas Ferreira, nº 175, Valentina Figueiredo

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58064-430

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 988 242887

**Fax:**

**Email:** rfarias.quimica@gmail.com

**Inventor 6 de 12**

**Nome:** HERMES DINIZ NETO

**CPF:** 06193123431

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Av. Monteiro da Franca, nº 1480, Apt. 1303, Manaíra

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58038-323

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 996 598285

**Fax:**

**Email:** hermes.dn@hotmail.com

**Inventor 7 de 12**

**Nome:** GIVANILDO LUÍS FERNANDES

**CPF:** 09686922490

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Estudante de Graduação

**Endereço:** Rua Aristides Madureira Barros, nº 142, Apt. 203, Bancários

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58051-580

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 996 059647

**Fax:**

**Email:** givanildo1994@hotmail.com

**Inventor 8 de 12**

**Nome:** THAMARA RODRIGUES DE MELO

**CPF:** 06006161427

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua Joaquim Caroca, nº 403 Apt. 301-B

**Cidade:** Campina Grande

**Estado:** PB

**CEP:** 58429-120

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 991 877243

**Fax:**

**Email:** th.rmelo@outlook.com

**Inventor 9 de 12**

**Nome:** GREGÓRIO MÁRCIO DE FIGUEIRÊDO RODRIGUES

**CPF:** 08277626401

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Mestrando

**Endereço:** Rua Maurício de Araújo de Gama Filho, nº 201, Portal do Sol

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58046-710

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 986 006031

**Fax:**

**Email:** gregorio\_marcio1@yahoo.com.br

**Inventor 10 de 12**

**Nome:** RÔMULO PEREIRA DE MOURA SOUSA

**CPF:** 06846808400

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins

**Endereço:** Rua Tenente Neném Lira, nº 1044

**Cidade:** Patos

**Estado:** PB

**CEP:** 58704-733

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 999 018142

**Fax:**

**Email:** romulopereira2@hotmail.com

**Inventor 11 de 12**

**Nome:** DANIELE DE FIGUERÊDO SILVA

**CPF:** 07940977407

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua Arquimedes Gomes de Sousa, nº 350

**Cidade:** Cajazeiras

**Estado:** PB

**CEP:** 58900-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 999 811977

**Fax:**

**Email:** danielefigueredo31@gmail.com

**Inventor 12 de 12**

**Nome:** FRANCISCO PATRÍCIO DE ANDRADE JÚNIOR

**CPF:** 09694298431

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Mestrando

**Endereço:** Rua Cônego João de Deus, Castelo Branco, nº 126

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58050-360

**País:** BRASIL

**Telefone:** (84) 981 357242

**Fax:**

**Email:** juniorfarmacia.ufcg@outlook.com

#### Documentos anexados

---

<b>Tipo Anexo</b>	<b>Nome</b>
Comprovante de pagamento de GRU 200	00_Comprovante.pdf
Relatório Descritivo	01_Relatorio_descritivo.pdf
Reivindicação	02_Reivindicacoes.pdf
Desenho	03_Desenho.pdf
Resumo	04_Resumo.pdf



## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 004311 0

### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 24098477000110

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Cidade Universitária

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58059-900

**País:** Brasil

**Telefone:** (83) 32167558

**Fax:**

**Email:** inova@reitoria.ufpb.br

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** SOLUÇÃO DE MIRTENOL SANITIZANTE DE SUPERFÍCIES

**Resumo:** A presente invenção trata de uma composição sanitizante de superfícies tendo como ativo o mirtenol, ou seja, uma composição antimicrobiana para ser utilizada como alternativa aos sanitizantes químicos em superfícies rígidas lisas como tábuas, bancadas, mesas, pisos e paredes. O modo de aplicação da solução sanitizante consiste em aplicar um volume adequado para encobrir a superfície a ser sanitizada e aguardar entre 15 a 30 minutos. Em seguida, deve-se remover o excesso com auxílio de material limpo, estéril e absorvente.

**Dados do Inventor (72)**

---

**Inventor 1 de 6****Nome:** LAÍSA VILAR CORDEIRO**CPF:** 08576186446**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Doutorando**Endereço:** Rua João Murilo Leite, nº 141, apto. 401, Jardim Oceania.**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58037-548**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 998 040825**Fax:****Email:** laisavilar@gmail.com**Inventor 2 de 6****Nome:** PEDRO THIAGO RAMALHO DE FIGUEIREDO**CPF:** 09039692467**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Doutorando**Endereço:** Rua Luiz de França Pontos, nº 206, apto. 301, Jardim Oceania.**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58037-730**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 998 848638**Fax:****Email:** pedrotrfigueiredo@gmail.com**Inventor 3 de 6**

**Nome:** ALESON PEREIRA DE SOUSA

**CPF:** 07555110423

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua Pastor Guaracy Nóbrega, nº 57, apto. 304, Jardim Cidade  
Universitária.

