



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS**

ZILKA NANES LIMA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIBACTERIANO E EFEITOS
TOXICOLÓGICOS DE FENILACRILAMIDAS, FENILACRILATOS,
BENZILIDENEMALONONITRILAS E HIDRAZINA-1-CARBOTIOAMIDAS**

João Pessoa - PB
2024

ZILKA NANES LIMA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIBACTERIANO E EFEITOS
TOXICOLÓGICOS DE FENILACRILAMIDAS, FENILACRILATOS,
BENZILIDENEMALONONITRILAS E HIDRAZINA-1-CARBOTIOAMIDAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Hilzeth de Luna Freire Pessoa

João Pessoa - PB
2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732a Lima, Zilka Nanes.

Avaliação do perfil antibacteriano e efeitos
toxicológicos de fenilacrilamidas, fenilacrilatos,
benzilidenemalononitrilas e hidrazina-1-carbotioamidas
/ Zilka Nanes Lima. - João Pessoa, 2024.
154 f. : il.

Orientação: Hilzeth de Luna Freire Pessôa.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS/PPgDITM.

1. Medicamentos - Desenvolvimento. 2.
Citotoxicidade. 3. Antioxidante. 4. Checkerboard -
Teste. 5. Antibióticos. 6. Resistência bacteriana. I.
Pessôa, Hilzeth de Luna Freire. II. Título.

UFPB/BC

CDU 615.3(043)

ZILKA NANES LIMA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIBACTERIANO E EFEITOS
TOXICOLÓGICOS DE FENILACRILAMIDAS, FENILACRILATOS,
BENZILIDENEMALONONITRILAS E HIDRAZINA-1-CARBOTIOMIDAS**

DATA DA APROVAÇÃO: 11 DE NOVEMBRO DE 2024.

BANCA EXAMINADORA:



PROF.ª. DR.ª. HILZETH DE LUNA FREIRE PESSÔA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB

ORIENTADORA



PROF. DR. ABRAHÃO ALVES DE OLIVEIRA FILHO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE – UFCG

EXAMINADOR INTERNO À INSTITUIÇÃO



PROF.ª. DR.ª. LUCIANA RAMOS TEIXEIRA

FACULDADE DE MEDICINA DE OLINDA – FMO

EXAMINADORA EXTERNA À INSTITUIÇÃO



PROF. DR. JOELMIR LUCENA VEIGA DA SILVA

FACULDADE DE MEDICINA DE OLINDA - FMO

EXAMINADOR EXTERNO À INSTITUIÇÃO



PROF.ª. DR.ª. JOZINETE VIEIRA PEREIRA MARQUES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA – UEPB

EXAMINADORA EXTERNA À INSTITUIÇÃO

“O homem planeja o seu caminho,
mas é o Senhor quem lhe dirige os passos.”

Provérbios 16:9

Aos meus pais:

Aarão Cavalcanti Lima (*In memoriam*)

Maria Nanes Lima (*In memoriam*)

Aos meus irmãos:

Ilka Maria Lima de Araújo

João Carlos Nanes Lima

Aarão Cavalcanti Lima Júnior

Ao meu amor:

Ronnie Tenório da Fonseca

A painho e a mainha:

Morte: palavra temida e sombria.

Quem fica é corroído pela saudade.

Minha maior vontade é trazê-los de volta.

Então vem o conforto.

A MORTE não é o fim.

O AMOR tem maior dimensão.

O tempo não é forte o bastante

Para apagar as recordações.

Faz com que brote o que com amor

Vocês semearam.

Eternamente, os amo.

“Para ser grande, sê inteiro.

Nada teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa.

Põe quanto és no mínimo que fazes.

Assim, em cada lago a lua toda brilha,
porque alta vive.”

Fernando Pessoa

Zilkinha

AGRADECIMENTOS

A Deus, a Jesus Cristo e ao Espírito Santo. A Maria, mãe do filho de Deus.

A Prof^a. Dr^a. Hilzeth de Luna Freire Pessôa, pelo direcionamento, paciência, partilha de histórias cotidianas, amizade e incentivo ao longo de todo o processo. Seus ensinamentos deixaram uma marca indelével na minha formação acadêmica, sua expertise e conselhos foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Aarão Cavalcanti Lima (*In memoriam*) e Maria Nanes Lima (*In memoriam*). Aos meus irmãos, Ilka Maria Lima de Araújo, João Carlos Nanes Lima e Aarão Cavalcanti Lima Júnior; também aos seus respectivos cônjuges, Valter Azevedo Pereira, Ana Maria Sitônio Lima, Cecília Maria Albuquerque Câmara. Minha irmã, Ilka, é meu exemplo de docência universitária, persistência, profissionalismo, compromisso, paciência, receptividade e amor fraterno.

Ao meu amor, Ronnie Tenório da Fonseca, pelo amor, companheirismo e cuidado. Agradeço por cada conversa, cada palavra de ânimo e cada gesto de carinho.

Aos meus avós paternos: Olindina Odete Lima (†) e João Ferreira de Lima (†), e maternos: João Anselmo (†) e Maria Nanes (†). Aos meus tios e tias, representados por Maria Ivonete Anselmo Gomes (Tia Vona), Onias Cavalcanti Lima (Tio Lima) e Sônia Maria A. F. Rocha (Tia Sônia). À memória de Maria José (Tia Zezé †), Maria Luzinete (Tia Lulu †), Tio Betinho (†), Airton Gomes (Tio Airton †) e Pedro Anselmo (Tio Pedro †^{06/09/2025}). Aos meus primos, sobrinhos e sobrinhos-netos.

Aos membros da banca, os Professores Doutores, Abrahão A. de Oliveira Filho, Luciana R. Teixeira, Joelmir L. V. da Silva, Jozinete V. P. Marques e Cynthia Germoglio Farias de Melo, pelas valiosas sugestões que enriqueceram esta tese.

A Universidade Estadual da Paraíba.

Ao Departamento de Farmácia da UEPB, com destaque às professoras Dr^a Eliana Maia Vieira e Dr^a Nícia Stellita da Cruz Soares, pelo apoio e liderança durante o meu

doutoramento. Ao Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, o mentor na síntese das moléculas, cujo vasto conhecimento em química farmacêutica e planejamento sintético foi essencial para a obtenção das moléculas testadas nesta tese. Ao Professor Clênio Duarte Queiroga, pela amizade e companheirismo. As professoras Dr^a Ivana Maria Fechine, Dr^a Maria Auxiliadora Cunha, Dr^a Valéria Morgiana e Dr^a. Sayonara Maria Lia Fook, pela amizade, incentivo e companheirismo. As colegas de disciplina, as professoras doutoras Karlete Vieira, Maricelma Moraes, Patrícia Freitas, e Raissa Catão, pela troca de aprendizagem em Microbiologia. Agradeço aos servidores George Luis Santos, Wilma Raianny Rocha, Luis Augusto Pereira Silva e Renata Leandro, pelo apoio nos Laboratórios de Microbiologia. Ao Mestrando do PPgCF/UEPB, Misael de Azevedo T. Cavalcanti, pelo auxílio na síntese molecular.

A Universidade Federal da Paraíba.

Aos companheiros de estudo e convivência no LABETOX II e/ou nas disciplinas durante o doutoramento, Fabio Nepomuceno, Fernanda Patrícia Barbosa, Inácio Vasconcelos, Ricardo Cartaxo Ramalho, Ana Caroline Oliveira, Lidiane Nascimento, Mayara Karla Nunes, Faumana Câmara e Rebecca Rhuanny Limeira. A Fabiana Wanderley Vieira e Zilmara Pedrosa do LABETOX II pela amizade, companhia e pelos cafezinhos de cada dia de experimento.

Aos colegas da turma de 2018.1 no PPgDITM/UFPB, Aleson Pereira de Sousa, Vanessa Moraes Muniz e Emanuell dos Santos. Aos professores e secretários do DITM, especialmente ao Prof. Márcio Ferrari, que ministrou a primeira disciplina do doutorado, e a servidora Adriana Tiyoko Ura, secretária da coordenação da UFPB.

Ao Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior, por ter me iniciado oficialmente na ciência, pelos ensinamentos, incentivo e pela jornada que me tornou uma 'lenda viva'. Agradeço as lendas Veruscka Pedrosa Barreto e Eliana Guedes Stehling, amigas-irmãs desde os tempos de experimentos no Laboratório de Genética de Microrganismos (LGM/UFPB), e a saudosa Dona Severina Ramos (*In memoriam*), pelos ensinamentos preciosos nas técnicas laboratoriais. As servidoras Regina Emy

Sales de Miranda e Dione Alves Porto de Almeida do DBM, pelo apoio contínuo desde a iniciação científica até as intermediações recentes no PPgBCM/UFPB. Aos professores, Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima; Dr^a. Rinalda Araújo Guerra de Oliveira e Dr^a Filomena Maria Perrella Balestieri, pela inspiração constante; ao Dr. Adalberto Coelho e Dr. Lauro Santos, pelos ensinamentos em Microbiologia; e a Dr^a. Margareth de Fátima Diniz, por ter idealizado e fundado o Laboratório de Ensaios Toxicológicos que tornou possível a realização dos experimentos desta pesquisa.

Aos meus amigos pelo suporte emocional, pelas conversas motivadoras e por acreditarem em mim nos momentos mais desafiadores. Um agradecimento especial a Sávio Benvindo Ferreira, cuja inestimável amizade foi fundamental em minha jornada acadêmica e pessoal desde o pré-doutoramento, trazendo suporte, companheirismo e inspiração constantes. Aos amigos, Emanuela Félix da Silva, Joelly Holanda de Souza, José Ricardo Martins, Maria Aparecida Ferreira Félix, Izabel Leocádio Pereira e suas respectivas famílias, por todo o carinho e aconchego de um lar. A todos os amigos do Vibonati, representados aqui por Auriana Lins e por Gabriela Cordeiro, pela amizade, hospitalidade e por tantos momentos felizes. Ao casal Dinara Carvalho Costa e Francisco Márcio Silva, pelas enriquecedoras conversas acadêmicas. Estes se tornaram parte da minha família em Campina Grande. Agradeço à família do meu primo Oscar Melo Sobrinho — Silvana Camelo e Margarida Maria Camelo de Melo — pela amizade, carinho e apoio durante a fase final desta jornada de escrita de tese, concomitante à labuta na UEPB.

Aos amigos da turma Saúde na Dose Certa – UFPB. Farmacêuticos 1994, especialmente os que estão presentes até os dias atuais em minha vida; representados aqui pelo farmacêutico Dr. Bosco Christiano Maciel da Silva.

Agradeço aos professores e funcionários do Educandário Santa Gertrudes, e dos Colégios, Monsenhor Ademar da Mota Valença (antigo Ginásio do Arraial) e Presbiteriano XV de Novembro, que contribuíram significativamente para a minha educação. Dedico um agradecimento especial a Luzia Maria da Conceição (*In memoriam*), cuja dedicação e carinho foram fundamentais na minha infância.

A CAPES e ao CNPq, pelo financiamento e apoio inestimável às pesquisas.

Na luta humana contra a desafiadora resistência bacteriana, descobrimos que
as verdadeiras conquistas surgem da união de mentes e corações,
superando as barreiras das vaidades individuais.

Prof^a. Zilka Nanes Lima (Microbiologia Clínica, Universidade Estadual da Paraíba)

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade antibacteriana e os efeitos toxicológicos de moléculas sintéticas das classes das fenilacrilamidas (EEs), fenilacrilatos (ALs), benzilidenemalononitrilas (APMs) e hidrazina-1-carbotioamidas (GLs), todas obtidas por estratégia de modificação molecular. Na análise *in silico* Molinspiration®, todas apresentaram ótimo potencial de biodisponibilidade oral teórica. Segundo a análise toxicológica admetSAR®, as moléculas analisadas não são teoricamente cancerígenas, teratogênicas, mutagênicas nem carcinogênicas de classe III, apresentando DL₅₀ em ratos entre 585,83 e 857,20 mg/kg. Quanto à toxicidade oral aguda, as EEs estão na categoria III, ALs e APMs na categoria II, e GLs na categoria I. Na análise *in vitro*, embora EEs, ALs e APMs não tenham proporcionado proteção anti-hemolítica, o composto químico dissubstituído EE-04 (*orto-para*) e o fenilacrilato AL-09 (*orto-orto*) demonstraram Concentração Lítica Mínima (CLM) de 400 µg/mL, a qual causou ruptura de mais de 50% dos eritrócitos. Por outro lado, EE-01, AL-10 e as APMs não exibiram atividade hemolítica. As GLs apresentaram CLM de 200 µg/mL. GL-02 e GL-04 reduziram em aproximadamente 15% a oxidação induzida pela fenilhidrazina, um comprovado agente oxidante; AL-10 mostrou um perfil concentração-dependente, reduzindo em até 20%; as APMs foram as mais efetivas em reduzir a oxidação - cerca de 30% - em todas as concentrações testadas. Os índices de metaemoglobina das EEs, ALs e GLs estão dentro dos valores normais. Quanto aos testes de atividade antibacteriana, todas as moléculas destacaram-se na atividade frente às linhagens de *Streptococcus* do grupo *Viridans*. É digno de nota a atividade bactericida da GL-08, com CBM < 8 µg/mL contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Na associação *in vitro* com cloranfenicol frente às linhagens de *Staphylococcus aureus*, EE-01 e APM-05 demonstraram sinergismo; e EEs e APMs modularam a atividade da tetraciclina, exceto na linhagem de *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA 216). O isômero diclorado APM-04 (*orto-orto*) destacou-se por sua atividade antibacteriana de amplo espectro contra Enterobacterales, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., além de modular a atividade da tetraciclina em linhagens de *S. aureus* sensíveis à metilicina (MSSA). A análise por *docking* molecular revelou uma boa afinidade de ligação teórica a PBP4 (-6,909±0,14 kcal/mol) e α-HL (-6,183±0,1 kcal/mol) quando comparada com o antibiótico penicilina, e uma ótima afinidade de ligação teórica à bomba de efluxo NorA (-7,5±0,14 kcal/mol) comparada ao ciprofloxacino. APM-04, 2,6-diclorobenzilidenemalononitrila, possui dois grupos receptores de prótons, podendo teoricamente desprotonar NorA e se posicionar entre as folhas β que conectam as cadeias A e B da PBP4. Além disso, é candidata a inibir a formação do canal transmembranar formado pela α-hemolisina. APM-04 faz uma ligação de hidrogênio com PBP4, podendo inibir sua atividade. As moléculas analisadas podem atuar como aceptores de Michael por terem porções nucleofílicas/eletrofílicas que interagem com proteínas de caráter oposto nas células bacterianas. A combinação de antibióticos licenciados com APM-04 pode potencializar a eficácia, contribuindo para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Antioxidante. Modulação. *Checkerboard*. CIM.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity and toxicological effects of synthetic molecules from the phenylacrylamide (EEs), phenylacrylate (ALs), benzylidenemalononitrile (APMs), and hydrazine-1-carbothioamide (GLs) classes, all synthesised through molecular modification strategies. According to the *in silico* analysis using Molinspiration©, all molecules exhibited excellent theoretical oral bioavailability. Based on the toxicological analysis via admetSAR©, the evaluated molecules are not theoretically carcinogenic, teratogenic, mutagenic, or Class III carcinogens, with LD50 values in rats ranging from 585.83 to 857.20 mg/kg. Regarding acute oral toxicity, EEs fall into Category III, ALs and APMs into Category II, and GLs into Category I. *In vitro* analysis, while EEs, ALs, and APMs did not demonstrate anti-haemolytic protection, the disubstituted EE-04 (*ortho-para*) and phenylacrylate AL-09 (*ortho-ortho*) demonstrated a Minimum Lytic Concentration (MLC) of 400 µg/mL, which caused the rupture of more than 50% of the erythrocytes, and APMs showed no haemolytic activity. GLs presented an MLC of 200 µg/mL, with GL-02 and GL-04 reducing phenylhydrazine-induced oxidation—a known oxidative agent—by approximately 15%. AL-10 displayed a concentration-dependent profile, reducing oxidation by up to 20%, while APMs were the most effective, achieving a 30% reduction across all tested concentrations. The methaemoglobin levels of EEs, ALs, and GLs remained within normal ranges. In antibacterial activity assays, all molecules demonstrated significant efficacy against *Viridans* group *Streptococcus* strains. Notably, GL-08 exhibited bactericidal activity with an MBC < 8 µg/mL against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *In vitro* combination assays with chloramphenicol against *Staphylococcus aureus* strains, EE-01 and APM-05 displayed synergism. Additionally, EEs and APMs modulated tetracycline activity, except against the methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA 216) strain. The dichlorinated APM-04 isomer (*ortho-ortho*) stood out for its broad-spectrum antibacterial activity against Enterobacterales, *Staphylococcus* spp., and *Streptococcus* spp., as well as for modulating tetracycline activity in methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) strains. Molecular docking analysis revealed a strong theoretical binding affinity to PBP4 (-6.909 ± 0.14 kcal/mol) and α -HL (-6.183 ± 0.1 kcal/mol) compared with the antibiotic penicillin, and excellent theoretical binding affinity to the NorA efflux pump (-7.5 ± 0.14 kcal/mol) compared with ciprofloxacin. APM-04, 2,6-dichlorobenzylidenemalononitrile, possesses two proton-accepting groups, potentially enabling it to deprotonate NorA and situate itself between the β -sheets connecting chains A and B of PBP4. Furthermore, it is a candidate to inhibit the formation of the transmembrane channel created by α -haemolysin. APM-04 forms a hydrogen bond with PBP4, potentially inhibiting its activity. The analysed molecules may act as Michael acceptors due to their nucleophilic/electrophilic portions, which interact with proteins of opposing characteristics in bacterial cells. Combining licensed antibiotics with APM-04 could enhance efficacy, contributing to the treatment of infections caused by *S. aureus*.

Keywords: Cytotoxicity. Antioxidant. Modulation. *Checkerboard*. MIC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos de ação dos antibióticos.....	16
Figura 2 - Mecanismos moleculares de resistência bacteriana... ..	20
Figura 3 - Fluxograma das análises... ..	31
Figura 4 - Esquema das diluições da molécula sintética.	39
Figura 5 - Esquema para realização da técnica <i>Checkerboard</i>	40
Figura 6 - Fórmulas estruturais em 3D das fenilacrilamidas.....	43
Figura 7 - Fórmulas estruturais em 3D dos fenilacrilatos.....	44
Figura 8 - Fórmulas estruturais em 3D das benzilidenemalononitrilas.....	44
Figura 9 - Fórmulas estruturais em 3D das hidrazina-1-carbotioamidas.....	45
Figura 10 - Estruturas em 3D das fenilacrilamidas - MLP e PSA.....	48
Figura 11 - Estruturas em 3D dos fenilacrilatos - MLP e PSA	49
Figura 12 - Estruturas em 3D das benzilidenemalononitrilas - MLP e PSA	50
Figura 13 - Estruturas em 3D das hidrazina-1-carbotioamidas - MLP e PSA	51
Figura 14 - <i>Dotted</i> dos derivados de 2-cianoacetamida	87
Figura 15 - <i>Dotted</i> dos fenilacrilatos.....	89
Figura 16 - <i>Dotted</i> das benzilidenemalononitrilas.....	90
Figura 17 - <i>Dotted</i> das hidrazina-1-carbotioamidas.....	91
Figura 18 – Imagens espaciais 3D da interação entre APM-04, PEN e PBP4.....	107
Figura 19 – Imagens espaciais 3D da interação entre APM-04, CIP e NorA.....	109
Figura 20 – Imagens espaciais 3D da interação entre APM-04, PEN e AHL.....	110

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Avaliação da atividade antibacteriana de isômeros sintéticos.....	03
Quadro 2 - Protocolo de síntese, estruturas moleculares, rendimento, massa molar e faixa de fusão das fenilacrilamidas derivadas de 2-cianoacetamida.....	06
Quadro 3 - Protocolo de síntese, estruturas moleculares, rendimento, massa molar e faixa de fusão dos fenilacrilatos derivados de 2-cianoacetato de etila.....	07
Quadro 4 - Reação de síntese, estruturas moleculares e faixa de fusão das benzilidenemalononitrilas.....	09
Quadro 5 - Protocolo de síntese, estruturas moleculares, rendimento, massa molar e faixa de fusão das hidrazina-1-carbotioamidas... ..	10
Quadro 6 - Valores de ICIF correspondentes às diferentes interações.	41
Tabela 1 - Propriedades moleculares teóricas...- <i>Molinspiration</i> ©.....	47
Tabela 2 - Propriedades farmacológicas teóricas...- <i>Molinspiration</i> ©.....	53
Tabela 3 - Atividades antimicrobianas teóricas previstas pelo <i>PASS Online</i> © para as fenilacrilamidas com probabilidade de atividade maior que 0,039	55
Tabela 4 - Atividades antimicrobianas teóricas previstas pelo <i>PASS Online</i> © para os fenilacrilatos, AL-09 e AL-10, com probabilidade de atividade maior que 0,195	56
Tabela 5 - Atividades antimicrobianas teóricas previstas pelo <i>PASS Online</i> © para as benzilidenemalononitrilas com probabilidade de atividade maior que 0,155.....	58
Tabela 6 - Atividades antimicrobianas teóricas previstas pelo <i>PASS Online</i> © para as hidrazina-1-carbotioamidas com probabilidade de atividade maior que 0,354.....	60
Tabela 7 - Previsão de toxicidade teórica por classificação das fenilacrilamidas.....	66
Tabela 8 - Previsão de toxicidade teórica por regressão das fenilacrilamidas	67
Tabela 9 - Previsão de toxicidade teórica por classificação dos fenilacrilatos	69
Tabela 10 - Previsão de toxicidade teórica por regressão dos fenilacrilatos.....	70
Tabela 11 - Previsão de toxicidade teórica por classificação das benzilidenemalononitrilas	72
Tabela 12 - Previsão de toxicidade teórica por regressão das benzilidenemalononitrilas	73
Tabela 13 - Previsão de toxicidade teórica por classificação das carbotioamidas	75

Tabela 14 - Previsão de toxicidade teórica por regressão das carbotioamidas	76
Tabela 15.a - Avaliação do potencial hemolítico das moléculas sintéticas em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo A.....	82
Tabela 15.b - Avaliação do potencial hemolítico das moléculas sintéticas em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo B.....	82
Tabela 15.c - Avaliação do potencial hemolítico das moléculas sintéticas em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O	83
Tabela 16.a - Avaliação do efeito sobre fragilidade osmótica de diferentes das moléculas sintéticas em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo A	83
Tabela 16.b - Avaliação do efeito sobre fragilidade osmótica de diferentes das moléculas sintéticas em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo B	84
Tabela 16.c - Avaliação do efeito sobre fragilidade osmótica de diferentes das moléculas sintéticas em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O.....	84
Tabela 17 - Avaliação do potencial oxidante das moléculas sintéticas em suspensão de hemoglobina humana.....	86
Tabela 18 - Avaliação do potencial antioxidante das moléculas sintéticas em suspensão de hemoglobina humana.....	86
Tabela 19 - Índice de metaemoglobina das moléculas sintéticas em suspensão de hemoglobina humana.....	87
Tabela 20 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos antibióticos controle	92
Tabela 21 - Avaliação da atividade antibacteriana das fenilacrilamidas	94
Tabela 22 - Avaliação da atividade antibacteriana dos fenilacrilatos	96
Tabela 23 - Avaliação da atividade antibacteriana das benzilidenemalononitrilas	98
Tabela 24 - Avaliação da atividade antibacteriana das hidrazina-1-carbotioamidas	100
Tabela 25 - Resultados do <i>checkerboard</i> das moléculas EE-01, APM-04 e APM-05 com cloranfenicol	101
Tabela 26 - Detecção da modulação das fenilacrilamidas e fenilacrilatos com antibióticos licenciados	103
Tabela 27 - Resultados da ancoragem molecular	106

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ADAM10	A Disintegrin A nd M etalloproteinase
ADME/T	A bsorção, D istribuição, M etabolismo, E xcreção e T oxicidade
ADP	Adenosina difosfato
AHL/ α -HL	α -hemolisina
AIENP	Nanopartículas de emissão induzida por agregação
AL-09	Etil (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato
AL-10	Etil (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato
ALs	Fenilacrilatos
AmCs- pNBA	Base de Schiff em quitosana funcionalizada com metil acrilato contendo grupos p-nitrobenzaldeído
Anti-HBV	Anti-Hepatitis B Virus
APM-04	2,6-diclorobenzilidenemalononitrila ou [(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila
APM-05	2,4-diclorobenzilidenemalononitrila ou [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila
APMs	Benzilidenemalononitrilas
ARG	Arginina
ASN	Asparagina
ASP	Ácido aspártico
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BA	Bahia
BAB	Blood Ágar Base
BES	Brazilian Extended Spectrum β -Lactamase
BHI	Brain Heart Infusion
BrCAST	Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CA-MIP	Molecularly imprinted polymer specific to caffeic acid

CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC50	Concentração Citotóxica 50
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CGA	Ácido clorogênico ou ácido 3-cafeoilquínico
CHM	Concentrado de Hemácias
CIF	Concentração inibitórias fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cMH	Caldo Müeller Hinton
DHF	Dihidrofolato
DHP	Dihidropteroato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOI	Digital Object Identifier
dTMP	Desoxitimidina Monofosfato
dTTP	Desoxitimidina Trifosfato
dUMP	Desoxiuridina Monofosfato
e.p.m.	Erro padrão da média
EAC	Carcinoma ascítico de Ehrlich-Lettre
EC50	Effective Concentration 50
EE-01	(2E) 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida
EE-04	(2E) 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida
EEs	Fenilacrilamidas
EPA	Environmental Protection Agency
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
EROS	Enhanced Reactive Oxygen Species
ESBL	Extended-Spectrum β -Lactamase
ETES	Estações de Tratamento de Esgoto
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FBDD	Fragment-based drug design
FDA	Food and Drug Administration

GdpP	Fosfodiesterase
GES	Guiana Extended Spectrum β -Lactamase
GL-02	(2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida
GL-04	(2E) -2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida
GL-07	(2E) -2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida
GL-08	(2E) -2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida
GLCL-04	(E) -N-(acridin-9) (10H)-ilideno)-2-(2,4-dicloro-benzilideno)hidrazinacarbotioamida
GLs	Hidrazina-1-carbotioamidas
GLU	Ácido glutâmico
GTP	Guanosina Trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HBZY-1	Linhagem celular de células mesangiais glomerulares de rato
<i>h</i> ERG	Human Ether-à-go-go-Related Gene
HL-60	Human Leukemia-60
HLDR	Resistência de alto nível a daptomicina
<i>h</i> -NTPDase3	Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase Humana 3
IC ₅₀	Concentração de um inibidor necessária para reduzir pela metade a atividade enzimática.
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
IMP	Imipenemase
ITU	Infecção do trato urinário
IUPAC	Internacional Union of Pure and Applied Chemistry
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
log P	Coeficiente de partição etanol água
LYS	Lisina
MAO A	Monoamina oxidase A. Tem preferência pelo substrato serotonina.
MAO B	Monoamina oxidase B. Tem preferência pela feniletanolamina.
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
mcr-1	mobilized colistin resistance-1

MDA-MB	M.D.Anderson – Mammary Breast
MDR	Multidrug-Resistant
MDRSE	<i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente
MFS	Major Facilitator Superfamily
MHb	Metaemoglobina
MLP	Potencial de Lipofilicidade Molecular
MRLM	Methicillin-Resistant lacking mec
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-Sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
MurA	UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase
MW	Peso molecular (do inglês, Molecular Weight)
natoms	Número de átomo
NDM	New Delhi Metallo- β –lactamase
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
nOHNH	Número de doadores de prótons, que incluem nitrogênio e oxigênio
nON	Número de receptores de prótons, que incluem nitrogênio e oxigênio
NorA	Bomba de efluxo
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
nrtbo	Número de ligações rotativas, exceto CN
nviolations	Número de violações da regra de Lipinski
O ₂ ⁻	Superóxido
Pa	Probabilidade de ser ativo
PAEA	Poli (acrilato de aminoetil) catiônico
PBP2a	Proteína de ligação à penicilina 2a
PBP4	Proteína de ligação à penicilina 4
PBS	Tampão fosfato salino
pCL ₅₀	Concentração Letal Mediana para <i>Pimephales promelas</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEN	Penicilina
PH	Fenilhidrazina
Pi	Probabilidade de ser inativo

pIGC ₅₀	Logaritmo negativo da concentração necessária para inibir 50% do crescimento de <i>Tetrahymena pyriformis</i>
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
QSP	Peptídeos de sensoriamento do quórum
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAFT	Transferência de Cadeia por Adição-Fragmentação Reversível
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
RO5	Regra dos 5 de Lipinski
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rRNA	RNA ribossômico
S	Svedberg (medida da taxa de sedimentação durante a centrifugação)
SD	Desvio padrão amostral
SEM	Erro padrão da média
SFO	Sapporo β -lactamase
SHV	Sulphydryl Variable β -lactamase
Sirt-1	Sirtuin 1
SMAMPs	Imitadores sintéticos de peptídeos antimicrobianos
TEM	Temoniera β -lactamase
THF	Tetrahydrofolato
THIO	Fluido thioglicolato
TLA	Taiwan Extended Spectrum β -lactamase
TPSA	Área de superfície polar topológica
tRNA	RNA transportador
TRPP	<i>Tetracycline Ribosomal Protection Proteins</i>
TYR	Tirosina
UFC	Unidade formadora de colônia
VEB	Vietnam Extended Spectrum β -lactamase
VIM	Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase
VM	Volume Molecular
VRE	Vancomycin-Resistant <i>Enterococcus</i>
VRSA	Vancomycin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
2	REFERENCIAL TEÓRICO	04
2.1	Moléculas sintéticas e a química farmacêutica	04
2.1.1	FENILACRILAMIDAS	05
2.1.2	FENILACRILATOS	06
2.1.3	BENZILIDENEMALONONITRILAS	08
2.1.4	HIDRAZINA-1-CARBOTIOAMIDAS	10
2.2	Toxicologia não-clínica	11
2.2.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	11
2.2.2	ANÁLISE <i>IN VITRO</i>	12
2.2.2.1	Potencial hemolítico	12
2.2.2.2	Fragilidade osmótica	12
2.2.2.3	Potencial oxidante e antioxidante	13
2.3	Antibióticos e Resistência bacteriana	14
2.3.1	MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS	14
2.3.2	RESISTÊNCIA BACTERIANA	17
2.3.2.1	Mecanismos moleculares de resistência bacteriana	18
2.3.3	<i>BACTÉRIAS</i>	20
2.3.3.1	<i>Staphylococcus</i> spp.	20
2.3.3.2	<i>Streptococcus</i> spp.	21
2.3.3.3	<i>Enterococcus</i> spp.	22
2.3.3.4	Enterobacterales	23
2.3.3.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
2.3.4	TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS	24
2.3.4.1	Docking molecular	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Local da pesquisa	29

4.2	Produtos teste	29
4.3	Linhagens bacterianas	29
4.4	Triagem <i>in silico</i>	32
4.4.1	Molinspiration©	32
4.4.2	PASS Online©	32
4.4.3	admetSAR©	32
4.4.4	<i>Docking</i> molecular	33
4.5	Eritrócitos humanos	34
4.6	Avaliação do potencial hemolítico	34
4.7	Avaliação do efeito sobre fragilidade osmótica	35
4.8	Avaliação do potencial oxidante e antioxidante	35
4.9	Estatística	36
4.10	Suspensão bacteriana	37
4.11	Determinação da concentração inibitória mínima	37
4.12	Determinação da concentração bactericida mínima	38
4.13	Associação com cloranfenicol - <i>Checkerboard</i>	38
4.14	Modulação da ação do cloranfenicol e da tetraciclina	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Análise <i>in silico</i>	43
5.1.1	Molinspiration©	45
5.1.2	PASS Online©	53
5.1.3	admetSAR©	61
5.2	Análises toxicológicas <i>in vitro</i>	77
5.2.1	Avaliação do potencial hemolítico e do efeito sobre fragilidade osmótica	78
5.2.2	Avaliação do potencial oxidante e antioxidante	84
5.3	Atividade antibacteriana	91
5.3.1	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima	91
5.3.2	Associação com cloranfenicol - <i>Checkerboard</i>	100
5.3.3	Modulação da ação do cloranfenicol e da tetraciclina	102
5.3.4	<i>Docking</i> molecular	105
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
	REFERÊNCIAS	115

1 INTRODUÇÃO

Conforme dados publicados em junho de 2023, por Balasubramanian e colaboradores, foi estimado que ocorrem 136 milhões de casos de infecções hospitalares por ano no mundo. A China é a nação mais afetada, com 52 milhões de registros, e o Brasil está em quinto lugar, com 4 milhões de casos. Em outro estudo, após analisar os dados do ano de 2015 da Rede Europeia de Vigilância da Resistência Antimicrobiana (EARS-Network), estimou-se que ocorreram 671.689 infecções causadas por bactérias multirresistentes (MDR), resultando em aproximadamente 33.110 mortes (cerca de 91 por dia) na União Europeia, Noruega e Islândia (CASSINI *et al.*, 2019).

Com 14% da população mundial os 35 países das Américas, em 2019, concentram aproximadamente 11% das mortes por infecções bacterianas resistentes a antibióticos. Em números absolutos, as ocorrências estão concentradas nas nações mais populosas, como Estados Unidos e Brasil. No Brasil, foram registradas 33,2 mil mortes (cerca de 90 por dia) diretamente causadas por infecções resistentes e 138 mil nas quais as bactérias MDR tiveram alguma participação (AGUILAR *et al.*, 2023).

O estudo, conduzido pelo economista Jim O'Neill (2014), propõe um plano estratégico que demanda investimentos bilionários para conter o avanço da resistência bacteriana. Caso medidas eficazes não sejam implementadas, projeta-se um cenário alarmante no qual, até 2050, as mortes anuais decorrentes de infecções bacterianas resistentes a antibióticos alcançarão 10 milhões, correspondendo a um óbito a cada três segundos. Tal panorama configura um retrocesso significativo para a medicina moderna, com potencial para reverter avanços científicos e tecnológicos impondo à humanidade desafios comparáveis aos enfrentados na era pré-antibiótica.

Encontrar formas de encorajar a indústria farmacêutica a produzir novos antibióticos é um problema antigo. Nos últimos 40 anos, não foram descobertas novas classes de antibióticos clinicamente relevantes, com exceção de antimicrobianos de espectro estreito, como a daptomicina e a linezolid (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007). Uma nova classe de antibióticos de espectro ampliado, a zosurabalpina, um peptídeo macrocíclico, que se encontra nos estágios iniciais de

desenvolvimento, representa uma esperança no combate às infecções, incluindo *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos (PAHIL *et al.*, 2024).

A importância de avaliar as características toxicológicas reside no fato de que toda e qualquer substância química pode vir a ser tóxica (ZHANG *et al.*, 2012). Surge então a necessidade de se conhecer ao máximo os riscos que uma molécula pode oferecer, a fim de estabelecer condições seguras de uso e/ou exposição (FERREIRA; PINTO, 2010). A avaliação citotóxica através da quantificação da hemólise é um modelo simples para investigar o efeito tóxico ou protetor de uma variedade de moléculas, sendo a hemólise caracterizada pela ruptura do eritrócito com liberação de hemoglobina, podendo assim causar danos sérios em órgãos vitais (CARVALHO *et al.*, 2007). Dessa forma, qualquer alteração na membrana dos eritrócitos, seja em sua composição ou estabilidade, pode servir como ferramenta diagnóstica para uma série de doenças, bem como para estudos sobre comportamentos celulares (GOUVÊA-e-SILVA, 2006; KEMPAIAH; SRINIVASAN, 2006; BATISTA *et al.*, 2007).

A hemoglobina (Hb) é uma proteína presente nos eritrócitos e desempenha um papel crucial no transporte de oxigênio e dióxido de carbono no organismo. Sua estrutura e função a tornam uma ferramenta valiosa em estudos de atividade oxidante e antioxidante *in vitro*. Ao medir a capacidade de um antioxidante em prevenir a oxidação da hemoglobina, é possível determinar sua eficácia em neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROs). A oxidação da hemoglobina pode ser facilmente medida, tornando-a um excelente indicador de estresse oxidativo. A formação de metaemoglobina (MHb), uma forma oxidada da hemoglobina, é um marcador comum utilizado nesses estudos (DIAS, 2018).

Na busca por novos antimicrobianos eficazes contra bactérias MDR, duas estratégias são consideradas: a descoberta de novos alvos e a potencialização de moléculas conhecidas (FERNANDES, 2006). Esta última é uma opção viável e contribui com estudos de planejamento e desenvolvimento de fármacos, sendo vantajosa em termos de investimento e tempo (REZENDE *et al.*, 2002). Uma estratégia comum envolve a escolha de um alvo molecular, validação do alvo e do ensaio bioquímico/farmacológico, identificação de um composto-protótipo, e sua modificação/otimização até a aprovação nos testes clínicos em humanos (DIAS;

CORREA, 2001). O *fragment-based drug design* (FBDD) é uma estratégia para descobrir novas estruturas ativas, usando fragmentos privilegiados no *design* de medicamentos. Essas estruturas facilitam a interação com biomacromoléculas e são distintas dos ligantes endógenos (DUARTE; BARRERO; FRAGA, 2007). A Química Combinatória é usada para preparar coleções dessas moléculas, aumentando a chance de encontrar um composto químico protótipo, com recursos computacionais e modelagem molecular sendo utilizados para planejar a diversidade química molecular (VILLAR; KOEHLER, 2000).

Os resultados dos testes de atividade antibacteriana, expressos em concentrações inibitórias mínimas (CIM), de pares isômeros de fenilacrilamidas (EEs) por Santos (2017) e fenilacrilatos (ALs) por Pereira (2016) podem ser conferidos no **Quadro 1**. EE-01, 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida, e AL-09, etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato, destacaram-se por sua atividade antibacteriana frente às linhagens de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) de origem hospitalar.

Quadro 1 – Avaliação da atividade antibacteriana de isômeros sintéticos.

Linhagens ⇒ Moléculas ↓	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)		
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MRSA	<i>E. coli</i> ATCC 25922
EE-01	256	64	64
EE-04	64	ND	ND
AL-09	16	128	ND
AL-10	512	ND	ND

S.aureus = *Staphylococcus aureus*; **MRSA** = *S. aureus* resistente a metilicina; **E.coli** = *Escherichia coli*; **µg/mL** = micrograma por mililitro; **ATCC** = *American Type Culture Collection*; **EE-01** = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **EE-04** = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; **AL-09** = Etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato; **AL-10** = Etil 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; **CIM** = Concentração Inibitória Mínima; **ND** = CIM não determinada.

Fonte: SANTOS, 2017; PEREIRA, 2016.

Com base nessas informações, este trabalho teve como objetivo realizar estudos *in silico* para determinar as propriedades físico-químicas, farmacológicas e toxicológicas teóricas de derivados sintéticos de fenilacrilamidas, fenilacrilatos, benzilidenemalononitrilas e hidrazina-1-carbotioamidas, bem como avaliar *in vitro* seus efeitos antibacterianos e toxicológicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Moléculas sintéticas e a química farmacêutica

A seleção de moléculas sintéticas para o desenvolvimento de medicamentos requer a triagem criteriosa de moléculas, visando avaliar sua atividade biológica e potencial terapêutico. Nesse contexto, a síntese de novos derivados desempenha um papel fundamental. Para muitas doenças com alvos terapêuticos conhecidos, essa estratégia facilita o planejamento e a criação de ligantes específicos. Além disso, as moléculas sintéticas são essenciais na identificação de proteínas-alvo e no desenvolvimento de novos fármacos moduladores, especialmente para distúrbios sem alvos terapêuticos (ARAÚJO *et al.*, 2015; SANGI, 2016). A síntese orientada pelo alvo, combinando análise retrossintética e *design* racional de medicamentos, permite realizar planejamento de síntese molecular específicos ou bibliotecas focadas de maneira eficiente e eficaz (SANGI, 2016).

Com o crescente foco na sustentabilidade, o interesse pelo desenvolvimento de processos de síntese molecular limpos e economicamente viáveis tem se mostrado fundamental para a produção de insumos químicos finos. Nesse contexto, a reação de condensação de Knoevenagel tem sido amplamente empregada. Esta reação permite a formação de moléculas complexas com grupos funcionais específicos através da condensação de duas ou mais moléculas simples, utilizando uma base fraca como catalisador. As vantagens desta reação incluem sua simplicidade e facilidade de execução (PÉREZ *et al.*, 2009; VELOSO *et al.*, 2001).

A síntese de isômeros é essencial na pesquisa farmacológica, pois permite explorar como diferentes arranjos espaciais de átomos em uma mesma molécula podem influenciar a interação com alvos biológicos. Isômeros podem apresentar diferenças significativas em termos de potência, seletividade e toxicidade. Assim, sintetizar e estudar isômeros é uma estratégia crucial para identificar formas mais eficazes e seguras de novas moléculas, contribuindo para o desenvolvimento de medicamentos com melhor perfil terapêutico (SILVERMAN; HOLLADAY, 2015). Investir nesses aspectos é essencial para enfrentar o desafio crescente da resistência bacteriana e garantir o sucesso contínuo no tratamento de infecções (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007).

2.1.1 FENILACRILAMIDAS

Os derivados sintéticos da 2-cianoacetamida possuem um considerável interesse científico, além de apresentarem importantes atividades biológicas. A acrilamida é uma molécula que pertence ao grupo das amidas, seu nome formal é prop-2-enamida. As fenilacrilamidas contêm um grupo fenil e um grupo acrilamida em sua estrutura (COSTA; MENEZES, 2015).

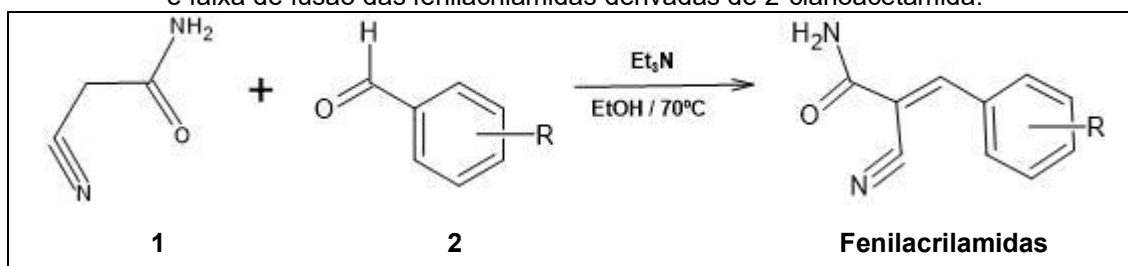
O interesse científico pelas acrilamidas começou em 1954, quando se descobriu seu potencial para produzir resinas com boa ação flocculante. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer classificou a acrilamida como um provável carcinógeno para humanos. Na década de 50 e 60, pesquisadores realizaram estudos toxicológicos pioneiros sobre a exposição de animais a essa substância e a DL₅₀ média da acrilamida para animais de laboratório foi de 150-180 mg/kg de peso (McCOLLISTER; OYEN; ROWE, 1964). A acrilamida é formada em alimentos ricos em carboidratos quando submetidos a altas temperaturas (LIMA *et al.*, 2022), é encontrada principalmente em batatas fritas, chips, grãos de café e bolachas “*cream craker*”, representando um risco à saúde humana (REIS; GONÇALVES; MARIM, 2014). Recentemente, Wu e colaboradores (2024) desenvolveram uma estratégia para detectar acrilamidas em alimentos e no ambiente usando nanopartículas de emissão induzida por agregação (AIENPs), reduzindo a exposição ao risco, garantindo a saúde humana e a segurança ambiental.

No planejamento racional de fármacos usa-se estratégias de modificação molecular com o intuito de diminuir a toxicidade e elaborar substâncias com perfis farmacológicos mais definidos. Santos (2017) sintetizou seis derivados de 2-cianoacetamida, codificados por **EE**. As moléculas EE-01 e EE-04 demonstraram atividade antibacteriana. EE-01 foi eficaz contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (CIM=64µg/mL), enquanto EE-04 demonstrou atividade contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CIM=64µg/mL).

Conforme o **Quadro 2**, as fenilacrilamidas (**EE**) foram obtidas pela condensação do tipo Knoevenagel, pelo tratamento de uma amida acética, contendo um grupo funcional nitrilo, com aldeídos aromáticos. Em resumo, a reação foi feita com 1 equivalente de 2-cianoacetamida (reagente 1) e 300 miligramas do aldeído

aromático (reagente 2) na presença de etanol e trietilamina, sendo mantida em agitação, a 70 °C, por aproximadamente 24 horas, para produzir os derivados sintéticos desejados. Informações sobre a estrutura molecular, o rendimento das reações, a massa molar e a faixa de fusão das fenilacrilamidas também podem ser conferidas no **Quadro 2**.

Quadro 2 - Protocolo de síntese^A, estruturas moleculares^A, rendimento, massa molar^A e faixa de fusão das fenilacrilamidas derivadas de 2-cianoacetamida.



Sigla	Estrutura molecular ^A	Rendimento (%)	Massa Molar ^A (g/mol)	Faixa de fusão (°C)
EE-01		80,64	241,07	190-193
EE-04		82,96	241,07	201-213

(1) = 2-cianoacetamida; (2) = aldeídos aromáticos; **Et₃N**=trietilamina; **EtOH**=etanol absoluto; **R**=radical; (%) = percentagem; **g/mol** = grama por mol; (**°C**) = grau centígrado; **EE-01** = (2E) 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **EE-04** = (2E) 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; (^A) Gerados no software ACS/ChemSketch®.

Fonte: SANTOS, 2017.

2.1.2 FENILACRILATOS

Acrilatos são os sais e os ésteres do ácido acrílico, a nomenclatura IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) é propenoato. Os acrilatos contêm o grupo vinil (dois átomos de carbono unidos por ligação dupla) ligados a um grupo

carboxila. Nos fenilacrilatos, o anel benzeno (fenil) é ligado ao carbono do grupo acrilato (COSTA; MENEZES, 2015).

Os fenilacrilatos (**ALs**) foram obtidos pela condensação do tipo Knoevenagel entre diferentes aldeídos aromáticos substituídos e o grupo funcional nitrilo do 2-cianoacetato de etila. Em resumo, a reação foi feita com 1 equivalente molar de 2-cianoacetato de etila (reagente 1) e 1 equivalente molar do aldeído aromático (reagente 2) na presença de etanol e morfolina, sendo mantida em agitação, a 70 °C, por aproximadamente 24 horas, para produzir os derivados sintéticos desejados, conforme ilustra a reação no **Quadro 3**. Outras informações sobre a estrutura molecular, o rendimento das reações, a massa molar e a faixa de fusão dos fenilacrilatos também podem ser conferidas no mesmo Quadro.

Quadro 3 - Protocolo de síntese^A, estruturas moleculares^A, rendimento, massa molar^A e faixa de fusão dos fenilacrilatos derivados de 2-cianoacetato de etila.

Sigla	Estrutura molecular ^A	Rendimento (%)	Massa molar ^A (g/mol)	Faixa de fusão(°C)
AL-09		23,28 ^B	270,11	40-42
AL-10		71,02	270,11	68-70

(1)=2-cianoacetato de etila; (2)=aldeídos aromáticos; (*)morfolina; **EtOH** = etanol absoluto; **R**=radical; (%) = percentagem; **g/mol**=grama por mol; (°C) =grau centígrado; **AL-09** = Etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato ou (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) prop-2-enoato de etila; **AL-10** = Etil 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato ou (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) prop-2-enoato de etila; (^A) Gerados no software ACS/*ChemSketch*®; (^B) Comunicação verbal, Mestrando Misael de Azevedo Teotônio Cavalcanti, Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos/UEPB.

Fonte: PEREIRA, 2016.

As moléculas que contêm o grupo acrilato em sua estrutura têm demonstrado um potencial bioativo significativo, despertando interesse devido à sua notável atividade anticancerígena. Eles exibem atividade citostática contra várias linhagens de células malignas, incluindo carcinomas pancreático, mamário, cervical, de laringe, de cólon, melanomas e fibroblastos humanos (HRANJEC *et al.*, 2003).

O ácido clorogênico (CGA), ou ácido 3-cafeoilquínico, um polifenol de fenilacrilato solúvel em água, tem várias funções biológicas, incluindo ação antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e antitumoral. Ele também regula o metabolismo de lipídios e glicose, protege o sistema nervoso e mantém a integridade dos vasos sanguíneos. O CGA tem potencial para melhorar o crescimento e a saúde dos suínos, sendo considerado como um substituto para os antibióticos na produção de porcos (WANG, L. *et al.*, 2022; DAI *et al.*, 2023).

Os estudos sobre a atividade antibacteriana dos acrilatos são limitados. A pesquisa de Pereira (2016) sintetizou dez derivados fenilacrilatos. O derivado AL-09 mostrou atividade antibacteriana contra *S. aureus* ATCC 25923 com uma CIM de 16 µg/mL, enquanto o AL-10 obteve uma CIM de 512 µg/mL contra a mesma linhagem.

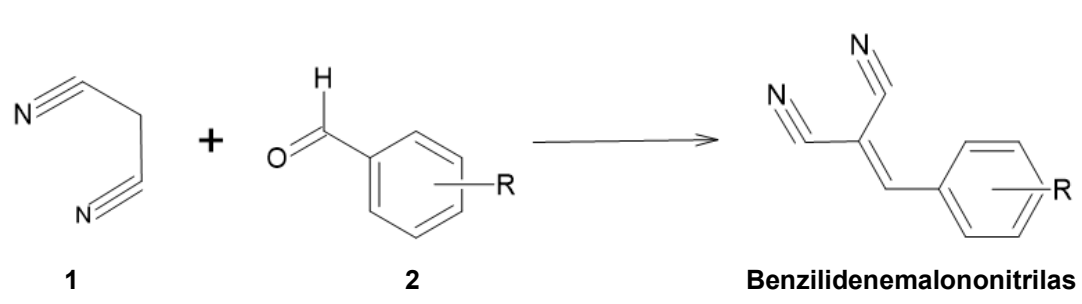
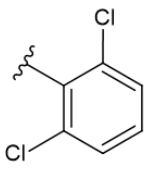
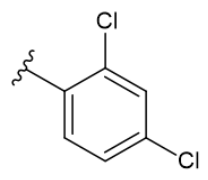
2.1.3 BENZILIDENEMALONONITRILAS

As nitrilas são moléculas orgânicas caracterizadas pela ligação tripla entre um átomo de carbono e um átomo de nitrogênio, apresentando o grupo funcional ($-C \equiv N$). Nas nitrilas, o nitrogênio está na extremidade e o carbono está ligado diretamente à cadeia carbônica. Propanodinitrila (o), que tem como sinônimo malononitrila (o), possui dois grupos funcionais cianeto ($-C \equiv N$) (BARREIRO; FRAGA, 2014). As benzilidenemalononitrilas; ou fenilmetilidenopropanodinitrilas possuem um átomo de carbono com ligação dupla diretamente ligado a um anel benzênico, o que sugere que esta categoria contenha o nome do composto orgânico altamente reativo benzilideno.

Conforme o **Quadro 4**, os derivados de propanodinitrila (**APMs**) foram sintetizados através da reação de condensação do tipo Knoevenagel entre o malononitrilo (reagente 1) e diferentes aldeídos aromáticos (reagente 2) em equivalência molar 1:1, para produzir as moléculas codificadas por **APM**. A

nomenclatura IUPAC (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), determinadas pelo *ChemSketch*®, e as siglas das moléculas são as seguintes: [(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila corresponde a APM-04, e [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila corresponde a APM-05. As nomenclaturas geradas pelo software Molinspiration® foram respectivamente, 2,6-diclorobenzilidenemalononitrila e 2,4-diclorobenzilidenemalononitrila. Informações sobre a estrutura molecular, massa molar e faixa de fusão também podem ser conferidas no **Quadro 4**.

Quadro 4 – Reação de síntese^A, estruturas moleculares^A e faixa de fusão das benzilidenemalononitrilas.

			
Sigla	Radical ^A	Massa molar ^A (g/mol)	Faixa de fusão(°C)
APM-04		223.06	69-73
APM-05		223,06	155-159

(1)=malononitrilo; (2)=aldeídos aromáticos; **R**=radical; **g/mol**=grama por mol; (**°C**)=grau centígrado; (^A) A montagem da reação de síntese, das estruturas moleculares e o cálculo da massa molar foram geradas na ferramenta ACS/*ChemSketch*®; **APM-04** = [(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila e **APM-05** = [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila, nomenclatura IUPAC gerada pelo *ChemDraw*®; **APM-04** = 2,6-diclorobenzilidenemalononitrila e **APM-05** = 2,4-diclorobenzilidenemalononitrila, geradas pelo *Molinspiration*®.

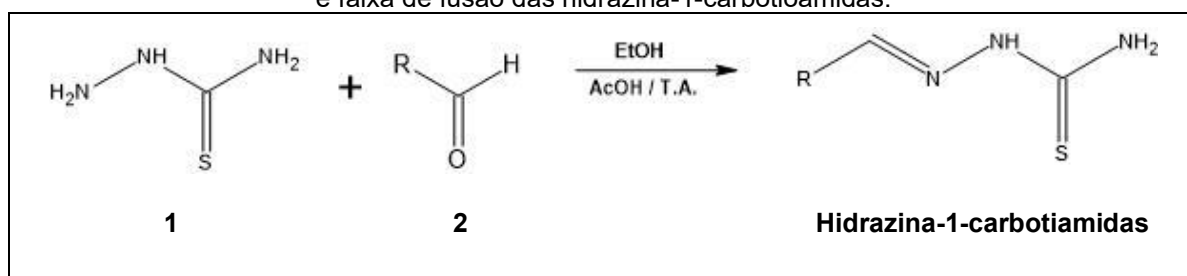
Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

2.1.4 HIDRAZINA-1-CARBOTIOAMIDAS

As hidrazina-1-carbotioamidas são moléculas que contêm carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre; são derivadas da reação da tiossemicarbazida com aldeídos aromáticos. São pequenas moléculas, também conhecidas como tiossemicarbazidas (BARREIRO; FRAGA, 2014).

Conforme o **Quadro 5**, a reação de obtenção de cada hidrazina-1-carbotioamida (**GL**), foi sintetizada com 100 miligramas de tiossemicarbazida (reagente 1) e um equivalente dos aldeídos (reagente 2) na presença de etanol e ácido acético à temperatura ambiente. Outras características das **GLs** podem ser conferidas no mesmo Quadro.

Quadro 5 – Protocolo de síntese^A, estruturas moleculares^A, rendimento, massa molar^A e faixa de fusão das hidrazina-1-carbotioamidas.



Sigla	Radical ^A	Rendimento (%)	Massa Molar ^A (g/mol)	Faixa de fusão(°C)
GL-02		81,96	213,69	230-233
GL-04		91,66	248,13	234-236
GL-07		84,24	248,13	234-237
GL-08		89,42	248,13	253-254

1=tiossemicarbazida; 2=aldeídos aromáticos; EtOH=etanol absoluto; AcOH=ácido acético; T.A.=temperatura ambiente; R=radical; (%) = percentagem; MM=massa molar; (g/mol) =grama por mol; (°C) =grau centígrado; GL-02= (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-04= (2E) -2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-07= (2E) -2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-08= (2E) -2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; (A) Gerados no ACD/ChemSketch®.

Fonte: SOUSA, 2019.

Sousa (2019) sintetizou o derivado tiossemicarbazônico acridínico GLCL-04, que inibiu 83,7% das células HL-60 a 50 µM e mostrou alto poder citotóxico no teste de hemólise, típicos de moléculas anticâncer por sua alta toxicidade para células normais. A nomenclatura do GLCL-04 é (E) -N-(acridin-9) (10H)-ilideno)-2-(2,4-diclorobenzilideno)hidrazinacarbotioamida. As moléculas hidrazina-1-carbotioamidas são intermediários desta reação para obter os derivados tiossemicarbazônicos acridínicos.

2.2 Toxicologia não-clínica

Após a identificação de moléculas com potencial terapêutico promissor, é essencial avaliar a segurança. A toxicologia não-clínica, utiliza estudos *in silico* para prever a toxicidade potencial de candidatos a medicamentos, e análises *in vitro* são fundamentais para se conhecer a citotoxicidade (FIGUEIREDO JÚNIOR *et al.*, 2021), sendo fulcral para garantir a segurança de novos produtos farmacêuticos.

2.2.1 ANÁLISE *IN SILICO*

Os estudos *in silico* reduzem significativamente a necessidade de testes em animais de laboratório (KNOP; MARIA, 2016), contribuindo para uma pesquisa mais ética e eficiente. Essa prática tem sido alvo de críticas de diversos segmentos da sociedade devido ao sofrimento imposto aos animais, levando a uma crescente exigência por parte da comunidade científica e das autoridades para o desenvolvimento e uso de métodos alternativos à experimentação animal (VICTAL *et al.*, 2014). A triagem *in silico* utiliza métodos computacionais para avaliar propriedades farmacocinéticas e prever a atividade biológica de moléculas, com softwares como Molinspiration®, PASS Online® e admetSAR®.

2.2.2 ANÁLISE IN VITRO

Os testes *in vitro* são essenciais para garantir a segurança de novos medicamentos e produtos químicos. Eles fornecem informações valiosas sobre os possíveis impactos adversos das moléculas antes dos testes em animais e, posteriormente, em humanos, ajudando a identificar potenciais riscos à saúde e a minimizar esses riscos (ADLER *et al.*, 2011).

2.2.2.1 Potencial hemolítico

O potencial hemolítico refere-se à capacidade de uma substância em causar lise ou ruptura dos eritrócitos (ADLER *et al.*, 2011). A ausência ou baixa taxa de hemólise é importante para o desenvolvimento de um medicamento, pois a ruptura das células sanguíneas, que são as mais abundantes do tecido sanguíneo, libera hemoglobina no plasma. A hemoglobina livre pode causar danos a órgãos vitais como rins e coração (SILVA *et al.*, 2022). O ensaio é utilizado para avaliar a toxicidade *in vitro*. A avaliação do potencial hemolítico é usada como método de triagem para toxicidade de novas moléculas, com objetivo de estimar o dano que elas podem produzir *in vivo* em eritrócitos no organismo (PEREIRA *et al.*, 2020).

2.2.2.2 Fragilidade osmótica

A fragilidade osmótica avalia a resistência dos eritrócitos à ruptura em diferentes condições osmóticas (ADLER *et al.*, 2011). Em uma solução hipotônica, os eritrócitos absorvem água e se rompem. A fragilidade osmótica é definida pela capacidade dos eritrócitos de resistir à hemólise (ruptura da membrana celular) sob essas condições osmóticas (RODRIGUES, 2023). O Teste de Fragilidade Osmótica, também conhecido como Curva de Fragilidade Osmótica, permanece um método de triagem amplamente utilizado em análises clínicas ou patologia clínica, para avaliar a resistência ou fragilidade (lise) dos eritrócitos quando expostos a variações nas concentrações osmóticas de cloreto de sódio (QUADROS; BRITO, 2021). Em outras palavras, o teste baseia-se na avaliação da resistência dos glóbulos vermelhos à lise,

em função da redução na concentração de cloreto de sódio (FERNÁNDEZ-ALBERTI; FINK, 2000).

2.2.2.3 Potencial oxidante e antioxidante

O potencial oxidante refere-se à capacidade de uma substância em gerar espécies reativas de oxigênio (EROS), que podem causar danos às células e tecidos. Por outro lado, o potencial antioxidante indica a capacidade de uma substância em neutralizar essas espécies reativas e proteger as células. Esses testes são fundamentais para avaliar o potencial de moléculas sintéticas em causar danos oxidativos ou fornecer benefícios antioxidantes, sendo relevantes para a segurança e eficácia dos medicamentos em desenvolvimento (LOBO *et al.*, 2010; PISOSCHI; POP, 2015; SANTANA, 2020). O metabolismo normal produz continuamente ROS, que desempenham várias funções *in vivo*, especialmente na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização entre células (HONG *et al.*, 2024). O estresse oxidativo ocorre quando a produção de compostos oxidantes excede a capacidade do organismo de neutralizá-los. Esse aumento descontrolado de moléculas altamente reativas pode resultar na oxidação de biomoléculas, como proteínas, aminoácidos, lipídios e DNA, causando danos celulares que podem culminar na morte celular (KOZLOV; JAVADOV; SOMMER, 2024).

A toxicidade de uma molécula pode estar relacionada ao seu potencial oxidante. Moléculas com alto potencial oxidante podem causar danos oxidativos às células, levando à citotoxicidade. No entanto, a relação entre o potencial oxidante e a toxicidade não é direta e depende de vários outros fatores, incluindo a concentração da molécula e a presença de outros antioxidantes no sistema (BARBOSA *et al.*, 2010). As descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, impulsionou a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células vivas (ALVES *et al.*, 2010).

O fundamento do teste *in vitro* é avaliar quantitativamente a metaemoglobina em relação a oxiemoglobina por meio da absorção espectrofotométrica em comprimentos de onda específicos (NAOUM *et al.*, 2004). As

principais formas heme-estruturais das moléculas de hemoglobinas caracterizadas por oxiemoglobina, deoxiemoglobina, metaemoglobina e cianometaemoglobina, são físico-quimicamente identificadas pelos seus espectros de absorção. O espectro da deoxiemoglobina tem absorção máxima no comprimento de onda de 555 nm, a oxiemoglobina tem absorções específicas em 540 nm e 577 nm, a metaemoglobina tem dois comprimentos de onda com maior intensidade de absorção em 500 nm e 630 nm, e a cianometaemoglobina em 540 nm (CAMARGO *et al.*, 2007; CLARO *et al.*, 2006; NAOUM *et al.*, 2004).

2.3 Antibióticos e Resistência Bacteriana

2.3.1 MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos bactericidas promovem a morte dos microrganismos ao interromper processos essenciais à sua sobrevivência, como a síntese de parede celular, a replicação do DNA ou a função da membrana plasmática. Embora também possam impedir a multiplicação bacteriana, seu principal efeito está em causar a destruição das células bacterianas. Já os antibióticos bacteriostáticos atuam inibindo o crescimento e a multiplicação dos microrganismos, sem causar sua morte imediata, permitindo que o sistema imunológico do hospedeiro elimine os patógenos de forma mais eficaz. Geralmente, a combinação de antibióticos com atividade antimicrobiana semelhante produz um efeito sinérgico, enquanto a combinação de antibióticos com atividades diferentes pode resultar em antagonismo. Portanto, é preferível combinar antibióticos como a sulfa com o trimetropim, ou a penicilina com o enrofloxacino. Por outro lado, a combinação de penicilina com tetraciclina ou sulfa com enrofloxacino é desaconselhada. Exceções existem, mas seguir essa regra geral aumenta a probabilidade de sucesso terapêutico. Exemplos de antibióticos bacteriostáticos incluem cloranfenicol, tetraciclina, macrolídeos, lincosamidas, sulfonamidas e trimetropima, enquanto aminoglicosídeos, quinolonas, penicilinas e cefalosporinas são exemplos de bactericidas (SILVA, 2013; ZHANG *et al.*, 2016).

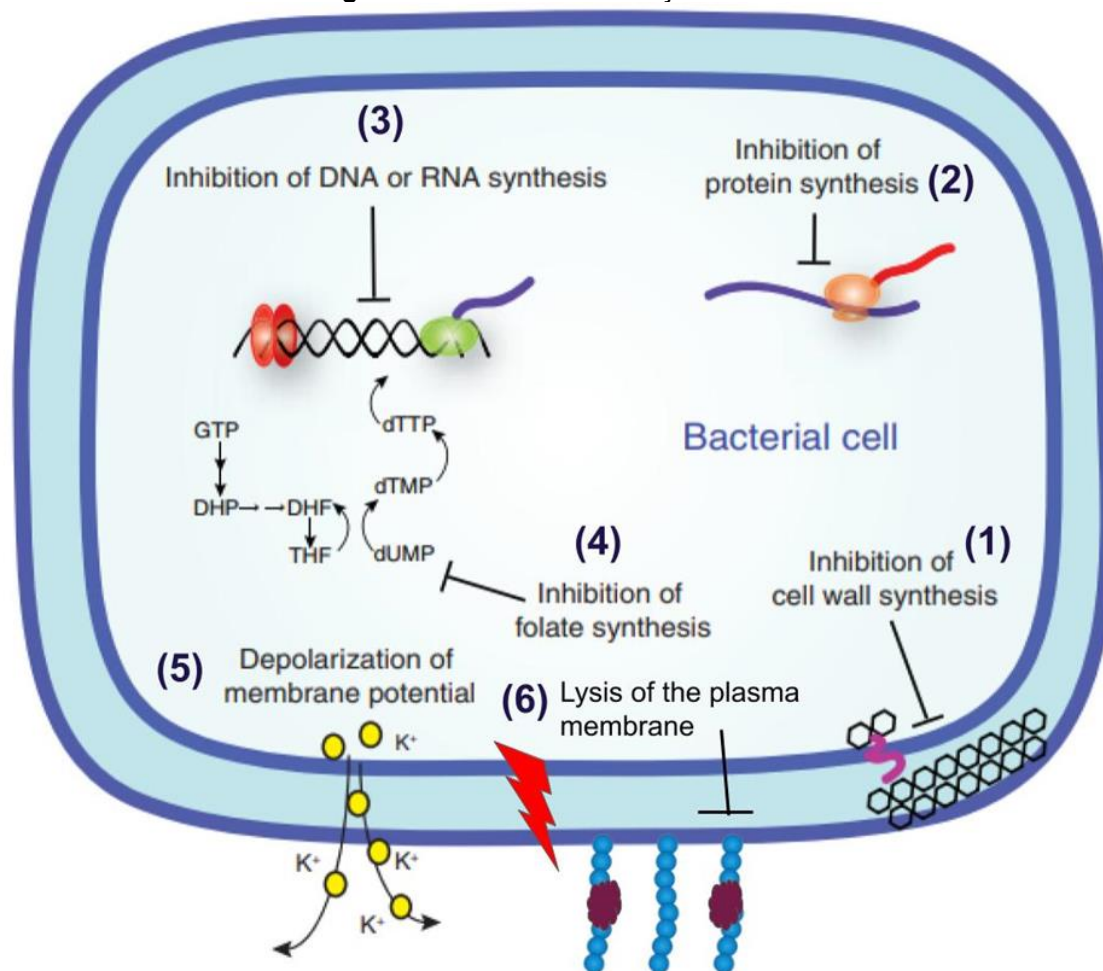
A partir de 2000, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana. Em 2001, apenas um antibiótico de origem sintética da classe das

oxazolidinonas foi introduzido no mercado farmacêutico, a **linezolida**; e de fonte natural, em 2003, o lipodepsipeptídeo **daptomicina** (PUPO *et al.*, 2006, GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010, grifo nosso). Segundo Oliveira e Aires (2016, grifo nosso), embora a investigação de novas moléculas antibacterianas não seja a prioridade da indústria farmacêutica, o interesse em dar resposta à emergência das “superbactérias” fica corroborado com os exemplos que seguem: **Doripenem**, carbapenem aprovado pelo FDA em 2007; **telavancina**, glicopeptídeo aprovado em 2008; **tedizolida**, oxazolidinona aprovada em 2014; **dalbavancina** e **oritavancina**, glicopeptídeos aprovados em 2014, sendo a oritavancina ativa em MRSA, VRE e VRSA; **ceftolozano/tazobactam** e **ceftazidima/avibactam**, combinações de cefalosporina com inibidor de β -lactamases aprovados em 2014; e **ceftarolina**, cefalosporina de quinta geração ativa contra MRSA, aprovada em 2015. Apesar das pleuromutilinas terem sido descobertas nos anos 1950, a **lefamulina** tornou-se o primeiro antibiótico dessa classe aprovado pelo FDA em 2019 para administração tanto oral quanto intravenosa em humanos, sendo indicado para o tratamento de pneumonia bacteriana adquirida na comunidade em pessoas adultas (WATKINS; FILE, 2020, grifo nosso).