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58051-835

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 996 327961

**Fax:**

**Email:** aleson\_155@hotmail.com

**Inventor 4 de 6**

**Nome:** FRANCISCO PATRÍCIO DE ANDRADE JÚNIOR

**CPF:** 09694298431

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Mestrando

**Endereço:** Rua Cônego João de Deus, nº 126, Castelo Branco.

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58050-360

**País:** BRASIL

**Telefone:** (84) 981 357242

**Fax:**

**Email:** juniorfarmacia.ufcg@outlook.com

**Inventor 5 de 6**

**Nome:** JOSÉ MARIA BARBOSA FILHO

**CPF:** 09857400434

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Elísio Jorge de Brito, nº 29, Jardim Oceania.

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58037-685

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 988 290103

**Fax:**

**Email:** jbarbosa@lft.ufpb.br

#### Inventor 6 de 6

**Nome:** EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA

**CPF:** 05810795404

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Alcebíades da Cunha, nº 33, Bancários.

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58051-080

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 989 103357

**Fax:**

**Email:** edelolima@yahoo.com.br

#### Documentos anexados

---

<b>Tipo Anexo</b>	<b>Nome</b>
Comprovante de pagamento de GRU 200	00_Comprovante.pdf
Relatório Descritivo	01_Relatorio_descritivo.pdf
Reivindicação	02_Reivindicacoes.pdf
Resumo	03_Resumo.pdf



## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 024353 8

### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 24098477000110

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Cidade Universitária

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58059-900

**País:** Brasil

**Telefone:** (83) 32167558

**Fax:**

**Email:** inova@reitoria.ufpb.br

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** FORMULAÇÕES BASEADAS NO ESQUELETO BÁSICO DA CHALCONA PARA COMPOSIÇÕES ANTIMICROBIANAS

**Resumo:** A presente invenção descreve possíveis formulações apropriadas para medicamentos e formulações farmacêuticas para uso em humanos, e/ou veterinário, para tratar infecções causadas por bactérias e fungos devido a potente atividade farmacológica, facilidade de síntese, baixa toxicidade e baixo custo de produção. A presente invenção se situa nos campos da farmácia, química medicinal e síntese orgânica.

**Figura a publicar:** 1

**Dados do Inventor (72)**

---

**Inventor 1 de 10****Nome:** FERNANDO FERREIRA LEITE**CPF:** 08287187419**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Doutorando**Endereço:** Rua José Firmino Ferreira, Nº 1060, Apto. 401, Jardim São Paulo.**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58053-022**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 999 553982**Fax:****Email:** fernandoferreira\_15@hotmail.com**Inventor 2 de 10****Nome:** BRUNO HANRRY MELO DE OLIVEIRA**CPF:** 08328175460**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Mestrando**Endereço:** Rua Luzinete Formiga de Lucena, Nº 1686, Apto. 303, Portal do Sol.**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58046-526**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 988 926395**Fax:****Email:** hanrygb@hotmail.com**Inventor 3 de 10**

**Nome:** LUIS CEZAR RODRIGUES

**CPF:** 54026032949

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua José Firmino Ferreira, Nº 618, Apto. 104, Bloco A, Jardim São Paulo.

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58053-022

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 999 427651

**Fax:**

**Email:** luiscezarrodrigues@gmail.com

**Inventor 4 de 10**

**Nome:** FRANCISCO JAIME BEZERRA MENDONÇA JUNIOR

**CPF:** 03225537411

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Golfo da Califórnia, Nº 90, Apto. 701, Intermares.

**Cidade:** Cabedelo

**Estado:** PB

**CEP:** 58102-100

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 999 241423

**Fax:**

**Email:** franciscojaime@ccbsa.uepb.edu.br

**Inventor 5 de 10**

**Nome:** JOSÉ MARIA BARBOSA FILHO

**CPF:** 09857400434

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Elísio Jorge de Brito, Nº 29, Jardim Oceania.

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58037-685

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 988 290103

**Fax:**

**Email:** jbarbosa@lff.ufpb.br

**Inventor 6 de 10**

**Nome:** PEDRO THIAGO RAMALHO DE FIGUEIREDO

**CPF:** 09039692467

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua Luiz de França Pontes, Nº 206, Apto. 301, Jardim Oceania.

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58037-730

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 998 848638

**Fax:**

**Email:** pedro@lff.ufpb.br

**Inventor 7 de 10**

**Nome:** EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA

**CPF:** 05810795404

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Rua Alcebíades da Cunha, Nº 33, Bancários.