Entre os principais mecanismos de ação dos antibióticos, esquematizados na **Figura 1**, destacam-se: **(1) Inibição da síntese da parede celular**: β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas) e glicopeptídeos (vancomicina) interferem na formação do peptidoglicano, essencial para a integridade da parede celular bacteriana; **(2) Inibição da síntese proteica**: antimicrobianos como aminoglicosídeos, macrolídeos e tetraciclina atuam nos ribossomos bacterianos, impedindo a tradução; **(3) Inibição da duplicação do DNA ou da síntese do RNA**: As fluoroquinolonas (ex., ciprofloxacino) inibem a DNA girase e a topoisomerase IV, a rifampicina inibe a RNA polimerase, enzimas vitais para a replicação do material genético; **(4) Inibição da síntese do folato**: Sulfonamidas e trimetoprima bloqueiam a síntese de folato, uma via metabólica essencial para a sobrevivência bacteriana; **(5) Despolarização do potencial de membrana**: Daptomicina liga-se à membrana citoplasmática bacteriana de maneira dependente de cálcio, resultando na perda de íons essenciais, como potássio; isso interfere na produção de ATP e outros processos metabólicos; e **(6) Lise da membrana plasmática**: Polimixinas são moléculas catiônicas anfipáticas que atuam na membrana externa de bactérias Gram-negativas; se ligam

preferencialmente ao fosfato do lipídeo A, presente nos lipopolissacarídeos (LPS), neutralizando suas cargas negativas e desestabilizando a membrana externa; adicionalmente, inserem-se na membrana citoplasmática interna, comprometendo sua integridade estrutural e causando perda de componentes celulares essenciais, o que culmina em morte celular por lise osmótica. Esses mecanismos visam alvos específicos das células bacterianas, minimizando os efeitos sobre células humanas, embora possam ocorrer efeitos colaterais e o desenvolvimento de resistência bacteriana, fenômeno que representa um desafio crescente à eficácia terapêutica (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007; LOUREIRO *et al.*, 2016; OLIVEIRA; SILVA, 2018; SANTOS; COSTA, 2019; VENDICHETIS, 2021, grifo nosso).

Figura 1 – Mecanismos de ação dos antibióticos.



(1) Inibição da síntese da parede celular; **(2)** Inibição da síntese proteica; **(3)** Inibição da duplicação do DNA ou da síntese do RNA; **(4)** Inibição da síntese de folato; **(5)** Despolarização do potencial de membrana e **(6)** Lise da membrana plasmática. GTP = Guanosina Trifosfato; DHP = Dihidropteroato; DHF = Dihidrofolato; THF = Tetraidrofolato; dUMP = Desoxiuridina Monofosfato; dTMP = Desoxitimidina Monofosfato; dTTP = Desoxitimidina Trifosfato.

Fonte: CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007, modificado por NANES-LIMA, 2024.

Em 2019, o FDA também aprovou o **cefiderocol**, uma nova cefalosporina siderófora que utiliza uma estratégia inovadora para entrar na célula bacteriana, conhecida como 'Cavalo de Troia'. Esse antibiótico se liga ao íon férrico (Fe^{3+}) e aproveita o sistema de transporte de ferro das bactérias Gram-negativas para penetrar no interior da célula (SYED, 2021, grifo nosso). Uma vez dentro da célula, o cefiderocol se dissocia do ferro e se liga às proteínas de ligação à penicilina (PBPs), inibindo a síntese de peptidoglicano, o que resulta na lise e morte celular. A estratégia permite que alcance altas concentrações no espaço periplasmático. Além disso é estável contra todas as classes de β -lactamases, incluindo carbapenemases de serina e metalo- β -lactamases (VIM, IMP e NDM) e mantém sua atividade mesmo na presença de bombas de efluxo e alterações nos canais de porinas (KAZMIERCZAK *et al.*, 2019). É eficaz contra bactérias MDR, incluindo linhagens de Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Burkholderia cepacia* (SYED, 2021).

2.3.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A emergência da resistência bacteriana representa um desafio crescente e urgente para a saúde pública global. Desde a introdução pioneira da penicilina na prática clínica; que foi descoberta por Alexander Fleming em 1928 e produzida em escala industrial na década de 1940; as bactérias demonstraram uma notável capacidade de resistir a esses agentes terapêuticos, na mesma década foram isoladas linhagens de *S. aureus* resistentes. A resistência é atribuída a uma interação complexa entre características intrínsecas e adquiridas dos microrganismos, resultando na seleção de clones multirresistentes ao longo do tempo. Esse fenômeno é particularmente exacerbado em ambientes hospitalares, onde a pressão seletiva é significativamente elevada (SILVA, 2017; TAVARES, 2020).

A resistência aos antibióticos pode ser alcançada através da aquisição horizontal de genes de resistência, carregados por plasmídeos ou transposons, por recombinação de DNA exógeno no cromossomo, ou por mutações em diferentes *loci* cromossômicos (DAVIES, 1997; MARTINEZ; BAQUERO, 2000).

Além da ampla disseminação da resistência aos antibióticos convencionais, alternativas terapêuticas, como as fluoroquinolonas e as cefalosporinas, e a

emergência de resistência as polimixinas, uma classe de antimicrobianos de uso restrito hospitalar, suscitam preocupações adicionais. As polimixinas são reservadas para o tratamento de infecções hospitalares causadas por bacilos Gram-negativos MDR, devido à sua eficácia (DAVIES; DAVIES, 2010).

Em 2016, foi relatada a descoberta do gene *mcr-1* (*mobilized colistin resistance*), que confere resistência a colistina, também conhecida como polimixina E, e sua disseminação global foi rápida, estando presente em quase todos os continentes. Subsequentemente, novas variantes do gene surgiram em diferentes regiões, principalmente na Europa e Ásia, demonstrando a rápida evolução e disseminação dessa resistência bacteriana como um desafio significativo em escala mundial (FABRIN; VIZZOTTO, 2019). Martins (2022) descreveu a presença crescente dessa resistência em isolados provenientes de casos de infecção de corrente sanguínea na cidade de Salvador, BA; um total de 22,0% dos isolados foram resistentes a polimixina, destes 72,8% foram *Klebsiella pneumoniae* e 27,2% foram *Escherichia coli*.

O uso intenso e desenfreado de antimicrobianos aumentou drasticamente a frequência de resistência entre os patógenos humanos, ameaçando assim uma era pós-antibiótica com a perda das opções terapêuticas (LEUNG *et al.*, 2011), resultando na seleção de diferentes clones multirresistentes. Estas células bacterianas são resistentes a pelo menos dois grupos de antimicrobianos com diferentes mecanismos de ação (ALEKSHUN; LEVY, 2007). O grupo de bactérias conhecido como ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter* spp.) é comumente associado a infecções cutâneas, especialmente em ambientes hospitalares, com inúmeras linhagens demonstrando multirresistência (VALE DE MACEDO *et al.*, 2021).

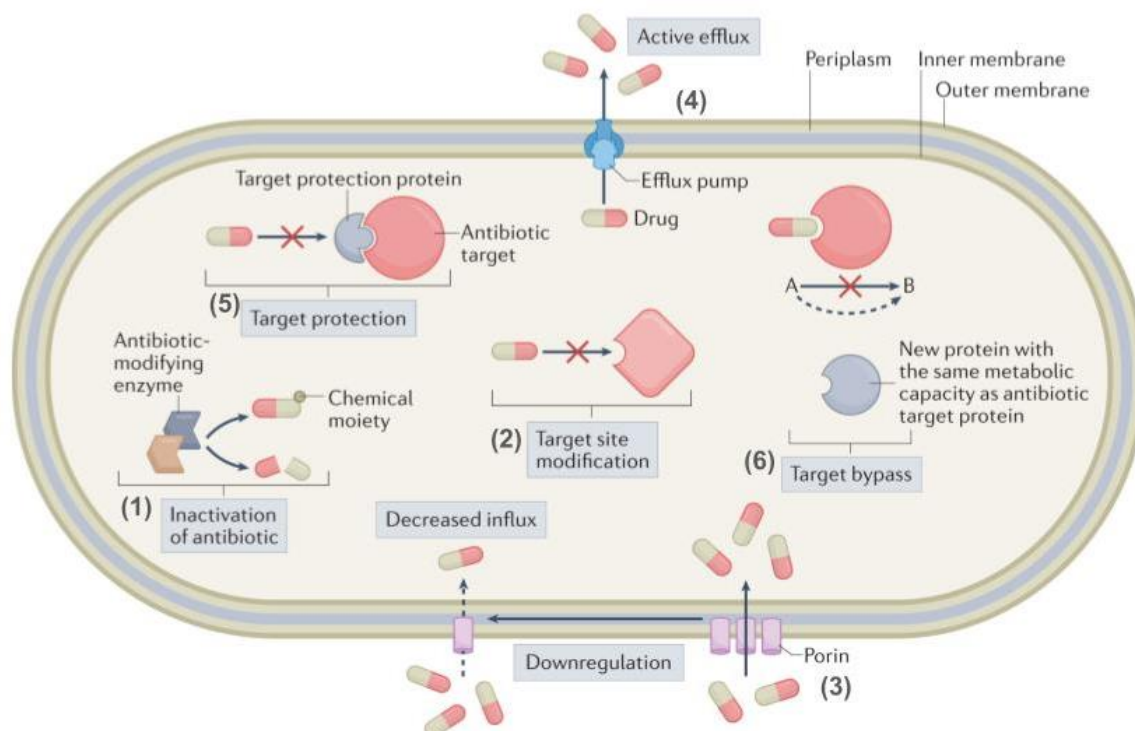
2.3.2.1 Mecanismos moleculares de resistência bacteriana

Os mecanismos moleculares de resistência bacteriana aos antibióticos são diversos e estão esquematizados na **Figura 2: (1) Inativação ou modificação enzimática do antibiótico**: Esse mecanismo ocorre por meio da ação de enzimas

bacterianas que degradam ou modificam a molécula do antibiótico. A degradação enzimática, como a realizada pelas β -lactamases, envolve a hidrólise de grupos funcionais essenciais das penicilinas, cefalosporinas e carbapenems, tornando-os ineficazes (DE PASCALE; WRIGHT, 2010, grifo nosso). Já as enzimas modificadoras de antibióticos transferem grupos químicos (como acetil, fosforil ou adenil), impedindo que o fármaco se ligue ao seu alvo molecular, tais como as que conferem resistência aos aminoglicosídeos em estafilococos (WRIGHT, 2005); **(2) Modificação do sítio-alvo**: Este mecanismo reduz a afinidade entre o ligante e seu alvo bacteriano, frequentemente devido a mutações nos genes que codificam essas proteínas-alvo ou pela modificação enzimática do sítio de ligação. Exemplos incluem alterações na DNA girase e topoisomerase IV, que conferem resistência às fluoroquinolonas, e na PBP, característica de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (LOUREIRO *et al.*, 2016; SCHAENZER; WRIGHT, 2020, grifo nosso); **(3) Redução da permeabilidade da membrana externa**: A diminuição do influxo é mediada por alterações na estrutura da membrana bacteriana, por exemplo, a regulação negativa das porinas, que são proteínas transmembrana que permitem o transporte passivo de várias moléculas, como antibióticos, para a célula bacteriana. Ocorre em bactérias Gram-negativas como *P. aeruginosa* com perda da porina D2 resistente ao imipenem (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012, grifo nosso); **(4) Efluxo ativo de antibióticos**: As bombas de efluxo, proteínas transmembrana, removem os antibióticos do interior da célula, reduzindo sua concentração intracelular e eficácia. Essas bombas podem ser específicas para um único fármaco ou multiespecíficas, expelindo diversas moléculas antimicrobianas. A bomba de efluxo NorA, presente em *S. aureus*, expelle fluoroquinolonas, corantes e biocidas (WEBBER; PIDDOCK, 2003, grifo nosso); **(5) Proteção do sítio-alvo**: Fenômeno pelo qual uma proteína de resistência se associa fisicamente ao alvo do antibiótico impedindo a ação do fármaco. São exemplos as Proteínas de Proteção Ribossomal à Tetraciclina (do inglês, *Tetracycline Ribosomal Protection Proteins* - TRPP) em estreptococos, enterococos e estafilococos (WILSON; HAURYLIUK; ATKINSON; O'NEILL, 2020, grifo nosso); **(6) Desvio (Bypass) do alvo molecular**: A bactéria desenvolve vias alternativas ou utiliza novas proteínas para desempenhar a função do alvo inibido, tornando o alvo original redundante e o antibiótico ineficaz, inclui alteração metabólica de trimetoprima ou sulfonamidas e

hiperprodução de ácido p-aminobenzoico (THEN, 1982, grifo nosso). Esses mecanismos frequentemente coexistem, agravando o desafio terapêutico e exigindo estratégias integradas de controle e novas opções terapêuticas (DARBY *et al.*, 2023).

Figura 2 – Mecanismos moleculares de resistência bacteriana.



(1) Inativação ou modificação enzimática do antibiótico; (2) Modificação do sítio-alvo; (3) Redução da permeabilidade da membrana externa; (4) Efluxo ativo de antibióticos; (5) Proteção do sítio-alvo; (6) Desvio (*Bypass*) do alvo molecular.

Fonte: Adaptado de DARBY *et al.*, 2023.

2.3.3 BACTÉRIAS

2.3.3.1 *Staphylococcus* spp.

Nesse gênero destacam-se com multirresistência: *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA, **M**ethicilin-**R**esistant-**S**taphylococcus *aureus*) e resistente a vancomicina (VRSA, **V**ancomycin-**R**esistant-**S**taphylococcus *aureus*) (ALEKSHUN; LEVY, 2007). *S. aureus* continua sendo um dos principais causadores de infecções, tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade, com a prevalência de MRSA tendo importância mundial (ROSSOLINI; MANTENGOLI, 2008). No entanto, linhagens

sem *mecA*, denominadas resistentes a meticilina sem *mec*, MRLM (do inglês - **M**ethicillin-**R**esistant **l**acking **mec**), também podem apresentar resistência aos β -lactâmicos de nova geração. Este estudo revela que mutações nos genes que codificam PBP4 e GdpP podem sinergicamente mediar essa resistência, sugerindo novos mecanismos e a necessidade de reconsiderar os protocolos de diagnóstico e tratamento para infecções por *S. aureus* resistentes aos β -lactâmicos (LAI *et al.*, 2024).

A infecção por *Staphylococcus* spp. resistentes a múltiplos antimicrobianos, incluindo *Staphylococcus epidermidis* multirresistente (MDRSE), é uma preocupação significativa em ambientes hospitalares. A vancomicina é frequentemente usada como terapia empírica, e outras opções como teicoplanina e daptomicina são consideradas dependendo do contexto clínico (SICILIANO *et al.*, 2023).

Staphylococcus saprophyticus pode ser responsável por 10% a 20% dos casos de infecção do trato urinário (ITU) em mulheres jovens sexualmente ativas, sendo considerada a segunda bactéria mais comum nas ITUs nesse grupo de indivíduos (WARREN *et al.*, 1999). Em outro estudo realizado na cidade de São Paulo, no Brasil, também com isolados de trato urinário de ambos os sexos, a frequência de *S. saprophyticus* foi de 1,2%, demonstrando que o maior fator de risco ocorre nas mulheres entre 14 a 65 anos (MIRANDA *et al.*, 2014).

2.3.3.2 *Streptococcus* spp.

Os antibióticos β -lactâmicos, incluindo a penicilina, são usados há mais de 80 anos para tratar infecções causadas por *Streptococcus pyogenes*, ou *Streptococcus* β -hemolítico do Grupo A de Lancefield. Apesar de não se identificar *in vitro* linhagens resistentes a esta classe, falhas no tratamento clínico foram relatadas. Pesquisas sugerem que isso pode estar associada a vários fatores, incluindo redução da suscetibilidade, efeitos de inoculação bacteriana, formação de biofilme, efeito de bactérias coexistentes, persistência bacteriana e internalização nas células hospedeiras (GUO; YAO, 2024). *Streptococcus agalactiae*, outra espécie de estreptococo β -hemolítico, coloniza os tratos gastrointestinal e genitourinário de mulheres, de forma assintomática. Transmitido no parto, pode causar sepses e

meningites no neonato, aumentando os riscos de mortalidade. No estudo de Ribeiro e colaboradores (2021), penicilinas e cefalosporinas não apresentaram boa sensibilidade *in vitro* frente as linhagens isoladas de culturas de vigilância epidemiológica em gestantes.

Estreptococos do grupo viridans são um grupo heterogêneo de organismos que podem ser comensais humanos, colonizando os tratos gastrointestinal e geniturinário, além da mucosa oral. Embora geralmente de baixo potencial patogênico, eles podem causar doenças invasivas em certas populações. A resistência antimicrobiana varia dentro do grupo, sendo o *Streptococcus mitis* geralmente mais resistente (DOERN; BURNHAM, 2010). Dois isolados de endocardite resistentes a penicilina, *Streptococcus parasanguinis* e *S. mitis*, desenvolveram resistência de alto nível a daptomicina (HLDR) durante a passagem *in vitro* da daptomicina (PERICÀS *et al.*, 2019). Esses achados estão alinhados com os resultados de um estudo *in vitro* realizado em 2015, que demonstrou que linhagens de *S.* do grupo *Viridans* inicialmente susceptíveis a daptomicina adquiriram HLDR rapidamente quando expostas ao antibiótico (AKINS; KATZ; MONAHAN; ALEXANDER, 2015). Outro estudo de 2017 investigou o impacto da HLDR no grupo *Streptococcus mitis/oralis*. Os pesquisadores observaram que essas bactérias têm uma propensão a desenvolver rapidamente resistência significativa a daptomicina, o que representa um desafio no tratamento de infecções como a endocardite (GARCIA-DE-LA-MARIA *et al.*, 2017).

2.3.3.3 *Enterococcus* spp.

Entre os enterococos destacam-se com maior frequência os isolados de *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina (VRE, Vancomycin-Resistant-*Enterococcus*) (ALEKSHUN; LEVY, 2007). Em 2005, a proporção de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VRE) entre isolados invasivos ultrapassou 30% em quatro países europeus (Grécia, Irlanda, Portugal e Reino Unido), bem como em Israel, enquanto em outros países, essa proporção permaneceu consistentemente baixa ou os VRE estavam praticamente ausentes. Alguns países afetados pelas taxas mais altas observaram uma tendência crescente, com um preocupante ressurgimento de *E. faecium* resistente a vancomicina, relatado na Inglaterra e no País de Gales em

2008. A proporção de linhagens resistentes a vancomicina permanece muito menor entre *Enterococcus faecalis* (ROSSOLINI; MANTENGOLI, 2008).

2.3.3.4 Enterobacterales

Nessa ordem, destacam-se com maior frequência os isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* com espectro estendido as β -lactamases (ALEKSHUN; LEVY, 2007). Normalmente, as bactérias multirresistentes (MDR) estão associadas a infecções nosocomiais. No entanto, algumas bactérias MDR tornaram-se causas prevalentes de infecções adquiridas na comunidade desde o início do século (VAN DUIN; PATERSON, 2016).

Os produtores de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) surgiram na década de 1980 devido à pressão seletiva causada pela introdução das cefalosporinas de terceira geração ou oximinocefalosporinas, que foram originalmente desenvolvidas como antibióticos capazes de superar a resistência causada pelas β -lactamases mais comuns (BRADFORD, 2001). A evolução das ESBLs ocorreu por dois mecanismos: seleção de mutantes em plasmídeos TEM e SHV, e emergência de novas enzimas como VEB, GES, TLA, SFO e BES por transferência horizontal de genes (MEDEIROS, 1997). Os carbapenêmicos são os únicos β -lactâmicos eficazes contra Enterobacterales produtoras de múltiplas ESBLs. A resistência adquirida aos carbapenêmicos podem surgir por dois mecanismos: perda de porinas em linhagens de *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., ou produção de uma carbapenemase (ROSSOLINI; MANTENGOLI, 2008).

A primeira bactéria com o fenótipo de resistência associado à enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) foi identificada nos Estados Unidos em 2001, em um hospital na cidade de Raleigh, Carolina do Norte (YIGIT *et al.*, 2001). Em relação ao Brasil, o primeiro surto de infecção por bactérias produtoras de KPC foi relatado em 2006, no Hospital Israelita Albert Einstein, em São Paulo (ANDRADE *et al.*, 2006). Desde então, os casos de infecções por bactérias portadoras de KPC têm sido reportados em várias regiões do país, representando um desafio significativo para o controle de infecções hospitalares (ENDIMIANI *et al.*, 2009). A NDM-1 (*New Delhi* metalo- β -lactamase) é outra carbapenemase produzida por enterobactérias, que

tem maior afinidade pelos carbapenêmicos, dificultando ainda mais a eficácia dos antibióticos (FORESTO *et al.*, 2021).

2.3.3.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno bacteriano associado a uma ampla gama de infecções e utiliza diversas estratégias para estabelecer e manter a infecção, incluindo produção de biofilme, resistência a múltiplos medicamentos e tolerância a antibióticos. A resistência aos aminoglicosídeos, em particular, é uma grande preocupação nas infecções por *P. aeruginosa* (SINDELDECKER; STOODLEY, 2021). Nos países da Europa Oriental, são encontradas taxas de resistência a piperacilina, ceftazidima, carbapenêmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos que em alguns casos (por exemplo, na Romênia) pode ultrapassar 50% desde a década passada (ROSSOLINI; MANTENGOLI, 2008).

É ainda mais preocupante quando *P. aeruginosa* produz KPC, tornando o tratamento mais difícil e aumentando a morbidade e a mortalidade associadas a essas infecções (ANDRADE *et al.*, 2006). O primeiro relato da produção da enzima KPC por *P. aeruginosa* ocorreu em Medellín, na Colômbia, em três linhagens com alto nível de resistência a carbapenêmicos (CIM \geq 256 $\mu\text{g/mL}$). Essa informação pode ser encontrada no artigo publicado por Villegas e colaboradores em 2007.

2.3.4 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS

Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração de um agente antibacteriano; apresentada em mg/L (ou $\mu\text{g/mL}$) que; sob condições *in vitro* estritamente controladas, impede completamente o crescimento visível do microrganismo teste (EUCAST, 1998).

O caldo Müller Hinton (cMH) é recomendado para testes de sensibilidade antimicrobiana devido à sua composição padronizada, que inclui teores específicos de cálcio e magnésio. Esses íons são importantes para garantir a uniformidade dos resultados das análises. O cálcio e o magnésio ajudam a estabilizar a atividade dos

antimicrobianos e a manter a integridade das células bacterianas durante o teste (JORGENSEN; FERRARO, 2009; CLSI, 2020; BrCAST, 2023).

As raízes da determinação da CIM (ou MIC – do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*) remontam ao início do século XX (TIWARI; NIZET; DILLON, 2023). Na Microbiologia Clínica a utilização dos valores de CIM pode facilitar a eficácia da antibioticoterapia, embora a determinação desse valor seja desafiadora nos laboratórios devido aos métodos recomendados pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* - EUCAST e *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI. O método de microdiluição em caldo é amplamente reconhecido como o mais confiável; no entanto, quando realizado manualmente, é um processo minucioso e trabalhoso, que exige uma abordagem cuidadosa e demanda um tempo significativo para a obtenção dos resultados. Vale ressaltar que a informação sobre a suscetibilidade da linhagem, derivada da CIM, pode não ser totalmente precisa devido a mecanismos bacterianos como resistência heterogênea, tolerância ou persistência, que podem escapar da detecção rotineira no laboratório. Infelizmente, essas características dos microrganismos podem levar ao fracasso do tratamento, mesmo com a escolha adequada da terapia antibiótica (KOWALSKA-KROCHMAL; DUDEK-WICHER, 2021).

Além da determinação da CIM, outros testes *in vitro* são usados no laboratório de pesquisa para investigar a atividade antibacteriana, como a determinação da **Concentração Bactericida Mínima** (CBM), a modulação, a associação de moléculas sintéticas com antibióticos licenciados, por exemplo, o teste *checkerboard* (LORIAN, 2005; ODDS, 2003; TAHERPOUR; BEHNAM POUR, 2014), a avaliação da atividade antibiofilme (ROCHA, 2021) e a cinética de crescimento microbiano (*Time-kill*) (EDUARDO *et al.*, 2018; ROSA, 2018).

2.3.4.1 *Docking* molecular

Usando o design computacional por meio de métodos como análise QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*), triagem virtual e acoplamento molecular, é possível prever a atividade biológica de moléculas, identificar novos inibidores e otimizar suas interações com alvos terapêuticos. Além disso, o uso de bancos de

dados e ferramentas computacionais especializadas, como algoritmos de aprendizado de máquina e análise de híbridos, permite a exploração e identificação de alvos terapêuticos promissores, como peptídeos de sensoriamento do quórum (QSPs), essenciais para o tratamento de infecções bacterianas. Essas abordagens computacionais permitem uma pesquisa mais eficiente e rápida, contribuindo para o desenvolvimento de novas terapias e biomarcadores contra patógenos infecciosos e resistência a antibióticos (KUMAR *et al.*, 2022; KUMAR *et al.*, 2023; QANDEEL *et al.*, 2024; THAI *et al.*, 2015).

O *docking* molecular destaca-se como um dos métodos mais amplamente utilizados na modelagem molecular. Essa abordagem computacional tem como objetivo principal alcançar uma interação precisa entre duas moléculas, simulando o processo de reconhecimento molecular. Através da previsão da orientação, é possível formar um complexo que serve de base para a estimativa da afinidade de ligação ou da força de associação entre as moléculas envolvidas, permitindo assim a priorização daquelas que apresentam uma melhor interação com seu parceiro molecular. Em palavras mais simples; o *docking* molecular envolve o estudo das interações entre uma molécula (como um candidato a fármaco) e uma proteína-alvo por meio de simulações computacionais (SANTOS, 2021). O *Worldwide Protein Data Bank* (wwPDB) é o repositório global de estruturas 3D de macromoléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos. Costa e colaboradores (2017) realizaram estudos de modelagem molecular de compostos, sendo possível selecionar os ligantes 17, 25 e 68 derivados da acrilamida que fizeram interação com resíduos importantes da serino protease NS3/NS2B, enzima essencial para o ciclo de vida do vírus da Dengue. Este é um exemplo do uso desse tipo de *design* computacional realizado com acrilamida em alvos virais, podendo ser usado também para alvos de proteínas bacterianas.

A contínua evolução da resistência bacteriana representa um desafio persistente na prática clínica, destacando a necessidade urgente de desenvolver estratégias inovadoras para combater infecções. É amplamente reconhecido que a resistência bacteriana é um fenômeno dinâmico, impulsionado pela capacidade adaptativa dos microrganismos em resposta à pressão seletiva exercida pelos antibióticos. No entanto, à medida que os mecanismos de resistência se diversificam

e se fortalecem, é essencial buscar constantemente novas abordagens terapêuticas (DAVIES; DAVIES, 2010; VENTOLA, 2015).

Nesse contexto, a descoberta de novas classes de antibióticos e o desenvolvimento de compostos antimicrobianos inovadores desempenham um papel crucial na manutenção da eficácia dos tratamentos de infecções. As pesquisas em andamento nas duas últimas décadas têm explorado diversas fontes, incluindo a bioprospecção de microrganismos do solo e do mar (LING *et al.*, 2015; LEWIS, 2020), bem como a síntese de moléculas (PEREIRA, 2016; SANTOS, 2017). Além disso, esforços contínuos têm sido direcionados para a identificação de moléculas que possam atuar de maneira sinérgica com antibióticos licenciados, restaurando assim a eficácia desses agentes contra linhagens resistentes (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; SANGI, 2016).

A crescente resistência bacteriana, evidenciada pelo aumento alarmante de isolados multirresistentes em ambientes hospitalares e na comunidade, destaca a necessidade urgente de um uso racional e criterioso dos antibióticos disponíveis. A descoberta de novas moléculas antimicrobianas e a otimização da eficácia dos antibióticos existentes são essenciais para enfrentar os desafios dessas infecções. Neste cenário, fenilacrilamidas e fenilacrilatos já demonstraram atividade promissora contra linhagens resistentes. Santos (2017) sintetizou derivados de 2-cianoacetamida, com as moléculas EE-01 e EE-04 mostrando atividade significativa contra *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923. Pereira (2016) também sintetizou fenilacrilatos, dos quais AL-09 demonstrou atividade promissora contra *S. aureus* ATCC 25923. É válido investigar a atividade antibacteriana destes e de outros grupos químicos de moléculas sintéticas em um número maior de linhagens bacterianas, pois essa abordagem é crucial para o avanço no desenvolvimento e inovação tecnológica em medicamentos. A análise de novas moléculas permite otimizar tratamentos e identificar potenciais terapias eficazes frente a bactérias multirresistentes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana e os efeitos toxicológicos de moléculas sintéticas das classes: fenilacrilamidas, fenilacrilatos, benzilidenemalononitrilas e hidrazina-1-carbotioamidas.

3.2 Objetivos específicos

Com relação as moléculas sintéticas

- Avaliar as propriedades físico-químicas, farmacológicas, farmacocinéticas e toxicológicas teóricas, assim como a bioatividade relacionada a importantes alvos de moléculas, utilizando softwares para triagem *in silico*;
- Avaliar a atividade hemolítica em eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O;
- Avaliar o efeito sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O;
- Avaliar a atividade oxidante e antioxidante sobre hemoglobina humana;
- Avaliar a atividade antibacteriana frente a linhagens bacterianas de referência e isolados de importância clínica;
- Avaliar a interferência sobre o efeito de antibióticos licenciados;
- Avaliar a modulação do efeito de antibióticos licenciados;
- Analisar a interação com possíveis alvos de antibióticos por ancoragem molecular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX II) no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), no campus I da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Produtos teste

As moléculas foram sintetizadas e cedidas pelo Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (LDSF), no campus I da Universidade Estadual da Paraíba, coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura.

Os derivados sintéticos foram solvatados; no momento da realização dos testes de avaliação do potencial hemolítico, efeito sobre fragilidade osmótica, potencial oxidante, potencial antioxidante e testes de atividade antibacteriana; com 20% de DMSO e 4% de Tween 80 [v/v] numa concentração de 10 mg/mL. Essa suspensão mãe posteriormente foi diluída nas concentrações padronizadas para os testes de citotoxicidade: 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL e 400 µg/mL.

Para os testes de determinação de concentração inibitória mínima (CIM), a suspensão mãe foi diluída em caldo Müller Hinton estéril na concentração de 4.096 µg/mL para obter a suspensão estoque, a fim de que posteriormente fosse obtida a suspensão teste na concentração de 2.048 µg/mL. Para os outros testes de atividade antibacteriana, como os de associação e modulação, a suspensão mãe foi diluída de acordo com a concentração pré-estabelecida exigida para cada uma destas análises baseadas nas CIMs determinadas para cada uma das linhagens testadas.

4.3 Linhagens bacterianas

Foram obtidas da Bacterioteca do Laboratório de Resistência Microbiana Clínica e Contemporânea (LaRMiCC) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). A linhagem ATCC 29213

(*American Typing Culture Collection*) foi cedida pelo Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho. No LABETOX II foram armazenadas em tubos contendo ágar BHI inclinado (Brain Heart Infusion ágar) e cobertos com óleo mineral estéril, mantidos a uma temperatura entre 4 e 8 °C. Para a realização dos experimentos, foram reativadas em Fluido Thioglicolato (0,5 g tioglicolato de sódio; 5,5 g dextrose; 0,5 g de L-cistina; 5 g extrato de levedura; 15 g caseína enzimática hidrolisada; 2,5 g NaCl; 0,001 g resazurina de sódio para 1 L; pH 7,1) e cultivadas em caldo BHI (12, 5 g pó infusão cérebro-coração bovino; 10 g peptona proteica; 2 g dextrose; 5 g NaCl; 2,5 g fosfato dissódico para 1 L; pH 7,4); ambos os meios foram incubados a 37 °C, por 24 horas; a partir do caldo BHI foram diluídas de acordo com cada metodologia.

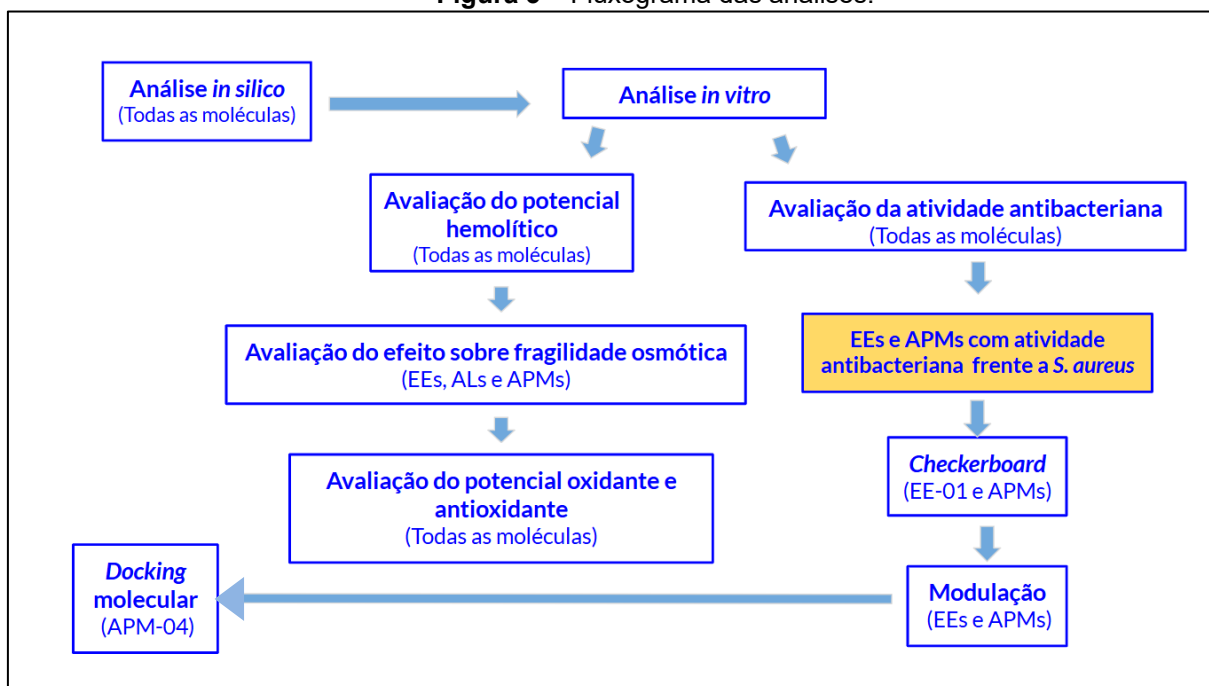
A seguir, estão listadas as linhagens bacterianas utilizadas neste estudo e os locais de isolamento dos isolados clínicos:

- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213;
- ✓ *Staphylococcus aureus* 01 (Foliculite);
- ✓ *Staphylococcus aureus* 02 (Foliculite. Da mesma secreção anterior.);
- ✓ *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 33591;
- ✓ *Staphylococcus aureus* MRSA 216 (Fossas nasais);
- ✓ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228;
- ✓ *Staphylococcus saprophyticus* (Urina);
- ✓ *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615;
- ✓ *Streptococcus agalactiae* (Secreção vaginal);
- ✓ *Streptococcus* do grupo *Viridans* (Orofaringe);
- ✓ *Streptococcus* do grupo *Viridans* ZN (Orofaringe);
- ✓ *Streptococcus* do grupo *Viridans* 216 (Orofaringe);
- ✓ *Enterococcus faecium* ATCC 6569;
- ✓ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212;
- ✓ *Enterococcus faecalis* VRE ATCC 51299;
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922;
- ✓ *Escherichia coli* ESBL+ (Abscesso);
- ✓ *Escherichia coli* H₂S+ ESBL+ (Ferida cirúrgica de membro amputado);

- ✓ *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883;
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603 ESBL+;
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* KPC+ (Sangue);
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* ESBL+ (Urina);
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* MDR (Ferida cirúrgica);
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* PA01.

Na **Figura 3**, é apresentado um fluxograma que ilustra a sequência das análises realizadas e os testes aplicados a cada grupo de moléculas. Este esquema detalha o processo metodológico executado cronologicamente, ajudando a visualizar claramente as etapas envolvidas na avaliação do perfil antibacteriano e efeitos toxicológicos.

Figura 3 – Fluxograma das análises.



EEs = fenilacrilamidas; **ALs** = fenilacrilatos; **APMs** = benzilidenemalononitrilas; **EE-01** = (2E) 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **APM-04** = 2,6-Diclorobenzilidenemalononitrila.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

4.4 Triagem *in silico*

A obtenção dos dados dos softwares PASS Online© e admetSAR© foi realizada em parceria com Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho do Laboratório de Bioquímica da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

4.4.1 Molinspiration©

Essa ferramenta de quimioinformática foi empregada, entre outros propósitos, para realizar cálculos das propriedades moleculares, incluindo coeficiente de partição etanol-água (miLogP) e área de superfície polar topológica (TPSA). Adicionalmente, foram geradas representações tridimensionais das estruturas moleculares usando o *Galaxy Visualizer*. Para tanto, fez-se uso do software Molinspiration©. www.molinspiration.com

4.4.2 PASS Online©

A previsão do espectro de atividade biológica teórica dos derivados sintéticos no organismo humano foi realizada utilizando o PASS Online©. Este software, que tem como base as estruturas moleculares, fornece um conjunto de atividades prováveis, oferecendo múltiplas possibilidades de ação biológica para uma substância específica. Isso é feito por meio da interpretação da taxa de probabilidade, sendo **Pa** a probabilidade de “ser ativo” e **Pi** a probabilidade de “ser inativo”. www.passonline.org/.

4.4.3 admetSAR©

A análise da toxicidade teórica foi realizada utilizando o software admetSAR© que a partir de predições determina; entre outros parâmetros; o potencial mutagênico de AMES, potencial carcinogênico, toxicidade em *Tetrahymena pyriformis*, toxicidade oral aguda, carcinogenicidade de classe III, e Dose Letal 50

(DL₅₀) em ratos. O estudo é baseado em triagem *in silico* dos parâmetros ADME/T (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1> (CHENG *et al.*, 2012). A previsão das características ‘teste de micronúcleo’ e ‘toxicidade reprodutiva’ foi computada na versão 2.0 do software admetSAR© desenvolvido por Hongbin Yang e colaboradores (2018) <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>

4.4.4 Docking molecular

O design computacional foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Joelmir Lucena Veiga da Silva da Faculdade de Medicina de Olinda. Os experimentos de ancoragem molecular foram realizados usando o portal online DockThor (MAGALHÃES *et al.*, 2014).

O resultado das simulações das moléculas teste foram ranqueadas em ordem de maior afinidade com os alvos PBP4, NorA e α -HL de linhagens de *S. aureus*. As descrições, códigos PDB (*Protein Data Bank*), DOI (*Digital Object Identifier*) e a data da última revisão das estruturas das biomoléculas utilizadas foram:

- Para **PBP4** - *Crystal Structure of penicillin-binding protein 4* (PBP4) from *Staphylococcus aureus* / Código: 1TVF / PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb1tvf/pdb>; (23/agosto/2023).
- Para **NorA** – *Protonated state of NorA at pH 5.0* / Código: 8TTE / PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb8tte/pdb> / (03/ julho/2024).
- Para **α -HL** - *ALPHA-HEMOLYSIN FROM STAPHYLOCOCCUS AUREUS* / Código: 7AHL / PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb7ahl/pdb> / (06/março/2024).

As três melhores configurações, isto é, com maior afinidade de ligação no alvo, foram escolhidas para análises mais detalhadas e visualizadas pelo programa Chimera (versão 1.14). As interações químicas entre as substâncias e os resíduos de aminoácidos envolvidos foram determinadas também pelo Chimera. As afinidades (energias) foram expressas como média mais ou menos e.p.m. (erro padrão da média) e comparadas utilizando o programa GraphPad Prism® 5.0.1, com o teste “t”, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4.5 Eritrócitos humanos

Os eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O foram oriundos de bolsas contendo concentrado de hemácias (CHM) de doadores saudáveis da Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba que não podem mais ser utilizadas para transfusão. A utilização do sangue para pesquisa científica foi autorizada pelo doador, em termo de consentimento livre e esclarecido, no momento da coleta do sangue pelo Hemocentro da Paraíba. A utilização dos eritrócitos foi realizada em concordância com a RDC N° 55 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2015), que dispõe sobre as boas práticas em tecidos humanos para uso terapêutico. O descarte foi realizado de acordo com as Normas de Segurança da referida Unidade Transfusional.

4.6 Avaliação do potencial hemolítico

As moléculas teste em concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL foram misturadas com 2 mL de suspensão de hemácias humanas a 0,5% dos tipos A, B e O; e incubadas por 60 minutos a 22 ± 2 °C sob agitação lenta e contínua (80 rpm) em agitador de Kline. Uma suspensão de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0 % de hemólise) e uma suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% como controle positivo (100 % de hemólise). Decorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm durante 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL *et al.*, 1997; KUMAR; LOGANATHAN; RAO, 2011). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como a média das três avaliações em porcentagem sendo calculada em relação ao resultado do controle positivo utilizando a fórmula.

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{Absorbância do teste (540 nm)} \times 100}{\text{Absorbância do controle positivo (Triton X - 100)}}$$

4.7 Avaliação do efeito sobre fragilidade osmótica

As moléculas teste em concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL foram incubadas em tubos Eppendorf na presença de 2 mL de suspensão de eritrócitos humanos (0,5%); dos tipos sanguíneos A, B e O e mantidos em agitação lenta e contínua (80 rpm) por 1 h a 22 ± 2 °C. Em seguida, a preparação foi centrifugada a 2.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi descartado. As hemácias foram ressuspensas em solução hipotônica de cloreto de sódio (0,24%) e colocadas em agitador de Kline a 80 rotações por minuto por 30 minutos a 22 ± 2 °C. A hemólise foi quantificada em espectrofotômetro a 540 nm. O controle negativo (0% de hemólise) foi uma suspensão de hemácias em solução fisiológica e o controle positivo (100% de hemólise) foi uma suspensão de hemácias na presença de cloreto de sódio 0,24% (DACIE; LEWIS, 2016). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como a média das três avaliações em porcentagem, sendo calculada em relação ao resultado do controle positivo utilizando a fórmula.

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{Absorbância do teste (540 nm)} \times 100}{\text{Absorbância do controle positivo (0,24\% NaCl)}}$$

4.8 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante

Para investigar o potencial oxidante das moléculas sintéticas frente a hemoglobina foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 30% em tampão fosfato-salino - PBS (16,97 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 3,83 g Na_2HPO_4 e 7,19 g NaCl para 1 L; pH 7,4) suplementado com glicose (200 mg/dL; pH 7,6) segundo Arbos e colaboradores (2008). Em seguida, as moléculas teste nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL; foram adicionadas a 2 ml da suspensão de eritrócitos e incubados por um período de 1 hora sob agitação lenta e constante (80 rpm) a 22 ± 2 °C. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm durante 5 minutos, diluídas em tampão fosfato-salino PBS-M/60 (2,25 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 1,43 g KH_2PO_4 para 1 L), segundo Naoum *et al.* (2004), e a porcentagem de metaemoglobina (MHb) em relação a

hemoglobina (Hb) total foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 630 nm e 540 nm, respectivamente. A porcentagem de MHb formada foi comparada com os valores obtidos para a fenilhidrazina (PH), um comprovado agente oxidante (WEFFORT-SANTOS *et al.*, 2008). Para investigar o potencial antioxidante, após o período incubação de 1h referente a etapa descrita anteriormente, foi adicionado 1 mmol/L do agente oxidante fenilhidrazina. As suspensões foram aeradas e mantidas sob agitação lenta e constante (80 rpm) por mais 30 minutos a 22 ± 2 °C. Decorrido este período, as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm durante 5 minutos, diluídas em tampão fosfato-salino PBS-M/60 (2,25 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 1,43 g KH_2PO_4 para 1 L) e a porcentagem de MHb em relação a Hb total foi quantificada por espectrofotometria a 630 nm e 540 nm. Os valores normais de MHb variam entre 1,9 e 3,8%, acima de 4,0% considera-se elevada. A porcentagem de MHb formada foi comparada com os valores obtidos para a fenilhidrazina (CAMARGO *et al.*, 2007). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como a média das três avaliações em porcentagem, sendo calculada em relação ao resultado do controle positivo utilizando a fórmula.

$$\% \text{MHb} = \frac{\text{Absorbância do teste em 630 nm} \times 100}{\text{Abs. do teste em 630 nm} + (\text{Abs. do teste em 540 nm} \times 10)}$$

4.9 Estatística

Para a análise dos dados referentes à avaliação do potencial hemolítico, do efeito sobre a fragilidade osmótica, do potencial oxidante e antioxidante, foi calculado o desvio padrão amostral (SD), sendo então expressos em porcentagem. Em resultados apresentados dessa forma, não há necessidade de incluir o SD no gráfico ou na tabela, já que a transformação em porcentagem equaliza a escala dos valores e reduz a relevância de variações absolutas entre os pontos; ou seja; ao converter os resultados em porcentagem, se reduz o peso das variações absolutas e prioriza-se a clareza na interpretação das tendências gerais dos dados, especialmente em gráficos concentração-resposta (CURRAN-EVERETT; BENOS, 2004;

LUDBROOK, 2008). Optou-se também por não calcular o erro padrão da média (SEM), pois o SD já reflete adequadamente a variabilidade dos dados (MACASKILL, 2018). Além disso, as hemácias utilizadas em cada experimento provinham de uma única bolsa por tipo sanguíneo para cada molécula testada, o que minimiza variações biológicas entre os ensaios. Esse controle reduz a necessidade de métricas adicionais, como o SEM, mais indicadas em estudos com maior heterogeneidade, como aqueles que utilizam tecidos de diferentes doadores ou animais. Assim, em condições controladas como as descritas, o SD é suficiente para descrever a variabilidade, garantindo objetividade nos resultados e alinhando-se aos padrões de apresentação na área desta pesquisa (LUDBROOK, 2008; MACASKILL, 2018).

4.10 Suspensão bacteriana

As linhagens bacterianas foram cultivadas nas condições específicas de crescimento considerando-se os nutrientes necessários, a temperatura e o tempo adequado, conforme item 4.3. Em seguida foram diluídas em NaCl 0,9% ou em caldo Müller Hinton - cMH (2 g extrato de carne bovino; 17,5 g hidrolisado ácido de caseína; 1,5 g amido; pH 7,3), a depender do experimento realizado; até atingir uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL (CLSI, 2012; BrCAST, 2023).

4.11 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Todas as linhagens bacterianas foram submetidas a teste de viabilidade em cMH na presença de DMSO e Tween 80, ambos a 5%, juntos e isolados, para eliminar a possibilidade de atividade antibacteriana pelos diluentes utilizados. A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em microplaca estéril com 96 poços e fundo “U”. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As moléculas sintéticas foram submetidas a diluição seriada a metade em cMH, resultando em concentrações que variaram de 1.024 µg/mL a 8 µg/mL. Somente o meio de cultura foi utilizado em um dos poços como controle negativo. Para as bactérias Gram-positivas, os antibióticos utilizados como controle foram a clindamicina

e o cloranfenicol e para as bactérias Gram-negativas, a amicacina e o cloranfenicol, nas concentrações de 1.024 µg/mL a 8 µg/mL. Posteriormente, a suspensão bacteriana, em solução fisiológica na escala 0,5 McFarland, foi diluída 20 vezes (1:20) em cMH para obter densidade 5×10^6 UFC/mL, em seguida alíquotas de 10 µL da suspensão bacteriana foram adicionadas aos poços obtendo uma concentração de células 5×10^4 UFC/mL, as microplacas foram então incubadas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 16-20 horas (CLSI, 2012). Passado este tempo foi adicionado 10 µL do corante resazurina, um indicador metabólico, na concentração de 0,02%, e as placas foram reincubadas em estufa bacteriológica por aproximadamente 2 horas. A leitura foi então realizada, a cor azul representa a ausência do crescimento bacteriano e a cor rosa a presença do crescimento bacteriano (PALOMINO *et al*, 2002). A concentração inibitória mínima foi definida como sendo a menor concentração onde não se detectou crescimento bacteriano (CLSI, 2012; CLSI, 2015).

4.12 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para determinar se a concentração bactericida mínima, uma alíquota de 1 µL dos poços que apresentaram inibição do crescimento bacteriano, durante a determinação da CIM, foi plaqueada em ágar Blood Ágar Base – ágar BAB (2 g pó de miocárdio bovino, 13 g de caseína pancreática digerida, 5 g extrato de levedura; 5 g de NaCl e 15 g de ágar para 1 L, pH 7,3) na ausência do produto teste e em seguida incubadas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 24h. A ausência de crescimento evidenciou o efeito bactericida enquanto que a ocorrência de crescimento comprovou o efeito bacteriostático. A CBM foi definida como a menor concentração da molécula - em µg/mL - capaz de eliminar todas as células bacterianas expostas (CLSI, 2012).

4.13 Associação entre molécula teste e cloranfenicol - *Checkerboard*

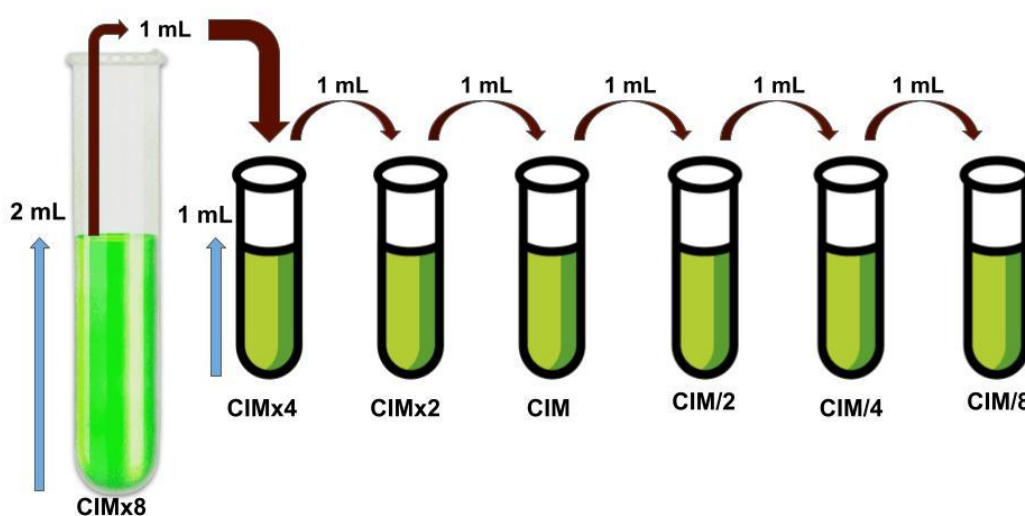
Para as linhagens da espécie *S. aureus* que tiveram CIM determinada frente as moléculas sintéticas; foi realizado ensaio de associação com o antibiótico licenciado cloranfenicol; pois esta espécie se destaca como patógeno e tem mecanismos de resistência bem determinados, sendo mais fácil encontrar alvos para

a realização do *docking* molecular no banco de proteínas. O estudo de associação foi conduzido utilizando a técnica de microdiluição por *Checkerboard* – em português, “tabuleiro de xadrez” - proposta por Lorian (2005) com modificações.

Inicialmente, foram preparadas diluições da molécula teste em concentrações crescentes e dobradas, com base na Concentração Inibitória Mínima (CIM) previamente determinada para a linhagem testada. Em tubos estéreis, foram obtidos 1.000 μ L das soluções em concentrações quatro vezes maiores, de modo que, ao adicionar posteriormente 50 μ L aos poços destinados à associação com o cloranfenicol na microplaca, as CIMs e suas concentrações sub-inibitórias correspondentes fossem alcançadas (CIMx8, CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4 e CIM/8), conforme esquematizado **Figura 4**.

A solução mãe de cloranfenicol, com uma concentração de 50 mg/mL, foi preparada no dia do uso utilizando álcool etílico, e subsequentemente diluída para alcançar uma concentração de 8.192 μ g/mL (Solução estoque: 0,820 mL da solução mãe com 4,18 mL de água destilada estéril). A partir dessa solução estoque, foram preparados 2 mL da solução teste de maior concentração (4.096 μ g/mL), diluindo-se em proporção de 1:1 em cMH, seguido de uma série de diluições em série 1:1 até atingir o tubo com uma solução na concentração de 4 μ g/mL.

Figura 4 - Esquema das diluições da molécula sintética.

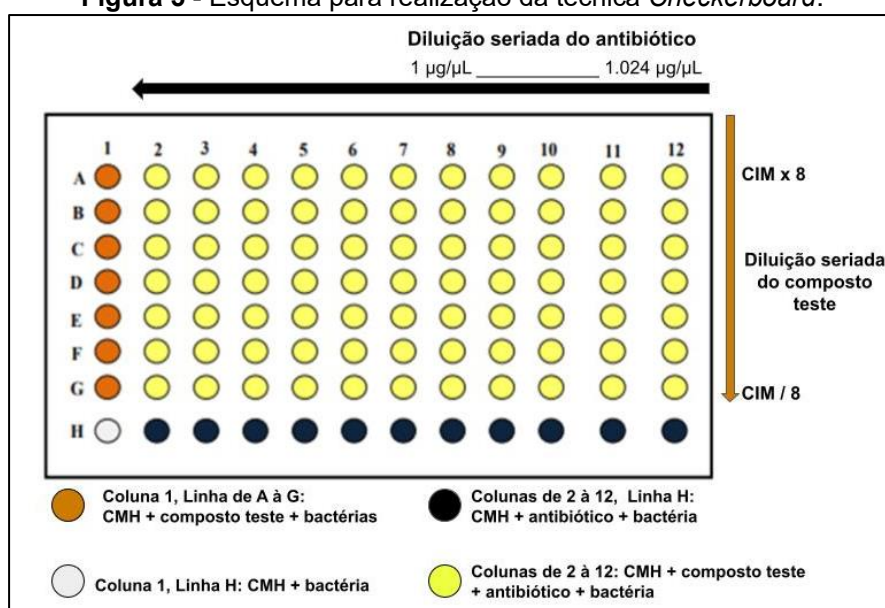


Fonte: NANES-LIMA, 2024.

A suspensão bacteriana foi padronizada segundo a recomendação do documento M07-A10, para o método de microdiluição, do CLSI (2015) com modificações. A partir de uma cultura de 24 horas, em caldo BHI, adicionou-se solução fisiológica estéril até atingir turvação igual a escala 0,5 McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL), seguida de leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da concentração de microrganismo, ajustando quando necessário até obter leitura de absorbância entre 0,080 - 0,100%. Posteriormente, foi realizada diluição 1:1.000 com cMH, obtendo-se concentração de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL, a qual foi utilizada no ensaio. A concentração final no poço é de cerca de 5×10^4 UFC/mL, após diluição 1:1, estando também de acordo com Lorian (2005).

Com tudo pronto para iniciar o experimento, foi adicionado 100 μ L de cMH ao poço H1 e 50 μ L nos poços da coluna 1 e da linha H da microplaca. Em seguida, 100 μ L da suspensão bacteriana foram distribuídos em todos os poços. Posteriormente, 50 μ L das concentrações da molécula teste foram adicionados horizontalmente, começando da linha A (com a concentração de CIMx8) e terminando na linha G (com a concentração CIM/8). Paralelamente, 50 μ L das diferentes concentrações de cloranfenicol foram adicionados verticalmente na microplaca, começando da coluna 12 (com 1.024 μ g/ μ L de cloranfenicol) e terminando na coluna 2 (com 1 μ g/ μ L de cloranfenicol), conforme mostrado na **Figura 5**. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Figura 5 - Esquema para realização da técnica *Checkerboard*.



Fonte: NANES-LIMA, 2024.

As microplacas foram incubadas por 24 horas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$. Após esse período foi adicionado 10 μL de solução do indicador metabólico resazurina a 0,02% (0,2 mg/mL) em solução aquosa estéril em cada um dos 96 poços. A microplaca foi reincubada em estufa bacteriológica por 2 horas sendo realizada então a leitura visual da presença ou ausência do crescimento bacteriano. Para a avaliação da interação entre os diferentes tratamentos foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (**ICIF**) de acordo com a fórmula.

$$ICIF = \frac{CIM \text{ da molécula em combinação}}{CIM \text{ da molécula isolada}} + \frac{CIM \text{ do antibiótico em combinação}}{CIM \text{ do antibiótico isolado}}$$

O ICIF foi calculado através da soma das concentrações inibitórias fracionadas (**CIFs**): CIF da molécula teste + CIF da molécula licenciada (o antibiótico cloranfenicol). Cada CIF, por sua vez, é calculado através da relação CIM da molécula associada / CIM da molécula isolada.

$$ICIF = CIF \text{ da molécula teste} + CIF \text{ do antibiótico}$$

A partir do ICIF obtido foi avaliada a interação seguindo a classificação descrita por Odds (2003), no **Quadro 6**.

Quadro 6 - Valores de ICIF correspondentes às diferentes interações.

Interpretação	Resultado do ICIF*
Sinergismo	$\leq 0,5$
Aditivo	$>0,5 \text{ e } <1$
Indiferente	$\geq 1 \text{ e } <4$
Antagonismo	≥ 4

*ICIF = Índice de Concentração Inibitória Fracionada

Fonte: ODDS, 2003.

4.14 Modulação do efeito do cloranfenicol e da tetraciclina pela molécula teste

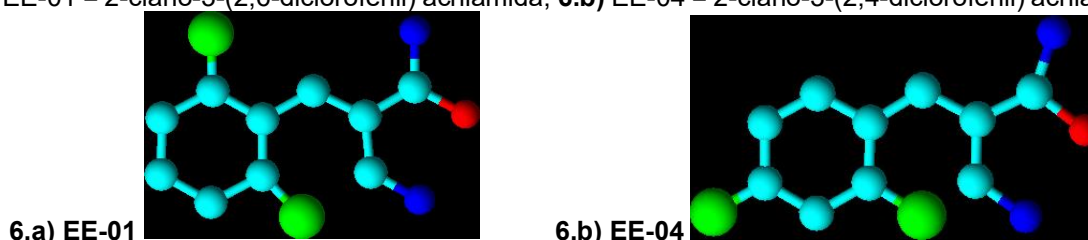
Com a CIM da molécula sintética previamente determinada, a superfície seca da placa de ágar Müeller-Hinton foi inoculada utilizando swab embebido em suspensão, contendo aproximadamente de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL (0,5 de McFarland) da linhagem testada, em toda a superfície. Repetiu-se o procedimento outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se o swab na margem da placa de ágar. A tampa do recipiente foi mantida parcialmente aberta por um período de três a cinco minutos, garantindo que não excedesse 15 minutos, a fim de permitir a absorção do excesso de umidade, conforme recomendado pelo CLSI (2015). Em seguida, os discos impregnados com os antibióticos licenciados foram aplicados com o auxílio de uma pinça. Simultaneamente, um dos discos foi impregnado com 20 μ L da concentração sub-inibitória da molécula sintética, enquanto o outro disco permaneceu sem a adição da molécula, para fins de comparação. Após a absorção do inóculo pelo ágar, a placa foi incubada a $35 \pm 2^\circ$ C por 18 ± 2 horas, e os halos de inibição foram posteriormente aferidos e comparados. Diferença de 3 mm ou mais indica atividade modulatória.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise *in silico*

EE-01, (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida, e EE-04, (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; com suas fórmulas estruturais em 3D mostradas na **Figura 6 (a-b)**, respectivamente; têm a mesma fórmula molecular ($C_{10}H_6Cl_2N_2O$) mas diferem na posição dos átomos de cloro no anel fenil. Na primeira molécula, os átomos de cloro (em verde) estão nas posições 2 e 6 do anel fenil, enquanto na segunda molécula, eles estão nas posições 2 e 4. Esses são chamados de isômeros de posição, pois a diferença entre eles está na posição dos substituintes no anel fenil. O “2E” refere-se à configuração geométrica da ligação dupla na molécula. Em química, “E” vem do alemão “*entgegen*”, que significa “oposto”. Nestes isômeros, os grupos de maior prioridade nos átomos de carbono que formam a ligação dupla estão em lados opostos. Esta nomenclatura é uma parte do sistema de nomenclatura E-Z usado para denotar a geometria de moléculas com ligações duplas (COSTA; MENEZES, 2015).

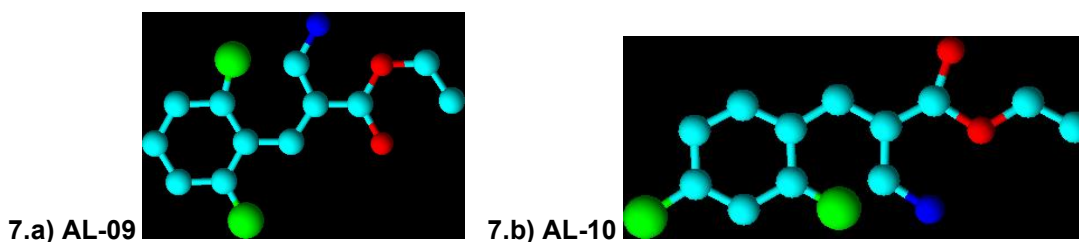
Figura 6 - Fórmulas estruturais em 3D das fenilacrilamidas projetadas no software ACD/ChemSketch®. **6.a)** EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **6.b)** EE-04 = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida.



Fonte: NANES-LIMA, 2024.

AL-09, Etil (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato, e AL-10, Etil (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; com suas fórmulas estruturais em 3D mostradas na **Figura 7 (a-b)**, respectivamente; têm a mesma fórmula molecular ($C_{12}H_9Cl_2NO_2$) e, assim como nas fenilacrilamidas analisadas, os isômeros fenilacrilatos diferem na posição dos átomos de cloro no anel fenil. Na primeira molécula, os átomos de cloro (em verde) estão nas posições 2 e 6 do anel fenil, enquanto na segunda molécula, eles estão nas posições 2 e 4.

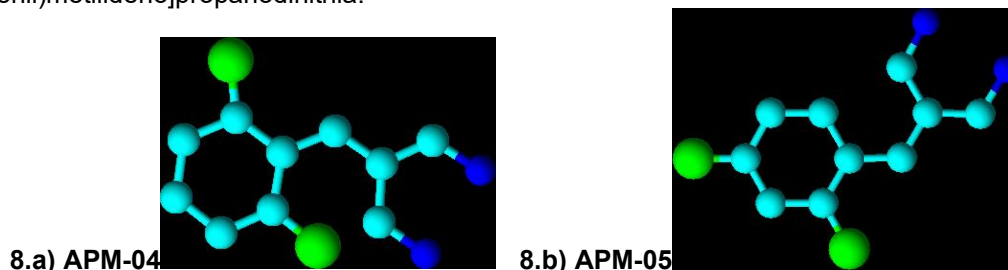
Figura 7 - Fórmulas estruturais em 3D dos fenilacrilatos de etila projetadas no software ACD/ChemSketch®. **7.a)** AL-09 = Etil (2E)-2-ciano-3-(2,6-diclorofenil)acrilato. **7.b)** AL-10 = Etil (2E)-2-ciano-3-(2,4-diclorofenil)acrilato.



Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Os isômeros APM-04, [(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila, e APM-05, [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; com suas fórmulas estruturais em 3D mostradas na **Figura 8 (a-b)**, respectivamente; têm a mesma fórmula molecular ($C_{10}H_4Cl_2N_2$) mas diferem na posição dos átomos de cloro no anel fenil. Na primeira molécula, os átomos de cloro (em verde) estão nas posições 2 e 6 do anel fenil, enquanto na segunda molécula, eles estão nas posições 2 e 4.