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58051-080

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 989 103357

**Fax:**

**Email:** edelolima@yahoo.com.br

**Inventor 8 de 10**

**Nome:** LAÍSA VILAR CORDEIRO

**CPF:** 08576186446

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua João Murilo Leite, Nº 141, Apto. 401, Jardim Oceania.

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58037-548

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 998 040825

**Fax:**

**Email:** laisavilar@gmail.com

**Inventor 9 de 10**

**Nome:** MARCELO FELIPE RODRIGUES DA SILVA

**CPF:** 01416358439

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Técnico de laboratório, Raios-X e outros equipamentos e instrumentos de diagnóstico

**Endereço:** Rua João Maria de Araújo, Nº 80, Apto. 001, Bloco A, Condomínio Solville, Gramame.

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58067-300

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 999 28404

**Fax:**

**Email:** marcelo.mfrs@lft.ufpb.br

**Inventor 10 de 10**

**Nome:** EVANDRO FERREIRA DA SILVA

**CPF:** 04667523425

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Técnico de laboratório, Raios-X e outros equipamentos e instrumentos de diagnóstico

**Endereço:** Rua Paulino Manoel Batista, Nº 104, Valentina.

**Cidade:** João Pessoa

**Estado:** PB

**CEP:** 58065-120

**País:** BRASIL

**Telefone:** (83) 981 866430

**Fax:**

**Email:** evandro@lft.ufpb.br

#### Documentos anexados

---

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	00_Comprovante de pagamento.pdf
Relatório Descritivo	01_Relatorio_descritivo.pdf
Reivindicação	02_Reivindicacoes.pdf
Desenho	03_Desenho.pdf
Resumo	04_Resumo.pdf

## ANEXO – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

**Pesquisador:** ALESON PEREIRA DE SOUSA

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 20419319.5.0000.5181

**Instituição Proponente:**

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.653.358

#### Apresentação do Projeto:

##### INTRODUÇÃO

Inúmeras doenças microbianas de origens bacteriana, viral ou fúngica são relatadas na literatura. Em muitos casos, os responsáveis pelas infecções adquirem resistência ao medicamento utilizado, e por isso grande número de antimicrobianos tem sido desenvolvido pela indústria farmacêutica (KUBO et al., 1993; KOSHI; CHERIAN, 1995; DEUS et al., 2011).

Para que um produto, seja ele natural ou sintético, venha se tornar um medicamento seguro e eficaz, é necessário a realização de estudos toxicológicos para determinação de padrões de segurança que devem ser determinados antes da utilização do medicamento na clínica. Dessa forma, o estudo da toxicologia de um produto é de grande valia, pois permite a caracterização dos efeitos deletérios das drogas ocorridos a partir da sua administração, contribuindo para decidir se um produto deve ser adotado ou não para uso clínico (SARAIVA et al., 2012).

Um dos modelos experimentais utilizados para avaliação da toxicidade in vitro é o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos. Esse teste é usado como método de triagem para toxicidade de novas drogas objetivando estimar o dano que elas podem produzir in vivo em eritrócitos do organismo (SCHREIER et al., 1997; APARICIO et al., 2005).

A genotoxicidade é a área da genética que estuda os efeitos de determinadas substâncias sobre a

**Endereço:** Rua Horácio Nóbrega S/N  
**Bairro:** Belo Horizonte **CEP:** 58.704-000  
**UF:** PB **Município:** PATOS  
**Telefone:** (83)3421-7300 **Fax:** (83)3421-4047 **E-mail:** cep@fiponline.edu.br



Continuação do Parecer: 3.653.358

estrutura do DNA, que pode resultar em um processo denominado mutagênese. Neste sentido, os agentes que alteram a sequência do DNA são considerados "tóxicos" para os genes e são, então, chamados de genotóxicos (SILVA et al., 2003). Assim, as pesquisas sobre genotoxicidade podem também comprovar o efeito anticarcinogênico de algumas substâncias (PAOLINI, 2003).

Dessa forma, este projeto objetiva-se avaliar o potencial antimicrobiano e citotóxico das amidas sintéticas N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Cloro-N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Bromo-N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Bromo-N- fenilacetamida, 2-cloroN-fenilacetamida; híbridos moleculares do Triclosan: (5-cloro-2-(2,4- iclorofenoxi)fenil-2- acetoxibenzoato, 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenil-2-(3-benzoilfenil)propanoato, 5-cloro-2- (2,4-diclorofenoxi)fenil-2-(4-obutifenil)propanoato); os isômeros R - (+)-citronelol e S - (-) -citronelol, dos óleos essenciais de Eucalyptus citriodora, Eucalyptus globulus, Lúpulo Columbus, extratos de Hordeum vulgare, Spondias mombin, Tracheophyta e Urtica dioica L. e os flavonoides Vitexina, Tilirosídeo e Trimetoxiflavona, para contribuir com a descoberta de novas drogas com potencial farmacológico promissor.