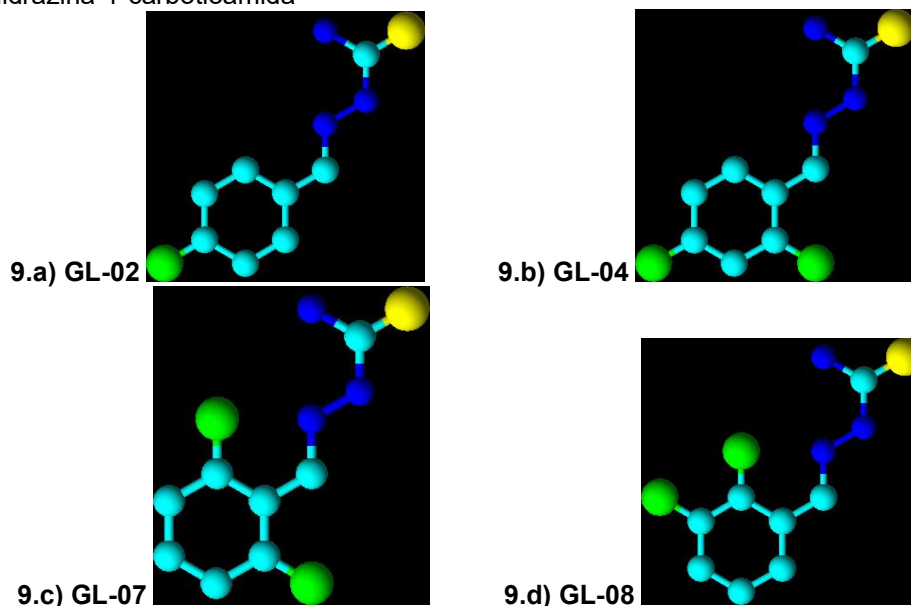
Figura 8 - Fórmulas estruturais em 3D das benzilidenemalononitrilas projetadas no software ACD/ChemSketch®. **8.a)** APM-04 = [(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila. **8.b)** APM-05 = [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila.



Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Três das moléculas hidrazina-1-carbotioamidas são isômeros de posição diclorados tendo a mesma fórmula molecular ($C_8H_7Cl_2N_3S$): GL-04= (2E) -2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-07= (2E) -2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida e GL-08= (2E) -2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; no entanto, GL-02= (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida tem apenas um átomo de cloro no anel fenil e fórmula molecular ($C_8H_7ClN_3S$). As fórmulas estruturais em 3D estão representadas na **Figura 9 (a-d)**. Os átomos de cloro são os verdes.

Figura 9 - Fórmulas estruturais em 3D das hidrazina-1-carbotioamidas projetadas no software ACD/ChemSketch®. **9.a)** GL-02= (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida. **9.b)** GL-04= (2E)-2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida. **9.c)** GL-07= (2E)-2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida. **9.d)** GL-08= (2E)-2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida



Fonte: NANES-LIMA, 2024.

5.1.1 Molinspiration®

- Propriedades moleculares teóricas - Molinspiration®

As propriedades moleculares foram calculadas através do software Molinspiration®, são apresentadas na **Tabela 1**. De acordo com a “Regra dos 5 (RO5)”, que afirma que uma molécula para ser um bom fármaco deve apresentar valores ideais para 4 parâmetros múltiplos de 5, que são: **(a)** log P calculado (Clog P) menor ou igual a 5, **(b)** Peso Molecular menor ou igual a 500 Da, **(c)** aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10 (nON) e **(d)** doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5 (nOHNH) (SANTOS; GONSALVES; ARAÚJO, 2018). Para esta regra, mais conhecida como regra de Lipinski, as moléculas analisadas atenderam a esses critérios, sem violar nenhum parâmetro (nviolations=zero).

Também foram analisadas a área de superfície polar topológica (TPSA) e o número de ligações rotativas (nrotb). A área de superfície polar topológica é reconhecida como um bom indicador de absorção intestinal de fármacos quando a TPSA for menor que 140 Å², todos os derivados sintéticos analisados apresentaram

boa absorção intestinal teórica com valores entre 47,58 e 66,89 Å²; e como bom indicador de penetração da barreira hematoencefálica quando a TPSA for menor que 60 Å², das moléculas analisadas apenas as fenilacrilamidas apresentaram valores ligeiramente superiores (66,89 Å²), os outros grupos teoricamente atravessam essa barreira.

Para avaliar a absorção oral, foi utilizada a equação $\%ABS = 109 - (0,345 \times TPSA)$. O cálculo é baseado no valor de TPSA de cada molécula. Obtiveram-se percentuais teóricos de absorção que variaram de 85,92% a 91,72%. Esses resultados são extremamente importantes, pois indicam que os derivados sintéticos analisados possuem alta absorção oral teórica, tornando-os potenciais candidatos viáveis para o desenvolvimento de medicamentos eficazes. Valores de TPSA mais baixos geralmente correspondem a uma melhor permeabilidade celular e, conseqüentemente, a uma maior absorção oral. Isso é fundamental para garantir que a quantidade adequada do fármaco chegue à corrente sanguínea e atinja os locais de ação necessários dentro do organismo.

O Volume Molecular (VM) é uma medida do espaço tridimensional ocupado por uma molécula, expresso em Angströms cúbicos (Å³), e é calculado com base nas contribuições dos grupos funcionais presentes na substância analisada. As EEs estudadas têm VM de 185,66, significa dizer que, cada uma das moléculas em questão ocupa um espaço de 185,66 Å³; as ALs têm VM de 216,72 Å³, as APMs ocupam um espaço de 172,25 Å³, a GL-02 de 172,39 e as outras GLs de 185,93 Å³. Esta característica pode influenciar como o derivado sintético interage com seu ambiente e pode ser usado para prever várias características de transporte das moléculas, como a absorção intestinal ou a penetração da barreira hematoencefálica, portanto, é um parâmetro frequentemente utilizado em estudos QSAR para modelar propriedades moleculares e a atividade biológica. O coeficiente de partição octanol-água, log P, calculado pelo método miLogP do software Molinspiration© com as contribuições da hidrofobicidade atômica, também é usado em estudos de QSAR e design racional de fármacos como uma medida de hidrofobicidade molecular, além de representar uma referência chave em estudos do destino ambiental de produtos químicos. Para boa absorção oral, o miLogP deve ser ≤ 5 , característica de todas as

moléculas analisadas. Valores superiores indicam alta lipofilicidade, comprometendo absorção e biodisponibilidade (SANTOS; GONSALVES; ARAÚJO, 2018).

Tabela 1 - Propriedades moleculares teóricas das moléculas sintéticas - *Molinspiration*®.

Molécula	miLogP	TPSA	natoms	MW	nON	nOHNH	nviol	nrtbo	VM	%ABS
EE-01	2,20	66,89	15	241.08	3	2	0	2	185.66	85,92
EE-04	2.22	66.89	15	241.08	3	2	0	2	185.66	85,92
AL-09	3.71	50.10	17	270,12	3	0	0	4	216.72	91,72
AL-10	3.73	50.10	17	270.12	3	0	0	4	216.72	91.72
APM-04	3.25	47.58	14	223.06	2	0	0	1	172.25	92,58
APM-05	3.28	47.58	14	223.06	2	0	0	1	172.25	92,58
GL-02	2.56	50.41	13	213.69	3	3	0	3	172.39	91,61
GL-04	3.17	50.41	14	248.14	3	3	0	3	185.93	91,61
GL-07	3.14	50.41	14	248.14	3	3	0	3	185.93	91,61
GL-08	3.14	50.41	14	248.14	3	3	0	3	185.93	91,61

Lipinski¹ **≤ 5** **≤ 140 Å** **≤ 500** **≤ 10** **≤ 5** **0** **≤ 10**

EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **EE-04** = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; **AL-09** = Etil (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato, **AL-10** = Etil (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; **APM-04** = 2,6-Diclorobenzilidenemalononitrila; **APM-05** = 2,4-Diclorobenzilidenemalononitrila; **GL-02** = (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-04** = (2E) -2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-07** = (2E) -2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-08** = (2E) -2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **(1)** Valores ideais para 4 parâmetros múltiplos de 5 na regra de Lipinski; **miLogP** = coeficiente de partição octanol-água; **TPSA** = área de superfície polar topológica em Å² (Angstroms ao quadrado); **MW** = peso molecular; **natoms**=número de átomos; **nON** = número de receptores de prótons, que incluem nitrogênio e oxigênio; **nOHNH** = número de doadores de prótons, que incluem nitrogênio e oxigênio; **nviol** = **nviolations** = número de violações da regra de Lipinski; **nrtbo** = número de ligações rotativas, exceto CN; **VM**=Volume Molar em Å³ (Angstroms cúbicos); **%ABS** = percentagem de absorção teórica.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

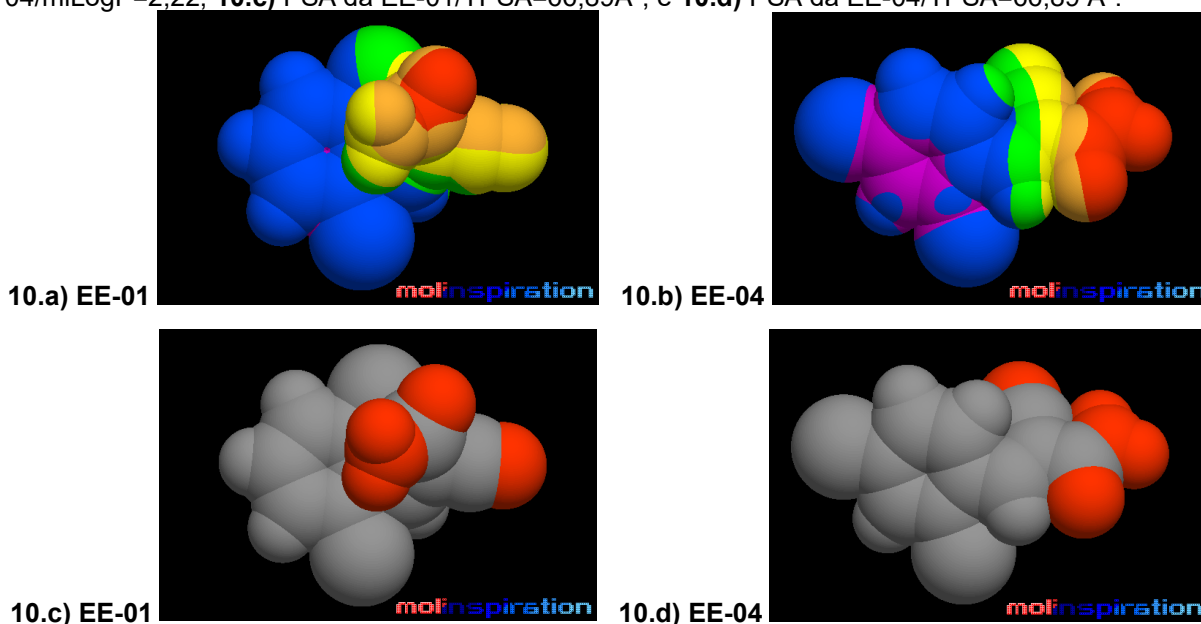
- *Galaxy Visualizer* - *Molinspiration*®

O *Galaxy Visualizer* desta ferramenta de quimioinformática permite visualizar o Potencial de Lipofilicidade Molecular (MLP) revelando quais partes da superfície são hidrofóbicas (representadas pelas cores violeta e azul) e quais são hidrofílicas (representadas pelas cores laranja e vermelho); e a Área de Superfície Polar Molecular (PSA). As estruturas em 3D revelando o MLP e PSA das moléculas estão representadas nas **Figuras (10-13)**. Esse último parâmetro é calculado utilizando a metodologia detalhada no estudo de Ertl, Rohde e Selzer (2000), que é implementada no software *Molinspiration*® para gerar a chamada Área de Superfície Polar Topológica (TPSA). De forma resumida, a TPSA é definida como a soma das

superfícies dos átomos polares em uma molécula, que geralmente incluem oxigênio e nitrogênio, bem como os hidrogênios ligados a esses átomos. Já no cálculo do MLP faz-se a análise da distribuição tridimensional da hidrofobicidade na superfície molecular. MLP é particularmente útil ao explicar diferenças nas propriedades ADME, como penetração na membrana ou ligação às proteínas plasmáticas, observadas nas moléculas com o mesmo log P, uma vez que o parâmetro 3D contém muito mais informações do que o log P expresso apenas por um único valor.

Observa-se na **Figura 10(a-b)** que EE-04 (miLogP=2,22) tem lipofilia modestamente superior quando comparada a EE-01 (miLogP=2,20). Na EE-04, os elétrons dos orbitais no anel benzeno tendem a se concentrar na extremidade próxima aos halogênios, posições 2 e 4, contribuindo para aumentar a natureza hidrofóbica, enquanto na EE-01 os elétrons no anel benzeno estão mais uniformemente distribuídos, característica que facilita a passagem pela membrana celular bacteriana. No PSA, figura **10(c-d)**, mostra-se a soma das contribuições superficiais tabuladas de fragmentos polares (em vermelho) dos átomos de oxigênio e nitrogênio em relação ao ambiente.

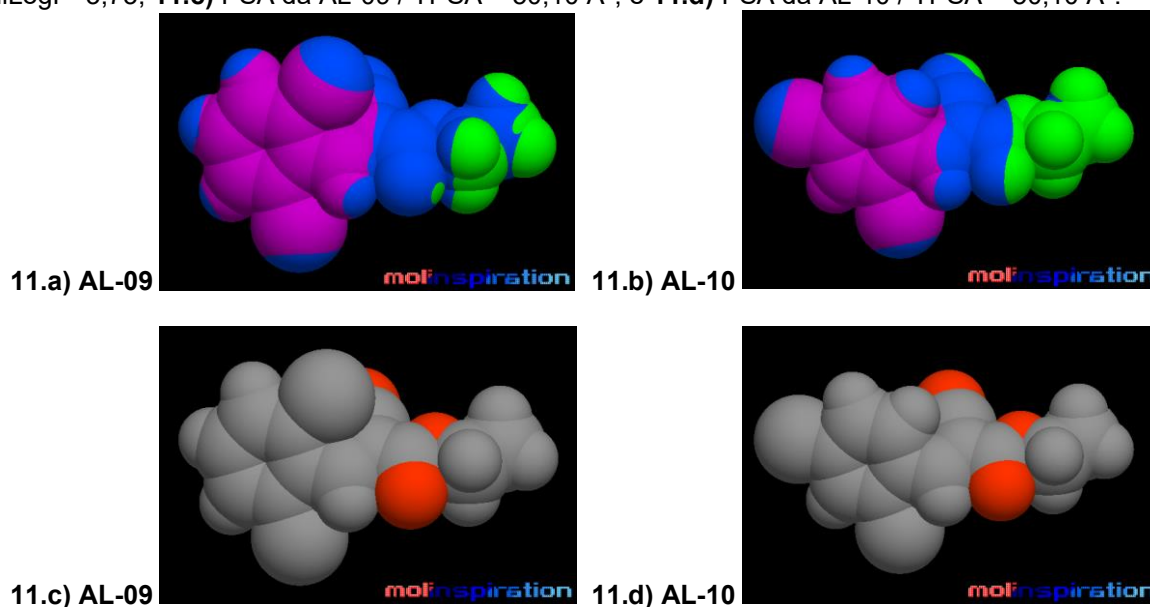
Figura 10 - Estruturas em 3D das fenilacrilamidas; **EE-01** = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida e **EE-04** = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; geradas no *Galaxy Visualizer* do software *Molinspiration*® mostrando o Potencial de Lipofilicidade Molecular (MLP) nas figuras 10.a e 10.b; e a Área de Superfície Polar (PSA) nas figuras 10.c e 10.d. / **10.a)** MLP da EE-01 / miLogP=2,20; **10.b)** MLP da EE-04/miLogP=2,22; **10.c)** PSA da EE-01/TPSA=66,89Å²; e **10.d)** PSA da EE-04/TPSA=66,89 Å².



Fonte: NANES-LIMA, 2024.

As estruturas tridimensionais das moléculas AL-09 e AL-10, exibindo o MLP e a PSA, estão representadas na **Figura 11**. Tanto na AL-10 quanto na AL-09 os elétrons no anel benzênico estão uniformemente distribuídos na **Figura 11 (a-b)**; AL-10 ($\text{miLogP}=3,73$) é discretamente mais hidrofóbica que AL-09 ($\text{miLogP}=3,71$) devido a posição dos halogênios no anel. No PSA mostra-se a soma das contribuições superficiais tabuladas de fragmentos polares (em vermelho) dos átomos de oxigênio e nitrogênio em relação ao ambiente (**Figura 11.c-d**).

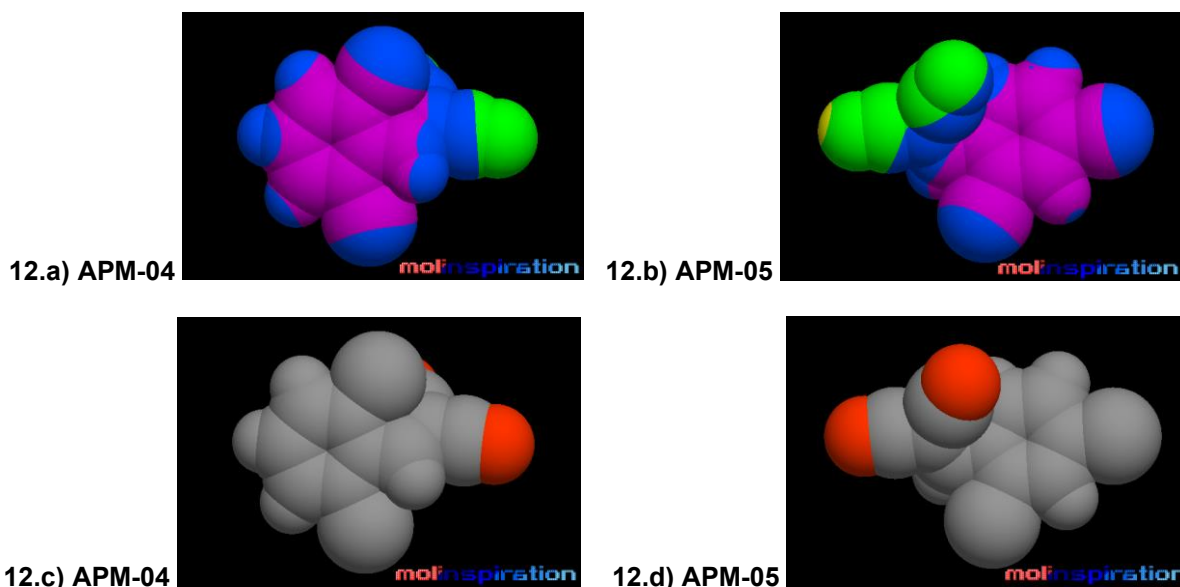
Figura 11 - Estruturas em 3D dos fenilacrilatos; **AL-09** = Etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato; **AL-10** = Etil 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; geradas no *Galaxy Visualizer* do software *Molinspiration*® mostrando o Potencial de Lipofilicidade Molecular (MLP) nas figuras 11.a e 11.b; e a Área de Superfície Polar (PSA) nas figuras 11.c e 11.d. / **11.a)** MLP da AL-09 / $\text{miLogP}=3,71$; **11.b)** MLP da AL-10 / $\text{miLogP}=3,73$; **11.c)** PSA da AL-09 / $\text{TPSA} = 50,10 \text{ \AA}^2$; e **11.d)** PSA da AL-10 / $\text{TPSA} = 50,10 \text{ \AA}^2$.



Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Na **Figura 12**, estão representadas as estruturas tridimensionais das moléculas APM-04 e APM-05 exibindo a PSA e o MLP. A PSA ilustra a soma das contribuições superficiais tabuladas dos fragmentos polares (em vermelho) dos átomos de nitrogênio em relação ao ambiente (**Figura 12.c-d**). Tanto na APM-05 quanto na APM-04 os elétrons no anel benzênico estão uniformemente distribuídos na **Figura 12 (a-b)**; APM-05 ($\text{miLogP}=3,28$) é discretamente mais hidrofóbica que APM-04 ($\text{miLogP}=3,25$), pois os halogênios nas posições 2 e 4 aumentam a hidrofobicidade da molécula.

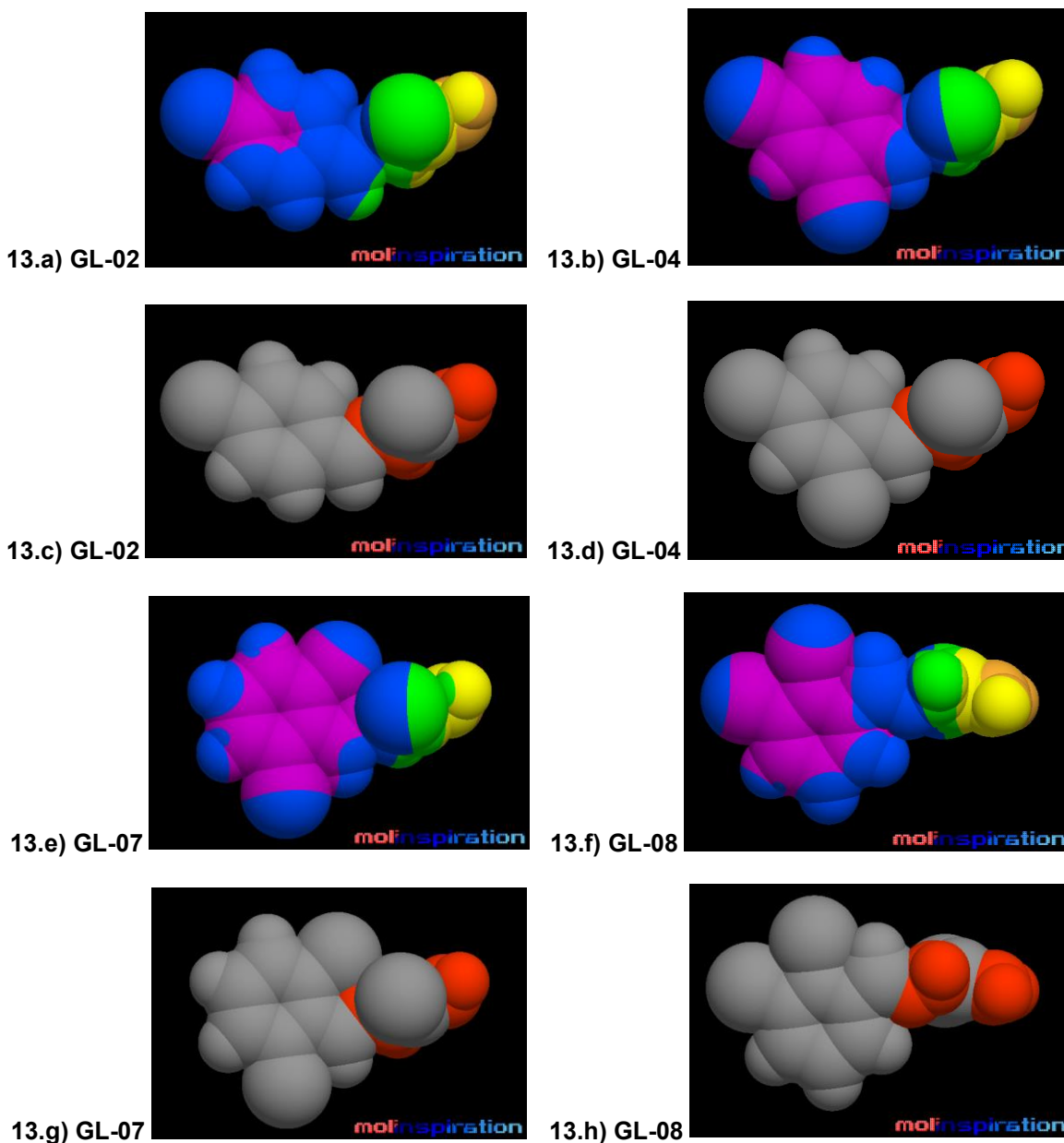
Figura 12 - Estruturas em 3D das benzilidenemalononitrilas; **APM-04** = [(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; **APM-05** = [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; geradas no *Galaxy Visualizer* do software *Molinspiration*® mostrando o Potencial de Lipofilicidade Molecular (MLP) nas figuras 12.a e 12.b; e a Área de Superfície Polar (PSA) nas figuras 12.c e 12.d. / **12.a)** MLP da APM-04 / $\text{miLogP}=3,25$; **12.b)** MLP da APM-05 / $\text{miLogP}=3,28$; **12.c)** PSA da APM-04 / $\text{TPSA} = 47,58 \text{ \AA}^2$; e **12.d)** PSA da APM-05 / $\text{TPSA} = 47,58 \text{ \AA}^2$.



Fonte: NANES-LIMA, 2024.

As estruturas em 3D revelando o MLP da série GL está representada na **Figura 13**; observa-se que GL-04, GL-07 e GL-08 são mais lipofílicas do que GL-02 e exibem distribuição de hidrofobicidade 3D diferentes. A PSA ilustra a soma das contribuições superficiais tabuladas dos fragmentos polares (em vermelho) dos átomos de nitrogênio e enxofre em relação ao ambiente (**Figuras 13.c, 13.d, 13.g e 13.h**). Na molécula GL-02 ($\text{miLogP}=2,56$) (**Figura 13.a**), os elétrons dos orbitais no anel benzeno tendem a se concentrar na extremidade próxima ao halogênio cloro, na posição 4, concentrando discretamente a natureza hidrofóbica. Já nas moléculas GL-04 ($\text{miLogP}=3,17$), GL-07 ($\text{miLogP}=3,14$) e GL-08 ($\text{miLogP}=3,14$), os elétrons no anel benzeno estão distribuídos de maneira mais uniforme (**Figuras 13.b, 13.e e 13.f**). Todas as moléculas analisadas nesta pesquisa apresentaram miLogP entre 2,20 e 3,73. Estima-se que, as moléculas promissoras a fármacos devem possuir $\log P$ na faixa de -0,4 a +5,6 (SANTOS; GONSALVES; ARAÚJO, 2018).

Figura 13 - Estruturas em 3D das hidrazina-1-carbotioamidas; **GL-02** = (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-04** = (2E)-2-[(2,4-diclorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-07** = (2E)-2-[(2,6-diclorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-08** = (2E)-2-[(2,3-diclorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; geradas no *Galaxy Visualizer* do software *Molinspiration*® mostrando o Potencial de Lipofilicidade Molecular (MLP) nas figuras 13(a,b,e,f); e a Área de Superfície Polar (PSA) nas figuras 13(c,d,g,h). / **13.a)** MLP da GL-02 / $\text{miLogP}=2,56$; **13.b)** MLP da GL-04 / $\text{miLogP}=3,17$; **13.c)** PSA da GL-02 / $\text{TPSA} = 50,41 \text{ \AA}^2$; **13.d)** PSA da GL-04 / $\text{TPSA} = 50,41 \text{ \AA}^2$; **13.e)** MLP da GL-07 / $\text{miLogP}=3,14$; **13.f)** MLP da GL-08 / $\text{miLogP}=3,14$; **13.g)** PSA da GL-07 / $\text{TPSA} = 50,41 \text{ \AA}^2$; **13.h)** PSA da GL-08 / $\text{TPSA} = 50,41 \text{ \AA}^2$.



Fonte: NANES-LIMA, 2024.

- *Propriedades farmacológicas teóricas - Molinspiration©*

De acordo com a plataforma Molinspiration©, uma pontuação acima de 0,00 indica atividade biológica significativa para o alvo em questão, e pontuação entre -0,50 e 0,00 indicam atividade biológica moderada contra o alvo, e por fim, um escore inferior a -0,50 indica inatividade para o alvo (HUSAIN *et al.*, 2016). Dentre os alvos farmacológicos que este programa utiliza para estimar possível bioatividade estão: atuação sobre “*GPCR ligand*” (receptor acoplado à proteína G), “*Ion channel modulator*” (modulador de canal iônico), “*Kinase inhibitor*” (inibidor de quinase), “*Nuclear receptor ligand*” (ligante de receptor nuclear), “*Protease inhibitor*” (inibidor de protease) e “*Enzyme inhibitor*” (inibidor enzimático) (ARRUDA *et al.*, 2020).

As propriedades farmacológicas teóricas das moléculas foram avaliadas pelo Molinspiration© e os resultados estão na **Tabela 2**. Especificamente, quando os derivados sintéticos de 2-cianoacetamida foram avaliados se revelaram valores inferiores a -0,50 para todos os parâmetros, com apenas uma exceção, sugerindo que as EEs, podem ser consideradas inativas teoricamente para os alvos farmacológicos em questão, de acordo com os critérios estabelecidos pela ferramenta. Enquanto que EE-01 apresentou resultado de -0,46 para inibidor enzimático, indicando atividade biológica moderada contra este alvo; no entanto, a EE-04 obteve score de -0,54 sugerindo que a diferença na posição do cloro poderia diminuir a mesma atividade nesta última molécula.

Quando os derivados sintéticos de 2-cianoacetato de etila foram avaliados encontraram-se valores inferiores a -0,50 para os parâmetros ligante GPCR, inibidor de quinase e inibidor de protease, sugerindo que as ALs, podem ser consideradas inativas teoricamente para estes alvos farmacológicos. Enquanto que AL-10 apresentou resultado de -0,47 para modulador de canal iônico e AL-09 apresentou escore de -0,44 como inibidor enzimático, indicando atividade biológica moderada contra estes alvos.

Os benzilidenemalononitrilos foram avaliados e apresentaram valores inferiores a -0,50 para todos os parâmetros, o que sugere que as APMs podem ser consideradas teoricamente inativas para os alvos farmacológicos citados. Os valores mais próximos de -0,5, que indicam uma discreta atividade como moduladores de

canais iônicos, foram -0,62 para a APM-04 e -0,54 para a APM-05, sugerindo que a diferença na posição do cloro poderia diminuir a atividade na APM-04.

Por fim, as hidrazina-1-carbotioamidas também mostraram valores inferiores a -0,50 para todos os parâmetros, sugerindo que as GLs podem ser consideradas teoricamente inativas para os alvos farmacológicos analisados. Destaca-se que a molécula monoclorada, GL-02, caso tivesse atividade teórica, essa seria menor que as moléculas dicloradas, GL-04, GL-07 e GL-08.

Tabela 2 - Propriedades farmacológicas teóricas das moléculas sintéticas- *Molinspiration*®.

Molécula	Ligante GPCR	Modulador de canal de íons	Inibidor de quinase	Ligante de receptor nuclear	Inibidor de protease	Inibidor enzimático
EE-01	-1.01	-0,59	-0,71	-0,75	-0,85	-0,46
EE-04	-0.94	-0.52	-0.82	-0.77	-0.90	-0.54
AL-09	-0.87	-0.54	-0.97	-0.53	-0.85	-0.44
AL-10	-0.81	-0.47	-1.07	-0.55	-0.89	-0.51
APM-04	-0.96	-0.62	-0.91	-0.85	-1.09	-0.65
APM-05	-0.88	-0.54	-1.02	-0.88	-1.14	-0.73
GL-02	-1.85	-1.43	-1.69	-2.20	-1.51	-0.85
GL-04	-1.72	-1.35	-1.53	-2.08	-1.40	-0.77
GL-07	-1.62	-1.30	-1.55	-2.01	-1.33	-0.71
GL-08	-1.71	-1.31	-1.58	-2.06	-1.37	-0.75

GPCR = receptor acoplado à proteína G; **EE-01** = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **EE-04** = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; **AL-09** = Etil (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato; **AL-10** = Etil (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; **APM-04** = [(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; **APM-05** = [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; **GL-02** = (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-04** = (2E) -2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-07** = (2E) -2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-08** = (2E) -2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida. **Negrito** = indica atividade biológica moderada contra o alvo.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

5.1.2 PASS Online®

- Atividade farmacológica teórica PASS Online®

Utilizando este recurso, foi possível verificar as probabilidades das moléculas testadas serem ativas (Pa). As estruturas EE-01 e EE-04 apresentaram várias atividades farmacológicas. Dentre as três atividades biológicas teóricas com Pa superior a 0,517 estão: atividade antineoplásica contra o Linfoma não-Hodgkin, antipsoriática e anti-anginosa. Nenhuma destas atividades é antibacteriana. Na **Tabela 3**, são apresentadas diferentes atividades antimicrobianas previstas pelo PASS Online®; foram encontrados 14 parâmetros mais prováveis, em ordem

decrecente de probabilidade de atividade com Pa superior a 0,039, computadas pelo PASS Online©. Entre as atividades previstas teoricamente, a mais significativa foi a atividade antiprotozoária contra *Leishmania*, com Pa=0,424 para a molécula EE-04 e Pa=0,358 para a EE-01, seguida da atividade antiviral contra Picornavirus, com Pa=0,381 para a EE-01 e Pa=0,321 para o derivado sintético EE-04.

Existem sete referências científicas até o presente momento que contemplam a pesquisa “*phenylacrylamides, biological activities*” na plataforma CAPES, elas foram publicadas entre os anos de 2010 a 2022, todas em periódicos revisados por pares. A molécula 7s mostrou atividade antituberculostática contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (BAIRWA *et al.*, 2010), o derivado 8c de fenilacrilamida apresentou atividade anticancerígena frente a célula tumoral HCT116 (LI *et al.*, 2012), a molécula 6a apresentou efeito citoprotetor potente contra a morte celular induzida por H₂O₂ em célula tumoral mensagial HBZY-1, diminuindo de forma dependente da dose e do tempo o acúmulo de ROS. Estudos preliminares do mecanismo antioxidante sugeriram que 6a inibiu a produção de NO e a atividade de NF-κB através da ativação de Nrf2, além de aumentar notavelmente a expressão de proteínas antioxidantes a jusante de Nrf2; possuindo ações de agente antioxidante e anti-inflamatório (GU *et al.*, 2019), o derivado piperamida NED416, (E)-3-(2,4-diclorofenil)-N-fenilacrilamida, obteve efeito cicatrizante em feridas cutâneas ativando a Sirtuína 1, Sirt1, que desempenha papel importante na migração celular e no reparo tecidual (WAHEDI *et al.*, 2020), as moléculas 6b, 14g e 6k; cumarinas e sulfocumarinas ligadas à fenilacrilamida; mostraram efeito anticancerígeno inibindo a atividade da anidrase carbônica (SWAIN *et al.*, 2020), a fenilacrilamida AT-61 exibiu boa atividade inibitória da replicação do vírus da hepatite B com um valor para a concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo - EC₅₀ de 1,2 μM, e a AT-130 demonstrou atividade anti-HBV modulando a montagem do capsídeo, com valor EC₅₀ de 0,13 μM e valor da concentração citotóxica - CC₅₀ > 61 μM (WANG, Y. *et al.*, 2022), por fim, um polímero de impressão molecular específico para ácido cafeico (CA-MIP, do inglês “*molecularly imprinted polymer specific to caffeic acid*”) foi preparado por polimerização usando o radical N-fenilacrilamida como monômero funcional; CA-MIP quando testado em vinho, apresentou alta seletividade e boa reprodutibilidade, com

um limite de detecção de 0,06 mM, podendo ser usado na indústria alimentícia para determinação seletiva de compostos fenólicos (ELHACHEM *et al.*, 2022).

Tabela 3 - Atividades antimicrobianas teóricas previstas pelo *PASS Online*® para as fenilacrilamidas com probabilidade de atividade maior que 0,039.

Moléculas ⇒ Pa* ↓	EE-01	EE-04
1	Antiviral / Picornavirus (0,381)	Antiprotozoária / <i>Leishmania</i> (0,424)
2	Antiprotozoária / <i>Leishmania</i> (0,354)	Antiviral / Picornavirus (0,321)
3	Antiviral / Poxvirus (0,276)	Antiprotozoária / Coccídeos (0,292)
4	Antiprotozoária / Coccídeos (0,272)	Antifúngica (0,264)
5	Anti-helmíntica / <i>Fasciola</i> (0,227)	Anti-helmíntica / <i>Fasciola</i> (0,247)
6	Antiprotozoária / <i>Amoeba</i> (0,227)	Antiviral / Poxvirus (0,242)
7	Antiviral / <i>Influenza A</i> (0,210)	Antiprotozoária / <i>Amoeba</i> (0,241)
8	Antiviral / Citomegalovírus (0,209)	Antiprotozoária / <i>Toxoplasma</i> (0,233)
9	Anti-Rickettsia (0,168)	Anti-infeccioso (0,221)
10	Anti-helmíntico (0,157)	Antituberculostático (0,220)
11	Antiprotozoária (0,132)	Antiprotozoária / <i>Plasmodium</i> (0,182)
12	Antiviral / <i>Parainfluenza</i> (0,039)	Antiprotozoária (0,178)
13	-	Anti-helmíntica (0,175)
14	-	Antiprotozoária / <i>Babesia</i> (0,114)

Pa = probabilidade de ser ativo; ↓ Em ordem decrescente; (*) Quanto mais próximo de 1, maior o potencial de atividade biológica teórica; **EE-01** = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **EE-04** = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida. **Negrito** = atividades antibacterianas.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Para os fenilacrilatos, a melhor atividade biológica teórica foi a antiprotozoária contra *Leishmania* (LIMA *et al.*, 2024a). Na **Tabela 4**, são apresentadas as quinze atividades antimicrobianas teóricas mais prováveis, em ordem decrescente de probabilidade de atividade, com Pa superior a 0,195, computadas pelo *PASS Online*®. Além do parâmetro citado, destacaram-se a atividade antiviral contra Picornavirus e Rhinovirus, ambas com Pa superior a 0,417. Entre as outras atividades biológicas destacaram-se a anti-anginosa e a anti-eczemática (não mostradas na Tabela 4).

Pesquisas anteriores, como o estudo de BOKOSI *et al.* (2021), demonstraram a eficácia de 2-(N-cíclicoamino)quinolinas acopladas a (E)-3-(2/3/4-aminofenil)acrilatos de metila em testes *in vitro* para atividades antiplasmodiais e antitripanossômicas; neste estudo as estruturas moleculares contendo aminofenilacrilatos de metila foram analisadas no software SwissADME® para prever

propriedades ADME. Os resultados, computados pelo PASS Online© indicaram potencial atividade antiprotozoária teórica, especificamente contra *Leishmania*, com $Pa=0,739$ para AL-10 e $Pa=0,647$ para AL-09, o que sugere que a posição (*orto-para*) do isômero AL-10 favorece esta atividade quando comparado ao isômero AL-09, diclorada nas posições (*orto-orto*) (LIMA *et al.*, 2024a).

Desde o século passado, os acrilatos, como o copolímero de acrilatos/t-octil propenoamida, têm sido amplamente utilizados em produtos de cuidados com a pele devido à sua versatilidade, alto peso molecular e capacidade de formação de filme. Esses polímeros são encontrados em diversos produtos, como protetores solares resistentes a água, produtos para os olhos que não borram e umectantes para mãos e corpo. Esses polímeros oferecem promissoras aplicações na área de cuidados com a pele e no desenvolvimento de materiais antimicrobianos (GUTH *et al.*, 1991).

Tabela 4 - Atividades antimicrobianas teóricas previstas pelo PASS Online© para os fenilacrilatos, AL-09 e AL-10, com probabilidade de atividade maior que 0,195.

Moléculas ⇒ Pa* ↓	AL-09	AL-10
1	Antiprotozoária / <i>Leishmania</i> (0,647)	Antiprotozoária / <i>Leishmania</i> (0,739)
2	Antiviral / Picornavírus (0,486)	Antiviral / Rhinovírus (0,458)
3	Antiviral / Rhinovírus (0,464)	Antiviral / Picornavírus (0,417)
4	Anti-helmíntica / Nematoda (0,307)	Antifúngica (0,400)
5	Antiprotozoária (0,290)	Antiprotozoária (0,365)
6	Antifúngica (0,286)	Antiprotozoária / <i>Plasmodium</i> (0,319)
7	Antiprotozoária / Coccídeos (0,285)	Anti-helmíntica / Nematoda (0,319)
8	Antiviral / Citomegalovírus (0,264)	Antiprotozoária / Coccídeos (0,307)
9	Antiprotozoária / <i>Trichomonas</i> (0,242)	Anti-infeccioso (0,257)
10	Antiprotozoária / <i>Plasmodium</i> (0,240)	Antiviral / Citomegalovírus (0,246)
11	Anti-infeccioso (0,236)	Antiprotozoária / <i>Amoeba</i> (0,244)
12	Anti-helmíntica (0,204)	Antiprotozoária / <i>Trichomonas</i> (0,235)
13	Antiprotozoária / <i>Amoeba</i> (0,230)	Antiparasitária (0,231)
14	Antiparasitária (0,202)	Anti-helmíntica (0,224)
15	Antiviral / Poxvirus (0,195)	Antiprotozoária / <i>Toxoplasma</i> (0,213)

Pa = probabilidade de ser ativo; ↓ Em ordem decrescente; (*) Quanto mais próximo de 1, maior o potencial de atividade biológica teórica; **AL-09** = Etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato; **AL-10** = Etil 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato. **Negrito** = atividades antibacterianas.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Entre as três atividades biológicas teóricas com Pa superior a 0,562 para as benzilidenemalononitrilas estão: atividade antipsoriática, antineoplásica contra o

Linfoma não-Hodgkin e antiseborréica. Entre os parâmetros mais frequentes não houve atividade antibacteriana. Na **Tabela 5**, são apresentadas as quinze atividades antimicrobianas mais prováveis, em ordem decrescente de probabilidade de atividade, com P_a superior a 0,155, computadas pelo PASS Online®. As cinco atividades antimicrobianas de maior destaque foram: antiprotozoária contra *Leishmania* e coccídeos, anti-helmíntica contra *Fasciola* e antiviral contra Picornavirus e Rhinovirus.

Os estudos com derivados de malononitrilo contribuem significativamente para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial terapêutico em diversas áreas, incluindo doenças neurodegenerativas e câncer. No entanto ainda é pouco explorado seu potencial antibacteriano.

Sobre as atividades farmacológicas descritas para derivados semelhantes a benzilidenemalononitrilas, em 1993, Sasho e colaboradores sintetizaram derivados de 2-imidazolidinilideno propanonitrila, cujas atividades biológicas foram influenciadas pela modificação dos substituintes R1 e R2. A molécula 19 se destacou por sua atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) e potencialização da contração ileal. Em 1994, o mesmo grupo sintetizou seis derivados de 3-iril-2-imidazolidinilideno propanodinitrila, avaliando sua atividade inibitória de AChE e aumento de motilidade gastrointestinal *in vitro*, com cinco moléculas sendo potentes em ambas as atividades. Em 2008, o grupo sintetizou derivados de diamina contendo imidazolidinilideno propanonitrila sendo esta uma nova classe de antagonistas do receptor H3 da histamina.

Em 2007, Pojarova e colaboradores modificaram 2-fenilindol-3-carbaldeídos antimitóticos, resultando em [(2-fenilindol-3-il)metileno]propanedinitrilas que inibiram o crescimento de células tumorais da mama MDA-MB 231 e MCF-7 com $IC_{50} < 100$ nM. A inibição ocorreu por parada do ciclo celular na fase G2/M e apoptose. Em 2011, Neca sintetizou nove moléculas, derivados de (metilideno)propanodinitrilo, e avaliou a inibição das isoenzimas MAO A (monoamina oxidase A) e MAO B (monoamina oxidase B). O derivado que apresentou maior potencial de inibição para a MAO A foi o de número 9 com um valor de IC_{50} de $0,72 \pm 0,19$ μ M, e o inibidor com maior potencial para a MAO B foi o de número 5 com um valor de IC_{50} de $1,17 \pm 0,66$ μ M, sendo o último seletivo para esta isoenzima. Os inibidores de MAO A e MAO B foram inicialmente usados no tratamento da depressão e atualmente são alvos

terapêuticos no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson. Em 2020, Silva e colaboradores sintetizaram moléculas contendo nitrila. A molécula 31 se destacou pela inibição trifuncional contra MAO A, MAO B e AChE. A molécula 63 mostrou potencial como líder no tratamento da doença de Alzheimer.

Os derivados de 2-cianoacetamida, os fenilacrilatos e as bezilidenemalononitrilas estudadas nesta pesquisa não apresentaram destaque quanto à atividade antibacteriana teórica pela análise do software PASS Online®. Como o software se baseia em uma grande base de dados de substâncias conhecidas e suas atividades biológicas registradas para fazer a previsão, supõem-se que existam poucos estudos sobre atividade antibacteriana para estas três classes.

Tabela 5 - Atividades antimicrobianas teóricas previstas pelo *PASS Online*® para as benzilidenemalononitrilas com probabilidade de atividade maior que 0,155.

Moléculas ⇒ Pa* ↓	APM-04	APM-05
1	Antiprotozoária / <i>Leishmania</i> (0,647)	Antiprotozoária / <i>Leishmania</i> (0,546)
2	Antiviral / Picornavírus (0,419)	Antiprotozoária / Coccídeos (0,363)
3	Antiprotozoária / Coccídeos (0,341)	Anti-helmíntica / <i>Fasciola</i> (0,359)
4	Anti-helmíntica / <i>Fasciola</i> (0,335)	Antiviral / Picornavírus (0,354)
5	Anti-helmíntica / <i>Nematoda</i> (0,280)	Anti-helmíntica / <i>Nematoda</i> (0,292)
6	Antiviral / Poxvirus (0,270)	Anti-infeccioso (0,283)
7	Anti-infeccioso (0,261)	Antiprotozoária / <i>Toxoplasma</i> (0,281)
8	Antiviral / Citomegalovírus (0,247)	Antiprotozoária / <i>Amoeba</i> (0,261)
9	Antiprotozoária / <i>Amoeba</i> (0,246)	Antiprotozoária (0,251)
10	Antifúngica (0,238)	Antiprotozoária / <i>Plasmodium</i> (0,182)
11	Anti-helmíntico (0,229)	Antituberculostático (0,240)
12	Antiprotozoária / <i>Trichomonas</i> (0,194)	Antiviral / Poxvírus (0,237)
13	Antiprotozoária / <i>Plasmodium</i> (0,182)	Antiviral / Citomegalovírus (0,230)
14	Antimicobacteriano (0,191)	Antimicobacteriano (0,209)
15	Antiprotozoária / <i>Babesia</i> (0,155)	Antiprotozoária / <i>Trichomonas</i> (0,186)

Pa = probabilidade de ser ativo; ↓ Em ordem decrescente; (*) Quanto mais próximo de 1, maior o potencial de atividade biológica teórica; **APM-04** = [(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; **APM-05** = [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila. **Negrito** = atividades antimicrobianas.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Entre as classes de moléculas analisadas neste estudo, as hidrazina-1-carbotioamidas foram as únicas que o Pass online® previu teoricamente, com maior

probabilidade, atividades antibacterianas. Entre as cinco atividades biológicas teóricas com P_a maior que 0,474 para as GLs estão: antituberculostática, antimicobacteriana, antineoplásica frente a melanoma, antiviral frente à família Poxviridae e antiprotozoária frente a coccídeos. Na **Tabela 6** são mostradas as quinze atividades antimicrobianas mais prováveis em ordem decrescente de probabilidade de ser ativo. As atividades antituberculostática e antimicobacteriana são variáveis, ou seja, ter atividade biológica frente ao *Mycobacterium tuberculosis* não implica dizer que tem atividade frente a todas as espécies de micobactérias, incluindo a *M. leprae*. As atividades antituberculostática ($P_a=0,883$) e antimicobacteriana ($P_a=0,880$) teóricas da GL-02, que é monossobstituída com o halogênio cloro em posição (*para*), é cerca de 8% superior ao resultado previsto para as outras hidrazina-1-carbotioamidas que são dissobstituídas com o mesmo átomo; GL-04 em posição (*orto-para*), GL-07 em posição (*orto-orto*) e GL-8 em posição (*orto-meta*). Esta percentagem aumenta para 20% na atividade anti-hansenostática teórica da GL-02 ($P_a=0,650$) em relação às moléculas dissobstituídas, 0,539 para GL-07, 0,505 para GL-04 e 0,503 para GL-08.

Algumas atividades biológicas foram relatadas *in vitro* para carbotioamidas. A molécula 3d, (2E) -2-[(4-nitrofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida, é um forte inibidora da tirosinase de cogumelo com IC_{50} de 0,05 μM , 128 vezes mais potente que o ácido kójico. A análise da cinética enzimática indica que a inibição de 3d é competitiva. Estudos de *docking* confirmaram o encaixe da molécula no sítio ativo da tirosinase (HOSSEINPOOR *et al.*, 2020), que é responsável pela produção de melanina (SILVÉRIO; CASTRO; MIRANDA, 2013) e, portanto, pode ter ação clareadora em manchas escuras de pele.

As ectonucleotidases, apesar de suas funções não serem totalmente compreendidas, têm a *h*-NTPDase3 como uma ectoenzima preferencial para ATP em vez de ADP (SCHRADER, 2022). A atividade indesejada dessa enzima pode levar a condições patológicas como câncer, diabetes, inflamação e trombose (BEGUM *et al.*, 2022). A molécula sintética 8m, (Z)-N-etil-2-(2-oxoindolin-3-ilideno)hidrazina-1-carbotioamida, foi relatada como um potente inibidor da *h*-NTPDase3, estimulando a secreção de insulina induzida pela glicose (AFZAL *et al.*, 2020).

MePhPyC, uma molécula sintética derivada do pirazol, N-3,5-Trimethyl-Nphenyl-1-H-Pyrazole-1-Carbothioamide, apresentou citotoxicidade com $IC_{50} = 49$

µg/mL e eficácia contra o carcinoma ascítico de Ehrlich-Lettre (EAC). A dose de 5 mg/kg foi mais eficaz que as de 10 e 15 mg/kg. MePhPyC mostrou potencial anticancerígeno tanto *in vitro* quanto no tratamento de tumor ascítico *in vivo* (KUMAR; PRIYA.; ARAVINDAKSHAN, 2021).

Tabela 6 - Atividades antimicrobianas teóricas previstas pelo *PASS Online*© para as hidrazina-1-carbotioamidas com probabilidade de atividade maior que 0,354.

Moléculas ↓ Pa*⇒	GL-02	GL-04	GL-07	GL-08
1	Antituberculóstica (0,883)	Antimicobacteriana (0,837)	Antimicobacteriana (0,819)	Antituberculóstica (0,779)
2	Antimicobacteriana (0,880)	Antituberculóstica (0,810)	Antituberculóstica (0,808)	Antimicobacteriana (0,775)
3	Antiviral / Poxvirus (0,793)	Antiviral / Poxvirus (0,745)	Antiviral / Poxvirus (0,775)	Antiviral / Poxvirus (0,722)
4	Antiprotozoária / Coccídeos (0,700)	Antiprotozoário / Coccídeos (0,650)	Antiviral / <i>Influenza</i> (0,668)	Antiviral / <i>Influenza</i> (0,606)
5	Antiviral / <i>Influenza</i> (0,698)	Antiviral / <i>Influenza</i> (0,574)	Antiprotozoária / Coccídeos (0,604)	Antiviral / Picornavirus (0,561)
6	Anti-hansenostática (0,650)	Antiprotozoária / <i>Trypanossoma</i> (0,523)	Antiviral / Picornavirus (0,556)	Anti-hansenostática (0,503)
7	Antiviral / Picornavirus (0,623)	Anti-hansenostática (0,505)	Antiprotozoária / <i>Trypanossoma</i> (0,551)	Antiprotozoária / <i>Trypanossoma</i> (0,496)
8	Antiprotozoária / <i>Trypanossoma</i> (0,553)	Antiséptica (0,497)	Anti-hansenostática (0,539)	Antiprotozoária / Coccídeos (0,474)
9	Antiprotozoária (0,494)	Antiviral / Picornavirus (0,490)	Antiviral / Adenovírus (0,455)	Antiparasitária (0,455)
10	Antiparasitária (0,471)	Antibacteriana (0,446)	Antiséptica (0,450)	Antibacteriana (0,451)
11	Antiviral / Adenovírus (0,456)	Antiparasitária (0,436)	Antibacteriana (0,401)	Antiviral / Adenovírus (0,420)
12	Antibacteriana (0,454)	Antifúngica (0,428)	Antiprotozoária (0,393)	Antifúngica (0,400)
13	Antifúngica (0,428)	Antiviral / Adenovírus (0,408)	Antifúngica (0,389)	Antiséptica (0,400)
14	Antiséptica (0,420)	Antiparasitária (0,392)	Antiprotozoária / <i>Leishmania</i> (0,382)	Antiprotozoária / <i>Leishmania</i> (0,385)
15	Anti-infeccioso (0,407)	Antiprotozoária / <i>Leishmania</i> (0,382)	Anti-infeccioso (0,354)	Antiprotozoária (0,373)

Pa = probabilidade de ser ativo; **↓** Em ordem decrescente; (*) Quanto mais próximo de 1, maior o potencial de atividade biológica teórica; **GL-02** = 2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-04** = 2-[(2,4-diclorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-07** = 2-[(2,6-diclorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-08** = 2-[(2,3-diclorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida. **Negrito** = atividades antibacterianas.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

5.1.3 admetSAR©

- *Análise por classificação e por regressão*

A probabilidade de ser ativo (Pa), conforme indicado pelo admetSAR©, é uma previsão computacional da possibilidade de uma molécula apresentar uma atividade biológica específica. Essa previsão, baseada em características estruturais e físico-químicas da molécula, é expressa como um valor entre 0 (zero) e 1 (um). Valores próximos a 1 sugerem alta probabilidade de atividade biológica, enquanto valores próximos a 0 indicam baixa probabilidade (CHENG *et al.*, 2012).

A previsão por classificação e regressão são duas abordagens comuns em aprendizado de softwares e análise de dados, e são usadas para prever propriedades de compostos químicos (HYNDMAN; ATHANASOPOULOS, 2018). A classificação é usada quando a saída desejada é uma categoria ou classe, por exemplo, no contexto da ferramenta admetSAR©, uma molécula pode ser classificada como 'tóxica' ou 'não tóxica'. A classificação é útil quando queremos separar os dados em categorias distintas. A regressão é usada quando a saída desejada é um valor contínuo ou quantitativo, por exemplo, a regressão pode ser usada para prever a concentração de uma molécula que causa 50% da atividade máxima (AC50). A regressão é útil quando queremos prever um valor específico baseado em variáveis de entrada. As previsões computadas pelo admetSAR©, por classificação estão nas **Tabelas 7,9,11 e 13**, e por regressão, nas **Tabela 8,10,12 e 14**.

- *Toxicidade teórica das fenilacrilamidas – análise por classificação admetSAR©*

Na **Tabela 7** estão as previsões teóricas para as EEs. A interpretação do resultado da toxicidade de Ames é binária, a molécula é classificada como 'mutagênica' ou 'não mutagênica' (HANSEN *et al.*, 2009). O mesmo princípio é usado para interpretar o potencial carcinogênico, o derivado sintético é classificado como 'cancerígeno' ou 'não cancerígeno' (LAGUNIN *et al.*, 2009). Eles são baseados em um modelo de aprendizado de máquina treinado em um conjunto de dados de moléculas com resultados de toxicidade de Ames e de carcinogenicidade conhecidos. Para os derivados de 2-cianoacetamida a análise *in silico* revelou possuírem potencial mutagênico AMES, ambos com valor de probabilidade de 0,639; quanto ao potencial

carcinogênico, o teste mostrou que teoricamente nenhum dos derivados testados apresenta efeitos cancerígenos, ambos com Pa mediano de 0,684. Para o parâmetro “mutagênese de Ames” (XU *et al.*, 2012), contrariamente à previsão teórica da versão admetSAR©2012, revelou que as EEs não possuem potencial mutagênico, EE-01 com Pa=0,710 e EE-04 com Pa=0,640.

Destrinchando melhor a avaliação do parâmetro teórico Mutagenicidade Ames pelo admetSAR©, o termo benchmark refere-se ao conjunto de dados público. Esse conjunto serve como uma referência padrão para comparar o desempenho de diferentes ferramentas e métodos de previsão *in silico*. Em síntese, tanto Hansen *et al.* (2009), referência para o desenvolvimento do admetSAR©2012, quanto Xu *et al.* (2012), referência para o admetSAR©2019; utilizam benchmarks para a avaliação de modelos preditivos de mutagenicidade química. No entanto, Hansen *et al.* (2009) focam na criação de um benchmark público, contendo aproximadamente 6.500 compostos não confidenciais, com o objetivo principal de padronizar e comparar diferentes ferramentas preditivas, comerciais e não comerciais. Por outro lado, Xu *et al.* (2012) desenvolvem um benchmark mais amplo e diversificado, com 7.617 compostos, e o utilizam para construir e validar modelos preditivos robustos, avaliando algoritmos e descritores químicos em diferentes combinações. Enquanto Hansen *et al.* priorizam a disponibilização de um conjunto de dados padronizado, Xu *et al.* destacam o desempenho e a confiabilidade dos modelos gerados a partir de seu benchmark; ou seja; ambos os trabalhos contribuem significativamente para o avanço da previsão *in silico* de mutagenicidade química, utilizando bases de dados e técnicas de aprendizado de máquina. No entanto, diferem em escopo, tamanho dos conjuntos de dados e metodologias, apresentando abordagens complementares que enriquecem o campo de estudo.

O micronúcleo, estruturalmente, é um pequeno núcleo que representa o material genético perdido pelo núcleo principal devido a um dano genético (RÉGIS; PESENTI, 2015). O ‘teste de micronúcleo’ utiliza células expostas a agentes químicos visando identificar possíveis aberrações cromossômicas com base no aumento da frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleos (UCHÔA; MAGALHÃES, 2020). Este ensaio é um biomarcador para a detecção de danos citogenéticos, avalia o potencial clastogênico e aneugênico, podendo ser realizado tanto *in vivo* quanto *in*

vitro. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2013) preconiza que o teste *in vivo* em medula óssea de roedores é amplamente aceito e recomendado para a avaliação e o registro de novos produtos farmacêuticos. A análise *in silico* surge como uma alternativa para prever a genotoxicidade, considerando o alto custo e o tempo envolvido nos ensaios com modelos animais. Adicionalmente, a quantidade da molécula teste empregada é consideravelmente superior à utilizada nos testes toxicológicos não-clínicos *in vitro*. Na versão 2.0 Copyright@2019 do software admetSAR, este parâmetro foi incorporado (FAN *et al.*, 2018). A análise 'micronuclear' teórica das duas fenilacrilamidas indicou que, teoricamente, EE-01 não é genotóxico com probabilidade de 0,640, contrariamente EE-04 é genotóxico com Pa de 0,660.

Outro parâmetro incluído na versão mais recente avalia possíveis riscos à reprodução humana (JIANG *et al.*, 2019). A análise admetSAR@2019 nas moléculas EE-01 e EE-04 indicou probabilidades, respectivamente, de 0,667 e 0,633, indicando que elas não apresentam toxicidade reprodutiva. Os estudos *in vivo* de toxicidade reprodutiva visam identificar possíveis efeitos de uma ou mais substâncias ativas na fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, no desenvolvimento pré e pós-natal, incluindo função materna e, no desenvolvimento embriofetal (BRASIL, 2013).

Voltando aos parâmetros computados pelo admetSAR@2012, a análise indicou que os isômeros EE-01 e EE-04 se enquadram na categoria III de toxicidade oral aguda, com Pa mediano de 0,600, conforme classificação da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency* - USEPA), ou seja, implica que a dose letal média (DL₅₀) dessas moléculas, que é a quantidade necessária para causar a morte de 50% de uma população em teste, varia entre 500 e 5000 mg/kg (CHENG *et al.*, 2012). Vale ressaltar que essa é uma previsão teórica. Na prática, a rotulagem dos produtos químicos é baseada em resultados experimentais, seguindo a diretriz de teste de toxicidade oral aguda da OCDE 425 (*Organisation for Economic Co-operation and Development*, 2022), sendo esta de grande importância, pois reduz o número de animais no protocolo experimental e possibilita o monitoramento de indícios de toxicidade, estabelecendo a DL₅₀ de uma molécula e determinando os correspondentes intervalos de confiança.

A carcinogenicidade classe III é outra categoria de classificação que se refere especificamente a potência carcinogênica - TD₅₀ - de uma substância. A base de dados

utilizada pelo admetSAR© para fazer a previsão é o Banco de Dados de Potência Carcinogênica (*Carcinogenic Potency Database* - CPDB), desenvolvido entre 1980 e 2005 por Swirsky e colaboradores e atualizada em 2011. As substâncias são divididas em três classes de acordo com os valores de TD₅₀ representando a dose diária em mg/kg de peso corporal/dia de exposição durante toda a vida, que induz tumores em 50% dos animais que teriam permanecido livres de tumores na dose zero. Ambas as moléculas analisadas neste estudo obtiveram uma pontuação de 0,679 com resultado 'não carcinogênico'.

Os dois derivados de 2-cianoacetamida, conforme análise teórica, apresentam uma probabilidade de 0,983 de serem inibidores fracos do gene *hERG* e 0,930 de não serem inibidores do gene *hERG*, que codifica a subunidade α de um canal de íons de potássio humano - também conhecido como gene humano *Ether-à-go-go*. Esses indicadores toxicológicos, não estão inclusos na Tabela 7, e foram obtidos matematicamente pelo software com base no estudo de Robinson, Glen e Mitchell (2011).

A toxicologia ambiental é responsável pela avaliação dos efeitos de substâncias químicas em diversos organismos, abrangendo desde peixes e aves até animais terrestres e plantas. Um ramo específico dessa área, a ecotoxicologia, concentra-se nos impactos dessas substâncias na população de um ecossistema (OLKER *et al.*, 2022). O admetSAR©, é uma ferramenta importante nesse contexto, pois tem a capacidade de prever a toxicidade em peixes, protozoários de água doce, abelhas, além de avaliar a biodegradabilidade. Essa funcionalidade contribui significativamente para os estudos de toxicologia ambiental, auxiliando na avaliação do potencial impacto ecológico de um novo medicamento. Além disso, é valiosa a previsão *in silico* de atividades toxicológicas, pois auxilia na formulação de estratégias para mitigar possíveis danos ambientais.

O modelo '*Fish Toxicity*' do software prevê a toxicidade de uma molécula teste em *Pimephales promelas* e é baseado no banco de dados de toxicidade aguda da USEPA, construído com resultados de pLC₅₀ (logaritmo decimal negativo da concentração letal mediana) conhecidos de 554 estruturas de pesticidas ou moléculas semelhantes a pesticidas. Os valores LC₅₀ representam a concentração de uma molécula necessária para causar a morte de 50% dos "*Fathead Minnows*", no teste *in*

vitro os peixes são expostos ao produto químico em estudo durante um período de 96 horas, de acordo com a diretriz EPA-821-R-02-012 (*United States Environmental Protection Agency*, 2002). No caso das fenilacrilamidas analisadas pelo admetSAR®, eles apresentaram o mesmo resultado de probabilidade, 0,788, sendo classificados com ‘alta toxicidade teórica’.

A ferramenta admetSAR® coleta os dados de Cheng e colaboradores (2011) para prever o parâmetro ‘*Tetrahymena pyriformis* Toxicity’. Se uma molécula tem um pIGC_{50} (o logaritmo negativo da concentração necessária para inibir 50% do crescimento em microgramas por litro) maior que -0,5 ($> -0,5$), ele possui ‘toxicidade potencial aguda’ para *Tetrahymena*, caso contrário, é classificada como ‘não tóxica’ para o protozoário de água doce. No caso das EEs analisadas, elas apresentaram alta toxicidade teórica, com Pa de 0,930. O ensaio *in vitro* serve como um bioindicador para avaliar a toxicidade de substâncias químicas no meio ambiente e o objetivo é estudar as respostas fisiológicas e bioquímicas à presença de diferentes compostos químicos neste protozoário ciliado (ROGERO *et al.*, 2003).

Como indicado no site da ferramenta admetSAR® elaborada pela equipe do ‘*Molecular Modeling and Design Laboratory*’ (2012), o parâmetro ‘*Honey Bee*’ é coletado do ECOTOX – banco de dados que fornece elementos únicos de toxicidade química ambiental em espécies aquáticas e terrestres - da USEPA, e se baseia no valor de DL_{50} . Se um composto tem um valor de DL_{50} menor que 100 microgramas por abelha ($< 100 \mu\text{g}/\text{abelha}$), ele é classificado como um composto de alta toxicidade aguda para abelhas – ‘*High HBT*’. Se o valor de DL_{50} for maior, o composto é classificado como de baixa toxicidade aguda para abelhas – ‘*Low HBT*’. No caso das fenilacrilamidas, elas foram classificadas como de alta toxicidade para *Apis mellifera* com Pa de 0,718, o que pode ter implicações significativas para a saúde das abelhas e, por extensão, para a polinização e o bem-estar do ecossistema.

No contexto da ferramenta admetSAR®, uma molécula é classificada como ‘*ready biodegradable*’ ou ‘*not ready biodegradable*’ se atender a determinados critérios estabelecidos pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) no Teste Nº. 301 (1992). As moléculas EE-01 e EE-04 foram teoricamente classificadas como ‘não prontamente biodegradáveis’, com Pa de 0,972 para ambas.

Isso sugere que essas moléculas podem persistir por algum tempo em condições ambientais específicas antes de serem biodegradadas.

Tabela 7 - Previsão de toxicidade teórica por classificação das fenilacrilamidas – *admetSAR*®^A.