#### HIPÓTESES

As substâncias em estudo possuem atividade antimicrobiana frente aos microrganismos de interesse clínico desse estudo, bem como possuem atividade antioxidante e toxicidade reduzida. As atividades biológicas envolvendo as substâncias em estudo não foram ainda investigadas detalhadamente em relação à sua capacidade antibacteriana e antifúngica. Este trabalho propõe-se a investigar a hipótese de que estas substâncias podem desempenhar ação antimicrobiana frente aos microrganismos de interesse clínico. Também será testada a hipótese de que estas substâncias isoladas apresentem efeito oxidante, hemolítico e potencial mutagênico reduzido.

#### METODOLOGIA

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antibacteriana serão realizados no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) / João Pessoa - PB, sob coordenação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edeltrudes de Oliveira Lima. Os microrganismos utilizados nos ensaios serão isolados, identificadas quanto à espécie e analisados sobre os seus perfis de resistência antibiótica.

Os ensaios toxicológicos e da avaliação da atividade antioxidante das substâncias serão realizados no Laboratório de Bioquímica da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, localizado no Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina

Endereço: Rua Horácio Nóbrega S/N  
 Bairro: Belo Horizonte CEP: 58.704-000  
 UF: PB Município: PATOS  
 Telefone: (83)3421-7300 Fax: (83)3421-4047 E-mail: cep@fiponline.edu.br



Continuação do Parecer: 3.653.358

Grande (UFCG) / Patos – PB, sob coordenação do Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.

#### Objetivo da Pesquisa:

Investigar o potencial antimicrobiano e a toxicidade in vitro das amidas sintéticas N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Cloro-N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Bromo-N-(4-flúor-3-nitrofenil) acetamida, 2-Bromo-N-fenilacetamida, 2-cloro-N-fenilacetamida; híbridos moleculares do Triclosan: (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxy)fenil-2-cetoxibenzoato, 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxy)fenil-2-(3-benzoilfenil)propanoato, 5-cloro-2-(2,4-iclorofenoxy)fenil-2-(4-isobutifenil)propanoato); os isômeros R - (+)-citronelol e S - (-)-citronelol, dos óleos essenciais de Eucalyptus citriodora, Eucalyptus globulus, Lúpulo Columbus, extratos de Hordeum vulgare, Spondias mombin, Tracheophyta e Urtica dioica L. e os flavonoides Vitexina, Tilirosídeo e Trimetoxiflavona.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e os benefícios foram descritos conforme a Resolução 466/2012 do CNS/MS.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Verifica-se direcionamento metodológico adequado à realização de um trabalho com relevância acadêmica, científica e social.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos foram apresentados de acordo com a Norma Operacional 001/2013 do CNS/MS.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Cumpridas as pendências lançadas no parecer anterior, nos posicionamos de maneira FAVORÁVEL à realização do estudo.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Este documento tem validade de CERTIDÃO DE APROVAÇÃO para coleta dos dados propostos ao estudo. Destacamos que a CERTIDÃO PARA PUBLICAÇÃO só será emitida após o envio do RELATÓRIO FINAL do estudo proposto, via Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_144908	14/10/2019		Aceito

Endereço: Rua Horácio Nóbrega S/N  
 Bairro: Belo Horizonte CEP: 58.704-000  
 UF: PB Município: PATOS  
 Telefone: (83)3421-7300 Fax: (83)3421-4047 E-mail: cep@fiponline.edu.br



Continuação do Parecer: 3.653.358

Básicas do Projeto	_E1.pdf	20:53:22		Aceito
Outros	PROJETOEMENDA.pdf	14/10/2019 20:49:58	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Outros	Emenda.pdf	14/10/2019 20:46:41	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	01/10/2019 17:33:48	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	01/10/2019 17:33:19	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTAUFCG.pdf	09/09/2019 21:12:28	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTAUFPB.pdf	09/09/2019 21:12:12	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMOCONFIDENCIALIDADE.pdf	09/09/2019 21:11:36	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMOPEQUISADOR.pdf	09/09/2019 21:11:12	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	09/09/2019 21:10:26	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	09/09/2019 21:07:22	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito
Folha de Rosto	Scan0080.pdf	05/09/2019 17:45:27	ALESON PEREIRA DE SOUSA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PATOS, 21 de Outubro de 2019

Assinado por:  
Lídia Pinheiro da Nóbrega  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Horácio Nóbrega S/N  
Bairro: Belo Horizonte CEP: 58.704-000  
UF: PB Município: PATOS  
Telefone: (83)3421-7300 Fax: (83)3421-4047 E-mail: cep@fiponline.edu.br