Molécula	Parâmetros	Toxicidade	Probabilidade*
EE-01	Potencial mutagênico AMES	Mutagênico	0,639
	Potencial mutagênico AMES ^B	Não mutagênico	0,710
	Potencial carcinogênico	Não cancerígeno	0,684
	Teste de micronúcleo ^B	Não genotóxico	0,640
	Toxicidade reprodutiva ^B	Não teratogênico	0,667
	Toxicidade oral aguda	III	0,600
	Carcinogenicidade (classe III)	Não carcinogênico	0,600
	Biodegradação	Não prontamente ^C	0,972
	<i>Pimephales promelas</i> (1)	Alta	0,788
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (2)	Alta	0,930
	<i>Apis mellifera</i> (3)	Baixa	0,718
EE-04	Potencial mutagênico AMES	Mutagênico	0,639
	Potencial mutagênico AMES ^B	Não mutagênico	0,640
	Potencial carcinogênico	Não cancerígeno	0,684
	Teste de micronúcleo ^B	Genotóxico	0,660
	Toxicidade reprodutiva ^B	Não teratogênico	0,633
	Toxicidade oral aguda	III	0,600
	Carcinogenicidade (classe III)	Não carcinogênico	0,679
	Biodegradação	Não prontamente ^C	0,972
	<i>Pimephales promelas</i> (1)	Alta	0,788
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (2)	Alta	0,930
	<i>Apis mellifera</i> (3)	Baixa	0,718

(A) *admetSAR*® pesquisa perfis de propriedades ADME/T: Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção, Toxicidade; (*) Quanto mais próximo de 1, maior a probabilidade de apresentar efeito biológico; (B) Parâmetros calculados pela versão 2.0 do *admetSAR*@2019; (C) Prontamente biodegradável; **EE-01** = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **EE-04** = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; (1) Previsão da toxicidade em 'Fathead minnow' (Teste de ecotoxicologia aquática); (2) Previsão da toxicidade em espécie de *Ciliophora* da família *Tetrahymenidae* (Teste de ecotoxicologia aquática); (3) Previsão da toxicidade em abelhas – 'Honey Bee' (Teste de ecotoxicologia ambiental).

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

- Toxicidade teórica das fenilacrilamidas – análise por regressão *admetSAR*®

O *admetSAR*® usa modelos de regressão para prever a DL₅₀ baseado na estrutura química dos compostos segundo Zhu e colaboradores (2009). Conforme **Tabela 8**, os isômeros EE-01 e EE-04 analisados em nossa pesquisa, não mostraram potencial carcinogênico teórico na previsão por classificação. Eles apresentaram uma DL₅₀ teórica de 2,43 moles por quilograma (mol/kg) para toxicidade oral aguda em ratos. Considerando a massa molar de 241,08 gramas por mol (g/mol) desses

derivados sintéticos, a DL₅₀ teórica corresponde a 585,83 miligramas por quilograma (mg/kg). Moléculas com DL₅₀ oral entre 50 mg/kg a 5 g/kg são consideradas de média toxicidade para ratos (WONG, 2003).

No teste de toxicidade aguda para peixes é determinado um log LC₅₀ para cada molécula. A transformação logarítmica é frequentemente utilizada para simplificar a interpretação e a análise dos resultados. Pelo modelo de regressão, o admetSAR[®] calculou, em miligramas por litro (mg/L), para o parâmetro '*Fish Toxicity*', pLC₅₀ teórica de 1,83 mg/L para os duas fenilacrilamidas. Quanto menor o valor de pLC₅₀, maior é a toxicidade da substância. Valores de pLC₅₀ < -0.5 (log LC₅₀ < -0,5) são considerados como de alta toxicidade aguda para *Pimephales promelas*.

O valor de pIGC₅₀ é um logaritmo negativo expresso em microgramas por litro (log µg/L). O modelo de regressão utilizado pelo software foi desenvolvido usando um grande conjunto de dados de toxicidade, conforme descrito por Cheng e colaboradores (2012). No caso dos derivados de 2-cianoacetamida analisados, o admetSAR[®] calculou um valor de pIGC₅₀ de 0,65 µg/L para ambas as moléculas; como o valor é maior que -0,5 as ALs possuem 'toxicidade potencial aguda' para *Tetrahymena*.

Tabela 8 - Previsão de toxicidade teórica por regressão das fenilacrilamidas – admetSAR^{®A}.

Molécula	Parâmetros	Valor	Unidade
EE-01	Toxicidade oral aguda em ratos (1)	2,43	DL ₅₀ (mol/kg)
	Toxicidade oral aguda em ratos (2)	585,83	DL ₅₀ (mg/kg)
	<i>Pimephales promelas</i> (3)	1,83	pLC ₅₀ (mg/L)
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (4)	0,65	pIGC ₅₀ (µg/L)
EE-04	Toxicidade oral aguda em ratos (1)	2,43	DL ₅₀ (mol/kg)
	Toxicidade oral aguda em ratos (2)	585,83	DL ₅₀ (mg/kg)
	<i>Pimephales promelas</i> (3)	1,83	pLC ₅₀ (mg/L)
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (4)	0,65	pIGC ₅₀ (µg/L)

(A) admetSAR[®] pesquisa perfis de propriedades ADME/T: Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade; **EE-01** = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **EE-04** = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; mol/kg = moles por quilogramas; mg/kg = miligramas por quilograma; mg/L = miligramas por litro; µg/L = microgramas por litro; (1) DL₅₀: Dose Letal mediana teórica em mol/kg: calculada por regressão pelo software; (2) DL₅₀: Dose Letal mediana teórica em mg/kg: calculado pela autora utilizando a massa molar em gramas por mol; (3) pLC₅₀: Concentração Letal Mediana para *Pimephales promelas* – '*Fathead minnow*' (Teste de ecotoxicologia aquática); (4) pIGC₅₀: é o logaritmo negativo da concentração necessária para inibir 50% do crescimento de *Tetrahymena pyriformis* (Teste de ecotoxicologia aquática).

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

- Toxicidade teórica dos fenilacrilatos – análise por classificação admetSAR©

Para os fenilacrilatos de etila, conforme a **Tabela 9**, a análise *in silico* revelou não possuírem potencial mutagênico AMES, ambos com valor de probabilidade de 0,869; quanto ao potencial carcinogênico, o teste mostrou que teoricamente nenhuma das moléculas testadas apresenta efeitos cancerígenos, ambas com Pa mediano de 0,577. A análise admetSAR@2019 nas ALs indicou uma probabilidade de 0,745 de que elas não apresentam genotoxicidade no teste de micronúcleo, e no teste de toxicidade reprodutiva teórica, os dois fenilacrilatos não foram considerados teratogênicos com probabilidade de 0,711.

Voltando aos parâmetros computados pelo admetSAR@2012, a análise indicou que os isômeros AL-09 e AL-10 se enquadram na categoria II de toxicidade oral aguda, com Pa mediano de 0,425, conforme classificação da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency - USEPA*), ou seja, implica que a dose letal média (DL₅₀) dos fenilacrilatos, que é a quantidade necessária para causar a morte de 50% de uma população em teste, varia entre 50 e 500 mg/kg (CHENG *et al.*, 2012). Ambas as moléculas analisadas obtiveram uma pontuação de 0,706 com resultado ‘não carcinogênico’ no parâmetro carcinogenicidade (Classe III), que especificamente se refere a potência carcinogênica - TD₅₀ - de uma substância.

Os dois derivados de 2-cianoacetato de etila, conforme análise teórica, apresentam uma probabilidade de 0,822 de serem inibidores fracos do gene *hERG*, que codifica a subunidade α de um canal de íons de potássio humano -também conhecido como gene humano *Ether-à-go-go*. Esses indicadores toxicológicos, não estão inclusos na Tabela 9.

No caso das previsões admetSAR© em relação a toxicidade ambiental, os fenilacrilatos de etila analisados apresentaram o mesmo resultado de probabilidade, 0,986, sendo classificados com ‘alta toxicidade teórica’ para ‘*Fathead Minnows*’. Apresentaram alta toxicidade teórica, com Pa de 1,00, para o parâmetro ‘*Tetrahymena pyriformis* Toxicity’, e classificados como de alta toxicidade para *Apis mellifera* com Pa de 0,734.

Tabela 9 - Previsão de toxicidade teórica por classificação dos fenilacrilatos – *admetSAR*®^A.

Molécula	Parâmetros	Toxicidade	Probabilidade*
AL-09	Potencial mutagênico AMES	Não mutagênico	0,869
	Potencial carcinogênico	Não cancerígeno	0,577
	Teste de micronúcleo ^B	Não genotóxico	0,745
	Toxicidade reprodutiva ^B	Não teratogênico	0,711
	Toxicidade oral aguda	II	0,425
	Carcinogenicidade (classe III)	Não carcinogênico	0,706
	Biodegradação	Prontamente ^C	0,755
	<i>Pimephales promelas</i> (1)	Alta	0,986
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (2)	Alta	1,000
	<i>Apis mellifera</i> (3)	Alta	0,734
AL-10	Potencial mutagênico AMES	Não mutagênico	0,869
	Potencial carcinogênico	Não cancerígeno	0,577
	Teste de micronúcleo ^B	Não genotóxico	0,745
	Toxicidade reprodutiva ^B	Não teratogênico	0,711
	Toxicidade oral aguda	II	0,425
	Carcinogenicidade (classe III)	Não carcinogênico	0,706
	Biodegradação	Prontamente ^C	0,755
	<i>Pimephales promelas</i> (1)	Alta	0,986
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (2)	Alta	1,000
	<i>Apis mellifera</i> (3)	Alta	0,734

(A) *admetSAR*® pesquisa perfis de propriedades ADME/T: Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção, Toxicidade; (*) Quanto mais próximo de 1, maior a probabilidade de apresentar efeito biológico; (B) Parâmetros calculados pela versão 2.0 do *admetSAR*@2019; (C) Prontamente biodegradável; **AL-09**=Etil (2E)-2-ciano-3-(2,6-diclorofenil)acrilato; **AL-10** = Etil (2E)-2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; (1) Previsão da toxicidade em ‘Fathead minnow’ (Teste de ecotoxicologia aquática); (2) Previsão da toxicidade em espécie de *Ciliophora* da família *Tetrahymenidae* (Teste de ecotoxicologia aquática); (3) Previsão da toxicidade em abelhas – ‘Honey Bee’ (Teste de ecotoxicologia ambiental).

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

As moléculas AL-09 e AL-10 foram teoricamente classificadas como ‘prontamente biodegradáveis’ ou suscetíveis à degradação, com Pa de 0,755 para ambas. Isso indica que as moléculas analisadas podem ser rapidamente e completamente biodecompostas em condições ambientais específicas. Essa classificação pode ter implicações significativas para a avaliação do impacto ambiental dos fenilacrilatos, pois sugere que esses derivados podem ser decompostos de maneira eficiente no ambiente, minimizando potenciais efeitos nocivos. Além disso, é importante destacar que a reação de obtenção das fenilacrilamidas é a reação de condensação de Knoevenagel, um processo limpo e econômico para a obtenção de produtos químicos finos, caracterizado pela simplicidade e facilidade de execução. Essa abordagem reforça ainda mais a importância de considerar não apenas a biodegradabilidade dos compostos, mas também os métodos sustentáveis de

produção, promovendo a proteção do ambiente e a busca por soluções químicas mais ecoamigáveis.

- *Toxicidade teórica dos fenilacrilatos – análise por regressão admetSAR®*

Os isômeros fenilacrilatos analisados em nossa pesquisa, não mostraram potencial genotóxico nem carcinogênico teórico na previsão por classificação. Eles apresentaram uma DL₅₀ teórica de 2,92 mol/kg para toxicidade oral aguda em ratos. Considerando a massa molar de 270,11 g/mol de ambas as moléculas, a DL₅₀ teórica corresponde a 787,98 mg/kg. Moléculas com DL₅₀ oral entre 50 mg/kg a 5g/kg são considerados de média toxicidade para ratos (WONG, 2003).

Pelo modelo de regressão, o admetSAR® calculou para o parâmetro ‘Fish Toxicity’ pLC₅₀ teórica de 0,35 mg/L para os dois fenilacrilatos, sendo considerados como de alta toxicidade aguda para *Pimephales promelas*; e para *T. pyriformis* o admetSAR® calculou um valor de pIGC₅₀ de 0,72 µg/L para ambas as moléculas; como o valor é maior que -0,5 as ALs possuem ‘toxicidade potencial aguda’ para *Tetrahymena*. Os resultados podem ser conferidos na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Previsão de toxicidade teórica por regressão dos fenilacrilatos – admetSAR®^A.

Molécula	Parâmetros	Valor	Unidade
AL-09	Toxicidade oral aguda em ratos (1)	2,92	DL ₅₀ (mol/kg)
	Toxicidade oral aguda em ratos (2)	787,98	DL ₅₀ (mg/kg)
	<i>Pimephales promelas</i> (3)	0,35	pLC ₅₀ (mg/L)
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (4)	0,72	pIGC ₅₀ (µg/L)
AL-10	Toxicidade oral aguda em ratos (1)	2,92	DL ₅₀ (mol/kg)
	Toxicidade oral aguda em ratos (2)	787,98	DL ₅₀ (mg/kg)
	<i>Pimephales promelas</i> (3)	0,35	pLC ₅₀ (mg/L)
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (4)	0,72	pIGC ₅₀ (µg/L)

(A) admetSAR® pesquisa perfis de propriedades ADME/T: Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade; **AL-09** = Etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato; **AL-10**= Etil 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; mol/kg = moles por quilogramas; mg/kg = miligramas por quilograma; mg/L = miligramas por litro; µg/L = microgramas por litro; (1) DL₅₀: Dose Letal mediana teórica em mol/kg; calculada por regressão pelo software; (2) DL₅₀: Dose Letal mediana teórica em mg/kg; calculado pela autora utilizando a massa molar em gramas por mol; (3) pLC₅₀: Concentração Letal Mediana para *Pimephales promelas* – ‘Fathead minnow’ (Teste de ecotoxicologia aquática); (4) pIGC₅₀: é o logaritmo negativo da concentração necessária para inibir 50% do crescimento de *Tetrahymena pyriformis* (Teste de ecotoxicologia aquática).

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

- *Toxicidade teórica das benzilidenemalononitrilas – análise por classificação admetSAR©*

Para os derivados de malononitrilo, conforme a **Tabela 11**, a análise pelo admetSAR©2012 revelou potencial mutagênico AMES (HANSEN *et al.*, 2009), ambos com probabilidade de 0,811. Quanto ao potencial carcinogênico, o teste mostrou que nenhum dos derivados apresenta efeitos cancerígenos, ambos com probabilidade de 0,567. A análise teórica ‘micronuclear’ dos dois isômeros indicou que as moléculas APM-04 e APM-05 não são genotóxicas, com probabilidade de 0,640 para ambas. Para os testes de toxicidade reprodutiva, a análise admetSAR@2019 indicou uma probabilidade de 0,667 de que não são teratogênicos. Para o parâmetro “mutagênese de Ames” (XU *et al.*, 2012), contrariamente à previsão teórica da versão admetSAR©2012, revelou que as benzilidenemalononitrilas não possuem potencial mutagênico, APM-04 com $Pa=0,750$ e APM-05 com $Pa=0,710$.

Voltando aos parâmetros computados pelo admetSAR@2012, a análise indicou que os isômeros APM-04 e APM-05 se enquadram na categoria II ($Pa=0,744$) de toxicidade oral aguda, conforme classificação da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency* - USEPA), ou seja, implica que a dose letal média (DL_{50}) desses compostos varia entre 50 e 500 mg/kg (CHENG *et al.*, 2012). Quanto à carcinogenicidade classe III, ambas as moléculas analisadas neste estudo obtiveram uma pontuação de 0,730 com resultado ‘não carcinogênico’. Os dois derivados de malononitrilo, conforme análise teórica, apresentam uma probabilidade de 0,886 de serem inibidores fracos do gene *hERG*. Resultados não estão inclusos na Tabela 11.

Para o modelo ‘*Fish Toxicity*’ os derivados de propanodinitrilo computados pelo admetSAR©, apresentaram o mesmo resultado de probabilidade, 0,964, sendo classificados com ‘alta toxicidade teórica’. Para o parâmetro ‘*Tetrahymena pyriformis Toxicity*’ as diclorobenzilidenemalononitrilas analisadas, apresentaram alta toxicidade teórica, com uma probabilidade de 0,976; o mesmo resultado de alta toxicidade teórica foi detectado para *Apis mellifera* com uma probabilidade de 0,666, o que pode ter implicações significativas para a saúde das abelhas

As moléculas APM-04 e APM-05 foram teoricamente classificadas como ‘não prontamente biodegradáveis’, com uma probabilidade de 0,904 para ambas. Isso

sugere que essas moléculas podem persistir por algum tempo em condições ambientais específicas antes de serem biodegradadas.

Os resultados obtidos são compatíveis com os achados de Azad e colaboradores (2021) referentes a doze derivados de malononitrilo, os quais, de acordo com a previsão do admetSAR®, não evidenciaram carcinogenicidade, teratogenicidade ou efeito irritante. Esses compostos mostram-se promissores em diversas aplicações, destacando-se a possibilidade de serem utilizados como agentes anticancerígenos, frente a linhagem MDA-MB-231 oriunda de adenocarcinoma de glândula mamária, e também como antibacterianos, com atividade frente a *S. aureus* e *E. coli*, pois foram testados *in vitro* apresentando as respectivas atividades.

Tabela 11 - Previsão de toxicidade teórica por classificação das benzilidenemalononitrilas – admetSAR®^A.

Molécula	Parâmetros	Toxicidade	Probabilidade*
APM-04	Potencial mutagênico AMES	Mutagênico	0,811
	Potencial mutagênico AMES ^B	Não mutagênico	0,750
	Potencial carcinogênico	Não cancerígeno	0,567
	Teste de micronúcleo ^B	Não genotóxico	0,640
	Toxicidade reprodutiva ^B	Não teratogênico	0,667
	Toxicidade oral aguda	II	0,744
	Carcinogenicidade (classe III)	Não carcinogênico	0,730
	Biodegradação	Não prontamente ^C	0,904
	<i>Pimephales promelas</i> (1)	Alta	0,964
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (2)	Alta	0,976
	<i>Apis mellifera</i> (3)	Alta	0,666
APM-05	Potencial mutagênico AMES	Mutagênico	0,811
	Potencial mutagênico AMES ^B	Não mutagênico	0,711
	Potencial carcinogênico	Não cancerígeno	0,567
	Teste de micronúcleo ^B	Não genotóxico	0,640
	Toxicidade reprodutiva ^B	Não teratogênico	0,667
	Toxicidade oral aguda	II	0,744
	Carcinogenicidade (classe III)	Não carcinogênico	0,730
	Biodegradação	Não prontamente ^C	0,904
	<i>Pimephales promelas</i> (1)	Alta	0,964
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (2)	Alta	0,976
	<i>Apis mellifera</i> (3)	Alta	0,666

(A) admetSAR®2012 pesquisa perfis de propriedades ADME/T: Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção, Toxicidade; (*) Quanto mais próximo de 1, maior a probabilidade de apresentar efeito biológico; (B) Parâmetros calculados pela versão 2.0 do admetSAR®2019; (C) Prontamente biodegradável; **APM-04** = [(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; **APM-05** = [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; (1) Previsão da toxicidade em 'Fathead minnow' (Teste de ecotoxicologia aquática); (2) Previsão da toxicidade em espécie de *Ciliophora* da família *Tetrahymenidae* (Teste de ecotoxicologia aquática); (3) Previsão da toxicidade em abelhas – 'Honey Bee' (Teste de ecotoxicologia ambiental).

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

- Toxicidade teórica das benzilidenemalononitrilas – análise por regressão admetSAR©

Os isômeros diclorobenzilidenemalononitrilos analisados nesta pesquisa, apresentaram uma DL₅₀ teórica de 2,99 moles por quilograma (mol/kg) para toxicidade oral aguda em ratos. Considerando a massa molar de 223,06 gramas por mol (g/mol) destes isômeros, a DL₅₀ teórica corresponde a 667,25 mg/kg. Moléculas com DL₅₀ oral entre 50 mg/kg a 5g/kg são considerados de média toxicidade para ratos (WONG, 2003).

Pelo modelo de regressão, o admetSAR© calculou, em miligramas por litro (mg/L), para o parâmetro ‘Fish Toxicity’, pLC₅₀ teórica de 0,40 mg/L para os dois derivados de malononitrilo. Valores de pLC₅₀ < -0.5 (log CL₅₀ < -0,5) são considerados como de alta toxicidade aguda para esses peixes; e também calculou um valor de pIGC₅₀ de 1,38 µg/L para ambos os derivados de malononitrilo, como o valor é maior que -0,5 as APMs possuem ‘toxicidade potencial aguda’ para *Tetrahymena*. Os resultados podem ser conferidos na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Previsão de toxicidade teórica por regressão das benzilidenemalononitrilas – admetSAR©^A.

Molécula	Parâmetros	Valor	Unidade
APM-04	Toxicidade oral aguda em ratos (1)	2,99	DL ₅₀ (mol/kg)
	Toxicidade oral aguda em ratos (2)	667,25	DL ₅₀ (mg/kg)
	<i>Pimephales promelas</i> (3)	0,40	pLC ₅₀ (mg/L)
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (4)	1,38	pIGC ₅₀ (µg/L)
APM-05	Toxicidade oral aguda em ratos (1)	2,99	DL ₅₀ (mol/kg)
	Toxicidade oral aguda em ratos (2)	667,25	DL ₅₀ (mg/kg)
	<i>Pimephales promelas</i> (3)	0,40	pLC ₅₀ (mg/L)
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (4)	1,38	pIGC ₅₀ (µg/L)

(A) admetSAR© pesquisa perfis de propriedades ADME/T: **A**bsorção, **D**istribuição, **M**etabolização, **E**xcreção e **T**oxicidade; **APM-04** = 2,6-Diclorobenzilidenemalononitrila; **APM-05** = 2,4-Diclorobenzilidenemalononitrila; mol/kg = moles por quilogramas; mg/kg = miligramas por quilograma; mg/L = miligramas por litro; µg/L = microgramas por litro; **(1)** DL₅₀: Dose Letal mediana teórica em mol/kg: calculada por regressão pelo software; **(2)** DL₅₀: Dose Letal mediana teórica em mg/kg: calculado pela autora utilizando a massa molar em gramas por mol; **(3)** pLC₅₀: Concentração Letal Mediana para *Pimephales promelas* – ‘Fathead minnow’ (Teste de ecotoxicologia aquática); **(4)** pIGC₅₀: é o logaritmo negativo da concentração necessária para inibir 50% do crescimento de *Tetrahymena pyriformis* (Teste de ecotoxicologia aquática).

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

- Toxicidade teórica das carbotioamidas – análise por classificação admetSAR©

A previsão da toxicidade teórica das hidrazina-1-carbotioamidas pelo software admetSAR©, conforme **Tabela 13**, revelou não possuírem potencial mutagênico AMES, com valores de probabilidade de 0,598 para GL-02 e, de 0,537 para GL-04, GL-07 e GL-08; quanto ao potencial carcinogênico, o teste mostrou que teoricamente nenhuma das moléculas testadas apresenta efeitos cancerígenos, todos com valores entre 0,637 e 0,652.

Ao aplicar o teste de micronúcleo *in silico* para moléculas GLs, padronizado na versão admetSAR@2019 pela pesquisa desenvolvida por Fan Defang e colaboradores (2018), observou-se que teoricamente foram consideradas genotóxicas com probabilidades que variaram de 0,870 e 0,940. Este parâmetro de genotoxicidade foi incorporado nesta versão, ampliando a capacidade preditiva em relação à versão anterior. No caso do parâmetro de mutagenicidade Ames, que existe nas duas versões admetSAR©, observou-se uma melhora significativa na precisão e confiabilidade dos modelos ao longo das versões, observado nas EEs e APMs, demonstrando a eficácia do aprimoramento contínuo dos algoritmos e das bases de dados.

No teste de toxicidade reprodutiva teórica, também realizado na versão admetSAR@2019, as quatro moléculas de hidrazina-1-carbotioamidas não foram consideradas teratogênicas com probabilidade variando entre 0,600 a 0,622.

Para toxicidade oral aguda, a análise evidenciou classificação na categoria I para todas as hidrazina-1-carbotioamidas, o que significa que a DL₅₀ é inferior ou igual a 50mg/kg, ou seja, a dose necessária de GL-02, GL-04, GL-07 e GL-08 que mata 50% de uma população em teste é inferior a 50 mg/kg (WONG, 2003). Ao analisar a carcinogenicidade teórica de classe III, são considerados “não carcinogênico” com valores entre 0,666 e 0,675.

Para *Pimephales promelas* as moléculas apresentaram alta toxicidade teórica com probabilidade entre 0,992 e 0,995. Para o parâmetro ‘*Tetrahymena pyriformis* Toxicity’ também apresentaram alta toxicidade teórica. No entanto o resultado foi de baixa toxicidade teórica para *Apis mellifera*.

As moléculas GLs foram teoricamente classificadas como ‘não prontamente biodegradáveis’, com uma probabilidade de 1,0 para todas.

Tabela 13 - Previsão de toxicidade teórica por classificação das carbotoioamidas – *admetSAR*®^A.

Molécula	Parâmetros	Toxicidade	Probabilidade*
GL-02	Potencial mutagênico AMES	Não mutagênico	0,598
	Potencial carcinogênico	Não cancerígeno	0,637
	Teste de micronúcleo ^B	Genotóxico	0,870
	Toxicidade reprodutiva ^B	Não teratogênico	0,622
	Toxicidade oral aguda	I	0,545
	Carcinogenicidade (classe III)	Não carcinogênico	0,666
	Biodegradação	Não prontamente ^C	1,000
	<i>Pimephales promelas</i> (1)	Alta	0,992
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (2)	Alta	0,999
	<i>Apis mellifera</i> (3)	Baixa	0,526
GL-04	Potencial mutagênico AMES	Não mutagênico	0,537
	Potencial carcinogênico	Não cancerígeno	0,652
	Teste de micronúcleo ^B	Genotóxico	0,940
	Toxicidade reprodutiva ^B	Não teratogênico	0,600
	Toxicidade oral aguda	I	0,511
	Carcinogenicidade (classe III)	Não carcinogênico	0,675
	Biodegradação	Não prontamente ^C	1,000
	<i>Pimephales promelas</i> (1)	Alta	0,995
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (2)	Alta	0,999
	<i>Apis mellifera</i> (3)	Baixa	0,598
GL-07	Potencial mutagênico AMES	Não mutagênico	0,537
	Potencial carcinogênico	Não cancerígeno	0,652
	Teste de micronúcleo ^B	Genotóxico	0,940
	Toxicidade reprodutiva ^B	Não teratogênico	0,600
	Toxicidade oral aguda	I	0,511
	Carcinogenicidade (classe III)	Não carcinogênico	0,675
	Biodegradção	Não prontamente ^C	1,000
	<i>Pimephales promelas</i> (1)	Alta	0,995
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (2)	Alta	0,999
	<i>Apis mellifera</i> (3)	Baixa	0,598
GL-08	Potencial mutagênico AMES	Não mutagênico	0,537
	Potencial carcinogênico	Não cancerígeno	0,652
	Teste de micronúcleo ^B	Genotóxico	0,940
	Toxicidade reprodutiva ^B	Não teratogênico	0,600
	Toxicidade oral aguda	I	0,511
	Carcinogenicidade (classe III)	Não carcinogênico	0,675
	Biodegradação	Não prontamente ^C	1,000
	<i>Pimephales promelas</i> (1)	Alta	0,995
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (2)	Alta	0,999
	<i>Apis mellifera</i> (3)	Baixa	0,598

(A) *admetSAR*® pesquisa perfis de propriedades ADME/T: Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção, Toxicidade; (*) Quanto mais próximo de 1, maior a probabilidade de apresentar efeito biológico; (B) Parâmetros calculados pela versão 2.0 do *admetSAR*@2019; (C) Prontamente biodegradável; **GL-02**= (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-04**= (2E) -2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-07**= (2E) -2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-08**= (2E) -2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; (1) Previsão da toxicidade em 'Fathead minnow' (Teste de ecotoxicologia aquática); (2) Previsão da toxicidade em espécie de *Ciliophora* da família *Tetrahymenidae* (Teste de ecotoxicologia aquática); (3) Previsão da toxicidade em abelhas – 'Honey Bee' (Teste de ecotoxicologia ambiental).

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

- Toxicidade teórica das carbotioamidas – análise por regressão admetSAR®

A DL₅₀ teórica é de 3,45 mol/kg para GL-04, GL-07 e GL-08, e de 3,56 mol/kg para GL-02 (vide **Tabela 15**). A massa molar das hidrazina-1-carbotioamidas GL-04, GL-07 e GL-08 é 248,13 g/mol correspondendo a DL₅₀ de 857,2 mg/kg; a massa molar da GL-02 é 213,69 g/mol correspondendo a DL₅₀ 760,2 mg/kg.

Para o parâmetro ‘Fish Toxicity’, a pLC₅₀ teórica foi 1,34 mg/L para GL-02 e 1,24 mg/L para as outras GLs sendo considerados como de alta toxicidade aguda para esses peixes. Os valores de pIGC₅₀ variaram entre 1,37 a 1,56 µg/L para as moléculas, como o valor é maior que -0,5 as hidrazina-1-carbotioamidas possuem ‘toxicidade potencial aguda’ para *Tetrahymena*.

Tabela 14 - Previsão de toxicidade teórica por regressão das carbotioamidas – admetSAR®^A.

Molécula	Parâmetros	Valor	Unidade
GL-02	Toxicidade oral aguda em ratos (1)	3,56	DL ₅₀ (mol/kg)
	Toxicidade oral aguda em ratos (2)	760,2	DL ₅₀ (mg/kg)
	<i>Pimephales promelas</i> (3)	1,34	pLC ₅₀ (mg/L)
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (4)	1,37	pIGC ₅₀ (µg/L)
GL-04	Toxicidade oral aguda em ratos (1)	3,45	DL ₅₀ (mol/kg)
	Toxicidade oral aguda em ratos (2)	857,2	DL ₅₀ (mg/kg)
	<i>Pimephales promelas</i> (3)	1,24	pLC ₅₀ (mg/L)
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (4)	1,56	pIGC ₅₀ (µg/L)
GL-07	Toxicidade oral aguda em ratos (1)	3,45	DL ₅₀ (mol/kg)
	Toxicidade oral aguda em ratos (2)	857,2	DL ₅₀ (mg/kg)
	<i>Pimephales promelas</i> (3)	1,24	pLC ₅₀ (mg/L)
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (4)	1,56	pIGC ₅₀ (µg/L)
GL-08	Toxicidade oral aguda em ratos (1)	3,45	DL ₅₀ (mol/kg)
	Toxicidade oral aguda em ratos (2)	857,2	DL ₅₀ (mg/kg)
	<i>Pimephales promelas</i> (3)	1,24	pLC ₅₀ (mg/L)
	<i>Tetrahymena pyriformis</i> (4)	1,56	pIGC ₅₀ (µg/L)

(A) admetSAR® pesquisa perfis de propriedades ADME/T: Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade; **GL-02**= (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-04**= (2E) -2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-07**= (2E) -2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-08**= (2E) -2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; mol/kg = moles por quilogramas; mg/kg = miligramas por quilograma; mg/L = miligramas por litro; µg/L = microgramas por litro; (1) DL₅₀: Dose Letal mediana teórica em mol/kg; calculada por regressão pelo software; (2) DL₅₀: Dose Letal mediana teórica em mg/kg; calculado pela autora utilizando a massa molar em gramas por mol; (3) pLC₅₀: Concentração Letal Mediana para *Pimephales promelas* – ‘Fathead minnow’ (Teste de ecotoxicologia aquática); (4) pIGC₅₀: é o logaritmo negativo da concentração necessária para inibir 50% do crescimento de *Tetrahymena pyriformis* (Teste de ecotoxicologia aquática).

No entanto, é importante lembrar que essas são apenas previsões e os resultados experimentais podem variar. Além disso, a toxicidade pode depender de vários fatores, incluindo a espécie de peixe, a espécie de protozoário ciliado, e as condições ambientais. Na era contemporânea, a biodegradabilidade da molécula ativa e a possível contaminação do ecossistema são considerações cruciais. O estudo de Rausch, Agostinetti e Siegloch (2023) revelou o descarte inadequado de medicamentos em Correia Pinto, cidade do estado de Santa Catarina, pela população rural. Em Jaboticabal, cidade do estado de São Paulo, análises de água revelaram a presença de substâncias farmacológicas e cafeína, representando riscos à saúde humana e ao ambiente aquático, mesmo em concentrações reduzidas. Esse fenômeno é resultado do alto consumo de medicamentos, cujos resíduos são excretados pelo organismo e acabam chegando às Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). Posteriormente, esses resíduos são liberados nos rios, juntamente com outros resíduos sanitários (CARVALHO, 2020). Ao adotarmos uma abordagem responsável em relação à síntese e uso dessas moléculas, podemos contribuir para a preservação de ecossistemas saudáveis e sustentáveis, reforçando assim nosso compromisso coletivo com a proteção do meio ambiente para as gerações futuras.

5.2 Análises toxicológicas *in vitro*

Os ensaios toxicológicos não-clínicos desempenham uma etapa crítica na fase de desenvolvimento de novos medicamentos. Quando as moléculas candidatas a fármacos são expostas a hemácias humanas, fornecem dados primários sobre suas interações com a bicamada lipídica dos eritrócitos, que abrigam dois tipos de proteínas de membrana: integrais e periféricas. A análise do potencial hemolítico e a avaliação do impacto na fragilidade osmótica, ambas realizadas *in vitro* utilizando espectrofotometria, constituem métodos simples e eficazes para a quantificação da hemólise e do efeito anti-hemolítico, respectivamente. Esses ensaios apresentam vantagens como baixo custo, rapidez e reprodutibilidade, contribuindo para a redução do uso de animais de laboratório em testes *in vivo* (FARAG; ALAGAWANY, 2018).

5.2.1 Avaliação do potencial hemolítico e do efeito sobre fragilidade osmótica

Os resultados referentes à análise do potencial hemolítico e à avaliação do efeito na fragilidade osmótica das moléculas podem ser conferidos nas **Tabelas 15 (a-c)** e **16(a-c)**, respectivamente.

- FENILACRILAMIDAS

Observou-se que EE-01 não demonstrou atividade hemolítica considerável **Tabela 15 (a-c)**, e; EE-01 e EE-04 não reduziram o grau de hemólise causado pela solução hipotônica **Tabela 16 (a-c)**. Diferentemente, EE-04 demonstrou efeito hemolítico nas maiores concentrações testadas, 300 µg/mL e 400 µg/mL, nos três tipos sanguíneos (A, B e O) em comparação com os controles negativos **Tabela 15 (a-c)**; por esse motivo, a análise dessas concentrações não foi considerada na avaliação do efeito sobre fragilidade osmótica **Tabela 16 (a-c)**.

A acrilamida têm sido envolvida em neurotoxicidade, hepatotoxicidade, imunotoxicidade, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade e carcinogenicidade em humanos e animais (RIFAI; SALEH, 2020; KOMOIKE; MATSUOKA, 2019; CHU *et al.*, 2020). No entanto, as fenilacrilamidas analisadas neste estudo não demonstraram toxicidade frente a eritrócitos humanos em concentrações abaixo de 200 µg/mL.

A concentração lítica mínima (CLM) é a menor concentração da molécula teste que produz lise parcial ou total dos eritrócitos (LEE *et al.*, 1999; LUIZE *et al.*, 2005). A CLM de EE-04 que causou lise de mais de 50% dos eritrócitos dos três tipos sanguíneos foi 400 µg/mL, esse derivado é dissubstituído em posição (*orto-para*); já o seu isômero, a molécula EE-01, cuja única diferença é a posição do halogênio cloro (*orto-orto*) não demonstrou citotoxicidade nas concentrações testadas. Possivelmente a conformação tridimensional da EE-04 favorece a interação com a membrana celular, o que pode influenciar na capacidade de causar hemólise. Nas **Figuras 14.a e 14.b** estão as estruturas moleculares em pontilhado (*Dotted*) das fenilacrilamidas representando como os elétrons estão distribuídos ao redor do núcleo de cada átomo. Há semelhança na região hidrofílica. No entanto, na EE-04, a disposição do átomo de cloro na posição 4 do anel benzeno sugere potenciais interações com as cabeças

polares dos fosfolipídios e outras regiões hidrofílicas da membrana das hemácias. Essas interações podem estender-se às proteínas transmembranares expostas ao meio aquoso, além de envolver possíveis ligações de pontes de hidrogênio ou forças de van der Waals com glicoproteínas e glicolipídios. Por outro lado, a porção hidrofóbica da EE-04 apresenta uma distribuição eletrônica que se estende até a extremidade do anel benzeno (**Figura 14.b**), quando comparada com a EE-01, que tem os elétrons nos orbitais do anel benzeno mais uniformemente distribuídos (**Figura 14.a**); essa característica poderia explicar a interação da EE-04 com as caudas hidrofóbicas dos fosfolipídios na membrana plasmática das hemácias causando disruptura; enquanto a EE-01 não produziu hemólise em nenhuma das concentrações testadas.

Polímeros à base de metacrilamida não demonstraram toxicidade para células de mamíferos em ensaio de hemólise com glóbulos vermelhos humanos (TYAGI; MISHRA, 2021). Devido às suas propriedades, os polímeros de metacrilamida são utilizados como agentes de floculação e são intermediários na produção e síntese de polímeros de alto peso molecular. Eles têm uma variedade de aplicações industriais, incluindo tratamento de águas residuais, exploração mineral, recuperação de petróleo, fabricação de papel, cosméticos, fabricação de tintas e têxteis.

- FENILACRILATOS

O aspecto visual do isômero AL-09 é de um óleo incolor, enquanto que o aspecto visual do isômero AL-10 é de um pó amarelo, o que sugere que essa característica pode ter contribuído para melhor solvatação em 20% de DMSO e 4% de Tween 80 [v/v] da molécula AL-09 quando solubilizada durante a preparação da suspensão mãe para realizar os testes *in vitro*.

Após testar as moléculas sintéticas, diluídas em concentrações que variam de 50 a 400 µg/mL, em contato com suspensão de hemácias; e incubar em condições padronizadas; foi observado que AL-10 não possui atividade hemolítica significativa **Tabela 15. (a-c)**, e AL-09 e AL-10 não alteraram a hemólise induzida por solução hipotônica **Tabela 16. (a-c)**. Contudo, AL-09 apresentou potencial hemolítico nas

concentrações mais elevadas do ensaio citotóxico, 300 e 400 µg/mL, para os tipos sanguíneos A e O (**Tabela 15.a e 15.c**); revelando ter menor potencial hemolítico para o tipo sanguíneo B (**Tabela 15.b**), concentrações estas que foram excluídas na avaliação do efeito sobre a fragilidade osmótica **Tabela 16. (a-c)**.

AL-09, o fenilacrilato dissustituído (*orto-orto*), apresentou CLM de 400 µg/mL para os tipos sanguíneos A e O, causando lise de mais de 50% dos eritrócitos (LEE *et al.*, 1999; LUIZE *et al.*, 2005). Seu isômero, AL-10 (*orto-para*), não mostrou citotoxicidade nas concentrações testadas. A conformação tridimensional de AL-09, semelhante ao que ocorreu com a molécula EE-04, pode ter favorecido a interação com a membrana celular, influenciando sua capacidade hemolítica. Nas **Figuras 15.a e 15.b** estão as estruturas moleculares em pontilhado (*Dotted*) dos fenilacrilatos representando como os elétrons estão distribuídos ao redor do núcleo de cada átomo.

O estudo dos grupo de pesquisa de Phillips e colaboradores (2017) relata um polímero catiônico, o poli(dimetilaminoetil metacrilato), PDMAEMA, com atividade antimicobacteriana potente e seletiva contra uma linhagem modelo de *Mycobacterium tuberculosis* para testes de atividade *in vitro*, não demonstrando atividade frente a bactérias Gram-negativas e nem atividade hemolítica, confirmando que tem um modo de ação único no exercício do seu efeito sobre as micobactérias. Outra estrutura polimérica, o Poli(acrilato de aminoetil) catiônico (PAEA), não possui características hidrofóbicas, e apresenta baixa capacidade hemolítica (CHEN *et al.*, 2016). A estrutura na forma polimérica destes dois acrilatos deve ter contribuído, respectivamente, para a ausência e a baixa atividade hemolítica detectada nas análises *in vitro*. Quanto a AL-09 e AL-10, os fenilacrilatos analisados neste estudo, embora pertençam à classe das acrilamidas, as fenilacrilamidas estudadas exibiram um perfil de segurança superior. Isso é promissor, pois a toxicidade celular é uma preocupação significativa no desenvolvimento de novas moléculas com potencial a fármaco.

- BENZILIDENEMALONONITRILAS

Para as benzilidemalononitrilas, nem APM-04, nem APM-05 possuem atividade hemolítica significativa **Tabela 15. (a-c)**, e nem alteraram significativamente a hemólise induzida por solução hipotônica **Tabela 16. (a-c)**.

- HIDRAZINA-1-CARBOTIOAMIDAS

Observou-se que na concentração de 200 µg/mL ocorreu hemólise em mais de 50% dos eritrócitos nos três tipos sanguíneos (A, B e O) em comparação com os controles negativos. O resultado foi semelhante para as quatro hidrazina-1-carbotioamidas analisadas; sendo a concentração de 200 µg/mL, a CLM para a maioria dos tipos sanguíneos utilizados no teste **Tabela 15. (a-c)**. Na **Tabela 16. (a-c)** não há resultado da análise das GLs quanto à avaliação do efeito sobre a fragilidade osmótica devido à lise de cerca de 30% dos eritrócitos, em concentrações a partir de 100 µg/mL, nos três tipos sanguíneos.

Nas **Figuras 17. (a-d)** estão as estruturas moleculares em pontilhado (*Dotted*) das GLs representando como os elétrons estão distribuídos ao redor do núcleo de cada átomo. Há semelhança na região hidrofílica sem ter grandes diferenças entre as quatro moléculas. O coeficiente de partição de um fármaco ($\log P$) é a medida de sua distribuição em um sistema de fase lipofílica/hidrofílica, e indica sua capacidade de penetrar sistemas biológicos multifásicos. Valores muito elevados podem manter as moléculas retidas na membrana, devido a sua alta lipossolubilidade. Todas as hidrazina-1-carbotioamidas do estudo tem $\log P$ maior que zero, indicando que as moléculas são lipofílicas e que a interação com os lipídeos de membrana pode ter favorecido a hemólise. O valor de $\log P$ para GL-02 é 2,26; o valor de $\log P$ para GL-04, GL-07 e GL-08 é 2,81, calculados pelo *ChemDraw*®, um editor de moléculas.

Apesar do risco potencial de hemólise, existem medicamentos que são amplamente utilizados na medicina devido aos significativos benefícios alcançados. A penicilina, que é um antibiótico, e a metildopa, que é um anti-hipertensivo, podem causar hemólise autoimune, na qual o sistema imunológico ataca seus próprios glóbulos vermelhos, o que pode ocorrer em concentrações clínicas (RIOS, 2020). A quinina também pode causar lise de eritrócitos durante o tratamento. Além disso, outros medicamentos são associados à anemia hemolítica incluindo: antibióticos, como as cefalosporinas; o uso prolongado de anti-inflamatórios não esteroides, como o ibuprofeno; alguns quimioterápicos, como a ciclofosfamida e o metotrexato; medicamentos como a procainamida e a quinidina; a isoniazida, que às vezes é usada como antidepressivo; e medicamentos usados na artrite reumatoide, como o auranofin (DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004; ABCMED, 2023).

Tabela 15.a - Avaliação do potencial hemolítico de diferentes concentrações em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) das moléculas sintéticas em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo A. Resultado expresso em percentagem (%) de hemólise.

Molécula	50	100	200	300	400	CN	CP
EE-01	4,3	4,1	3,3	5,0	4,7	2,1	100
EE-04	9,5	8,7	14,4	28,1	54,7	5,2	100
AL-09	7,2	9,2	15,8	35,5	56,4	5,4	100
AL-10	3,6	4,3	5,3	5,3	5,2	4,1	100
APM-04	5,4	5,4	6,9	10,3	15,9	5,4	100
APM-05	5,1	6,2	9,1	15,6	24,0	4,9	100
GL-02	13,0	37,0	85,1	97,5	98,1	7,7	100
GL-04	6,8	21,7	68,4	99,2	99,9	3,9	100
GL-07	6,4	24,2	56,5	92,9	98,1	4,1	100
GL-08	9,1	34,8	73,9	98,6	99,5	5,1	100

EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; EE-04 = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; AL-09= Etil (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato, AL-10=Etil (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; APM-04=[(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; APM-05= [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; GL-02 = (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-04= (2E) -2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-07= (2E) -2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-08= (2E) -2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; CN=Controle Negativo (Hemácias + NaCl 0,9%); CP=Controle Positivo (Hemácias + Triton X-100). Leitura em 540 nm. Em fundo cinza estão resultados de hemólise superiores a 50%.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Tabela 15.b - Avaliação do potencial hemolítico de diferentes concentrações em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) das moléculas sintéticas em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo B. Resultado expresso em percentagem (%) de hemólise.

Molécula	50	100	200	300	400	CN	CP
EE-01	4,0	4,0	4,0	5,0	7,6	2,5	100
EE-04	5,7	8,2	18,5	27,2	51,5	5,0	100
AL-09	2,5	2,6	5,4	9,4	33,7	2,1	100
AL-10	3,1	2,9	3,4	3,6	3,7	1,4	100
APM-04	3,2	3,5	3,8	3,9	4,3	3,2	100
APM-05	3,7	6,4	7,3	7,4	14,1	3,7	100
GL-02	22,9	72,9	99,6	99,9	99,2	4,6	100
GL-04	26,1	84,0	89,4	97,0	97,1	9,0	100
GL-07	11,0	29,6	82,9	98,4	99,0	4,6	100
GL-08	24,8	56,8	93,4	99,9	99,9	15,5	100

EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; EE-04 = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; AL-09= Etil (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato, AL-10=Etil (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; APM-04=[(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; APM-05= [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; GL-02 = (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-04= (2E) -2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-07= (2E) -2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-08= (2E) -2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; CN=Controle Negativo (Hemácias + NaCl 0,9%); CP=Controle Positivo (Hemácias + Triton X-100). Leitura em 540 nm. Em fundo cinza estão resultados de hemólise superiores a 50%.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Tabela 15.c - Avaliação do potencial hemolítico de diferentes concentrações em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) das moléculas sintéticas em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O. Resultado expresso em percentagem (%) de hemólise.

Molécula	50	100	200	300	400	CN	CP
EE-01	3,0	3,1	3,2	3,0	3,7	4,7	100
EE-04	6,2	10,8	24,8	50,4	81,6	5,4	100
AL-09	3,9	6,8	12,4	42,1	64,5	1,9	100
AL-10	11,1	10,9	11,2	11,1	10,7	9,2	100
APM-04	3,0	4,1	5,5	6,4	6,9	3,4	100
APM-05	5,4	8,2	8,4	11,3	11,5	4,9	100
GL-02	6,4	31,3	86,5	99,3	99,7	3,8	100
GL-04	7,7	31,4	47,5	84,0	97,7	5,0	100
GL-07	5,5	11,8	15,5	62,5	96,4	3,9	100
GL-08	9,3	12,3	33,9	73,5	89,7	9,3	100

EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; EE-04 = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; AL-09 = Etil (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato, AL-10=Etil (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; APM-04=[(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; APM-05= [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; GL-02 = (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-04= (2E) -2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-07= (2E) -2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-08= (2E) -2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; CN=Controle Negativo (Hemácias + NaCl 0,9%); CP=Controle Positivo (Hemácias + Triton X-100). Leitura em 540 nm. Em fundo cinza estão resultados de hemólise superiores a 50%.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Tabela 16.a - Avaliação do efeito sobre fragilidade osmótica de diferentes concentrações em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) das moléculas sintéticas em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo A. Resultado expresso em percentagem (%) de hemólise.

Molécula	50	100	200	300	400	CN	CP
EE-01	98,6	98,8	99,6	98,2	96,1	2,3	100
EE-04	96,2	97,1	89,8	-	-	5,7	100
AL-09	99,5	97,3	95,0	-	-	6,5	100
AL-10	100	98,3	98,0	96,9	96,9	4,2	100
APM-04	100	100	100	93,1	89,1	6,3	100
APM-05	97,7	97,7	97,8	89,9	82,1	5,1	100

EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; EE-04 = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; AL-09 = Etil (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato, AL-10=Etil (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; APM-04=[(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; APM-05= [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; CN=Controle Negativo (Hemácias+NaCl 0,9%); CP=Controle Positivo (Hemácias+NaCl 0,24%). Leitura em 540 nm.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Tabela 16.b - Avaliação do efeito sobre fragilidade osmótica de diferentes concentrações em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) das moléculas sintéticas em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo B. Resultado expresso em percentagem (%) de hemólise.

Molécula	50	100	200	300	400	CN	CP
EE-01	95,4	90,8	100,0	95,9	93,3	2,9	100
EE-04	100	94,8	90,6	-	-	6,4	100
AL-09	100	99,8	98,3	-	-	2,2	100
AL-10	94,5	95,0	95,0	95,1	100	1,6	100
APM-04	97,4	97,9	92,0	91,7	91,1	3,5	100
APM-05	94,4	96,3	93,2	96,6	86,3	4,5	100

EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **EE-04** = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; **AL-09**= Etil (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato, **AL-10**=Etil (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; **APM-04**=[(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; **APM-05** = [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; **CN**=Controle Negativo (Hemácias+NaCl 0,9%); **CP**=Controle Positivo (Hemácias+NaCl 0,24%). Leitura em 540 nm.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Tabela 16.c - Avaliação do efeito sobre fragilidade osmótica de diferentes concentrações em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) das moléculas sintéticas em eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O. Resultado expresso em percentagem (%) de hemólise.

Molécula	50	100	200	300	400	CN	CP
EE-01	94,0	93,6	97,6	99,1	99,7	5,4	100
EE-04	100	91,4	80,4	-	-	6,0	100
AL-09	100	92,4	90,8	-	-	1,9	100
AL-10	96,5	92,2	89,1	85,6	96,6	10,9	100
APM-04	99,9	99,9	97,8	92,2	92,6	4,0	100
APM-05	96,9	92,0	97,3	95,8	95,2	6,2	100

EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **EE-04** = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; **AL-09**= Etil (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato, **AL-10**=Etil (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; **APM-04**=[(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; **APM-05** = [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; **CN**=Controle Negativo (Hemácias+NaCl 0,9%); **CP**=Controle Positivo (Hemácias+NaCl 0,24%). Leitura em 540 nm.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

5.2.2 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante

O potencial oxidante, potencial antioxidante e os índices de metaemoglobina das moléculas, EEs, ALs, APMs e GLs, foram testados em concentrações que variaram de 50 a 400 $\mu\text{g/mL}$, foram avaliados pela quantificação da oxidação da hemoglobina humana, sendo comparados com os respectivos controles. Os resultados estão nas **Tabelas 17, 18 e 19**.

- FENILACRILAMIDAS

Os derivados de 2-cianoacetamida não apresentaram potencial oxidante (7,7% para EE-01 e 9,6% para EE-04) e foram capazes de reduzir discretamente a oxidação induzida pela fenilhidrazina, um comprovado agente oxidante, em torno de 5%.

- FENILACRILATOS

Os derivados de 2-cianoacetato de etila não apresentaram potencial oxidante (2,7% para AL-09 e 8,4% para AL-10). A AL-09 não foi capaz de reduzir a oxidação induzida pela fenilhidrazina, enquanto a AL-10 reduziu a oxidação em torno de 20% nas maiores concentrações mostrando um perfil concentração-dependente.

- BENZILIDENEMALONONITRILAS

Os derivados de malononitrilo apresentaram baixo potencial oxidante (10,0% para APM-04 e 9,6 % para APM-05). Ambos reduziram a oxidação produzida pela fenilhidrazina em torno de 30% em todas as concentrações.

- HIDRAZINA-1-CARBOTIOAMIDAS

As hidrazinas-1-carbotioamidas não apresentaram potencial oxidante (3,8% para GL-02; 7,9% para GL-04, 8,7% para GL-07 e 2,9% para GL-08). GL-02 e GL-04 foram capazes de reduzir a oxidação induzida pela fenilhidrazina, um comprovado agente oxidante, em torno de 15%.

Os índices de metaemoglobina para as para EE-01 e EE-04, foram respectivamente, em torno de 4,0% e 3,8%; para AL-09 e AL-10, foram respectivamente, em torno de 3,3% e 4,0%; para APM-04 e APM-05, foram respectivamente, em torno de 5,9 % e 5,7 %; e para as GLs variaram entre 2,8% a 4,0% estando entre os valores considerados normais por Carmargo *et al.* (2007). Valores acima de 4% são considerados elevados.

Tabela 17 - Avaliação do potencial oxidante de diferentes concentrações em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) das moléculas sintéticas em suspensão de hemoglobina humana. Resultado expresso em percentagem (%) Metaemoglobina (MHb).

Molécula	50	100	200	300	400	CN	CP
EE-01	7,5	7,5	7,1	7,1	7,7	8,0	100
EE-04	8,1	8,3	8,1	8,3	9,6	8,5	100
AL-09	2,7	2,7	2,6	2,6	2,7	2,8	100
AL-10	8,1	7,6	8,0	8,0	8,4	7,8	100
APM-04	9,2	10,0	9,6	9,9	10,0	8,0	100
APM-05	9,6	9,4	9,1	9,1	9,5	8,0	100
GL-02	3,7	3,7	3,3	3,8	3,6	2,3	100
GL-04	7,9	7,9	7,9	7,9	7,9	8,0	100
GL-07	8,4	8,5	8,7	8,4	8,5	8,5	100
GL-08	2,6	2,6	2,4	2,9	2,8	2,4	100

EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; EE-04 = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; AL-09= Etil (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato, AL-10=Etil (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; APM-04=[(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; APM-05= [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; GL-02 = (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-04= (2E) -2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-07= (2E) -2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-08= (2E) -2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; CN=Controle Negativo (Hemoglobina); CP=Controle Positivo (Hemoglobina + Fenilhidrazina). Leitura em 540 nm (absorção específica da oxiemoglobina); 630 nm (absorção específica da MHb).

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Tabela 18 - Avaliação do potencial antioxidante de diferentes concentrações em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) das moléculas sintéticas em suspensão de hemoglobina humana. Resultado expresso em percentagem (%) Metaemoglobina (MHb).

Molécula	50	100	200	300	400	CN	CP
EE-01	90,5	90,8	90,8	90,8	97,6	8,0	100
EE-04	95,0	95,5	94,7	93,2	93,3	8,5	100
AL-09	99,2	98,8	98,0	97,7	94,1	2,8	100
AL-10	93,1	92,7	86,2	80,0	79,0	7,8	100
APM-04	60,9	62,4	67,1	67,3	68,0	8,0	100
APM-05	70,4	69,2	71,1	71,1	70,5	8,0	100
GL-02	78,0	81,3	83,6	84,1	87,2	2,3	100
GL-04	83,5	84,0	83,0	83,6	84,2	8,0	100
GL-07	89,8	84,7	92,5	93,5	98,5	8,5	100
GL-08	95,4	95,7	96,3	98,6	98,6	2,4	100

EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; EE-04 = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; AL-09= Etil (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato, AL-10=Etil (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; APM-04=[(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; APM-05= [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; GL-02 = (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-04= (2E) -2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-07= (2E) -2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-08= (2E) -2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; CN=Controle Negativo (Hemoglobina); CP=Controle Positivo (Hemoglobina + Fenilhidrazina). Leitura em 540 nm (absorção específica da oxiemoglobina); 630 nm (absorção específica da MHb). Em fundo cinza redução da oxidação induzida pela fenilhidrazina.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Tabela 19 – Índice de metaemoglobina de diferentes concentrações em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) das moléculas sintéticas em suspensão de hemoglobina humana. Resultado expresso em percentagem (%) Metaemoglobina (MHb).

Molécula	50	100	200	300	400	CN
EE-01	4,0	3,8	3,6	3,6	4,0	4,0
EE-04	3,8	3,8	3,8	3,8	3,7	3,9
AL-09	3,2	3,2	3,0	3,3	3,3	3,3
AL-10	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	3,8
APM-04	5,4	5,9	5,6	5,5	5,9	4,0
APM-05	5,1	4,9	5,7	4,6	4,7	4,0
GL-02	3,8	3,8	4,0	4,0	4,0	2,3
GL-04	4,0	3,9	4,0	3,9	3,9	4,0
GL-07	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
GL-08	2,8	2,8	2,8	3,0	3,0	2,5

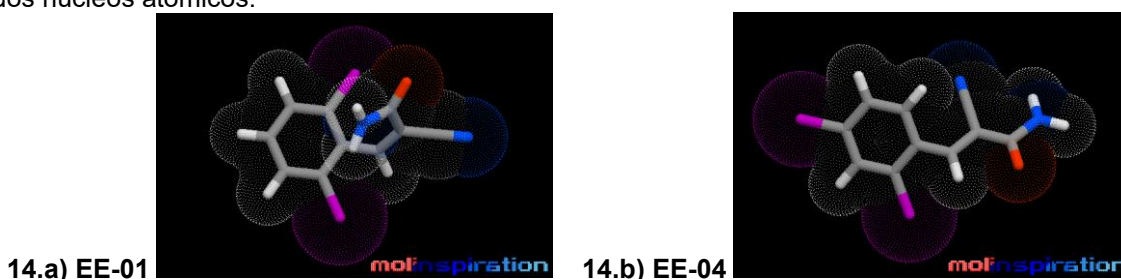
EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; EE-04 = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; AL-09= Etil (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato, AL-10=Etil (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; APM-04=[(2,6-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; APM-05= [(2,4-diclorofenil)metilideno]propanodinitrila; GL-02 = (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-04= (2E) -2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-07= (2E) -2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; GL-08= (2E) -2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; CN=Controle Negativo (Hemoglobina); CP=Controle Positivo (Hemoglobina + Fenilhidrazina). Leitura em 540 nm (absorção específica da oxiemoglobina); 630 nm (absorção específica da MHb).

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

- Dotted das FENILACRILAMIDAS

As estruturas moleculares das fenilacrilamidas, representadas em pontilhado (Dotted) nas **Figura 14 (a-b)**, mostram como os elétrons estão distribuídos ao redor do núcleo de cada átomo. Há uma semelhança na região hidrofílica dessas moléculas. Apesar das diferenças, isso não parece ter influenciado na capacidade oxidante e nem antioxidante das EEs.

Figura 14 - As estruturas moleculares em pontilhado (*Dotted*) dos derivados de 2-cianoacetamida; **14.a)** EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **14.b)** EE-04 = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; geradas no *Galaxy Visualizer* da ferramenta *Molinspiration*© mostrando distribuição eletrônica ao redor dos núcleos atômicos.



Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Além da formação da acrilamida nos alimentos, principalmente através da reação de Maillard entre açúcares redutores e asparagina (MOTTRAM; WEDZICHA; DODSON, 2002), o tabagismo e a exposição ao fumo passivo também são fontes de exposição com acrilamida variando de 1,1 a 2,34 µg/cigarro (SMITH *et al.*, 2000). A acrilamida e seus produtos de degradação, ao interagirem com a hemoglobina, têm a capacidade de formar ligações covalentes, resultando em adutos de hemoglobina. A oxidação da hemoglobina induzida pela acrilamida pode comprometer sua estrutura e função, interferindo na eficácia do transporte de oxigênio. Adicionalmente, a determinação de adutos de hemoglobina e acrilamida é cada vez mais utilizada para melhorar a avaliação da exposição à acrilamida (PEDERSEN *et al.*, 2022). As moléculas sintéticas, EE-01 e EE-04, analisadas neste estudo não demonstraram potencial oxidante sugerindo que não devam formar adutos de hemoglobina e EEs.

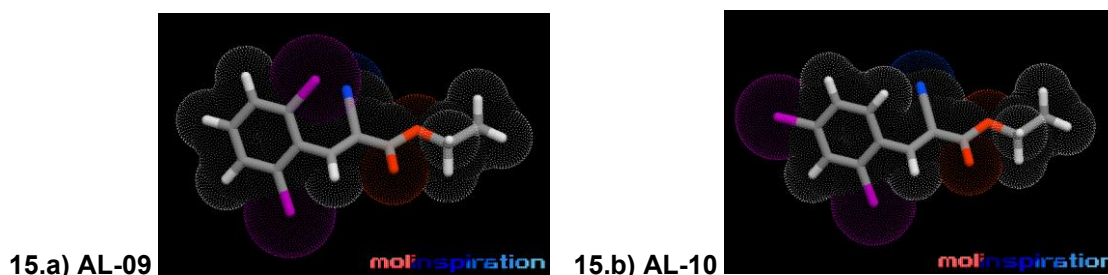
Entre as atividades biológicas mencionadas anteriormente, demonstrou-se que o derivado 6a, (E) -2-ciano-N-(2-metoxifenil) -3-(2 (trifluorometil) fenil) acrilamida, possui um forte efeito citoprotetor contra a morte celular induzida por H₂O₂ em HBZY-1. Adicionalmente, observou-se um aumento significativo na expressão de proteínas antioxidantes a jusante de Nrf2. Sendo 6a uma molécula promissora para a criação de um novo agente com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, com potencial para prevenir enfermidades decorrentes de estresse oxidativo e inflamação (GU *et al.*, 2019). Outro estudo com o composto NED416 demonstrou um aumento expressivo na atividade de Sirt1 em fibroblastos dérmicos e queratinócitos epidérmicos, superando o resveratrol. Este aumento resultou em uma maior migração celular e angiogênese, ativadas por Rac1/Cdc42 e ERK/JNK, que desempenham papéis importantes na regulação da resposta celular ao estresse oxidativo e na manutenção do equilíbrio redox dentro da célula (WAHEDI, 2020). Contrariamente, EE-01 e EE-04 não foram capazes de inibir a oxidação da hemoglobina.

- *Dotted* dos FENILACRILATOS

A distribuição eletrônica ao redor dos núcleos atômicos dos fenilacrilatos; AL-09 e AL-10, é mostrada na **Figura 15 (a-b)**, respectivamente. Nenhuma tem grupos doadores de prótons, ambas têm 3 grupos receptores de prótons. Sugerindo que na

molécula AL-10, a distribuição eletrônica pode contribuir para neutralizar espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem causar danos oxidativos à hemoglobina; ou ainda; neutralizar intermediários reativos que estão envolvidos em reações de oxidação direta na hemoglobina (SMITH *et al.*, 2000). A principal diferença entre AL-09 e AL-10 está na posição dos substituintes no anel fenil, a posição 6 do cloro na molécula AL-09 faz com que o cloro fique mais próximo do átomo de nitrogênio (LIMA *et al.*, 2024b).

Figura 15 - As estruturas moleculares em pontilhado (*Dotted*) dos fenilacrilatos; **15.a)** AL-09 = Etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil)acrilato; **15.b)** AL-10 = Etil 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil)acrilato; geradas no *Galaxy Visualizer* da ferramenta *Molinspiration*® mostrando distribuição eletrônica ao redor dos núcleos atômicos.



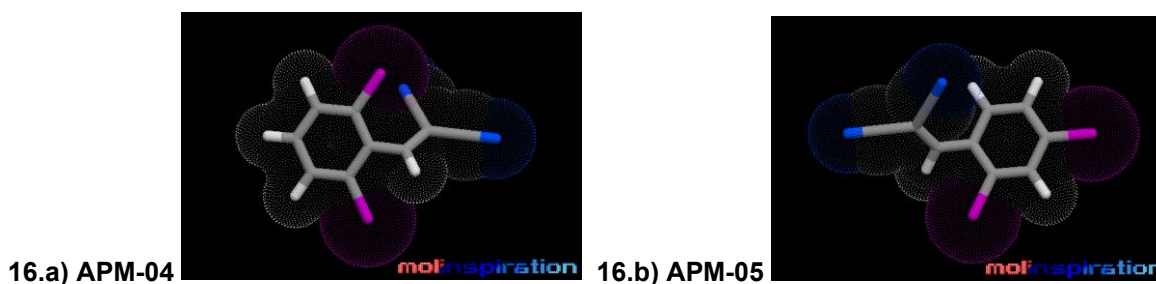
Fonte: NANES-LIMA, 2024.

- *Dotted* das BENZILIDENEMALONONITRILAS

A distribuição eletrônica ao redor dos núcleos atômicos das benzilidenemalononitrilas; APM-04 e APM-05, é mostrada na **Figura 16 (a-b)**, respectivamente, ambas não possuem nenhum grupo doador de prótons e tem 2 grupos receptores de prótons. Pelos resultados obtidos nos testes *in vitro*, estes grupos parecem ter afinidade pela hemoglobina. Em teoria, se a molécula sintética for capaz de interagir com a hemoglobina de uma maneira que estabilize sua estrutura ou minimize sua exposição a agentes oxidantes, então ela poderia ajudar a proteger a hemoglobina contra a oxidação, ou seja, atuar como antioxidante. Embora as benzilidenemalononitrilas tenham demonstrado potencial antioxidante, os valores do o índice de metaemoglobina observado para APM-04 e APM-05, foram de 5,9% e 5,7%, respectivamente; sendo, portanto, superior a 4,0%, o que é considerado relevante. Além disso, embora uma substância possa ter potencial antioxidante, isso

não significa necessariamente que ela impeça a formação de metaemoglobina. O potencial antioxidante se refere à capacidade de uma substância de neutralizar radicais livres, que são moléculas instáveis que podem causar danos às células. No entanto, a formação de metaemoglobina é um processo diferente que envolve a oxidação da hemoglobina, este é efeito que analisamos. Isso sugere que, possivelmente, nas benzilidenemalononitrilas tem dois locais de interação entre as moléculas e a hemoglobina, ou ainda que, a existência de outros fatores, além do potencial antioxidante, está influenciando a taxa de formação de metaemoglobina na presença das benzilidenemalononitrilas.

Figura 16 - As estruturas moleculares em pontilhado (*Dotted*) das benzilidenemalononitrilas; **16.a) APM-04** = 2,6-Diclorobenzilidenemalononitrila; **16.b) APM-05** = 2,4-Diclorobenzilidenemalononitrila; geradas no *Galaxy Visualizer* da ferramenta *Molinspiration*© mostrando distribuição eletrônica ao redor dos núcleos atômicos.



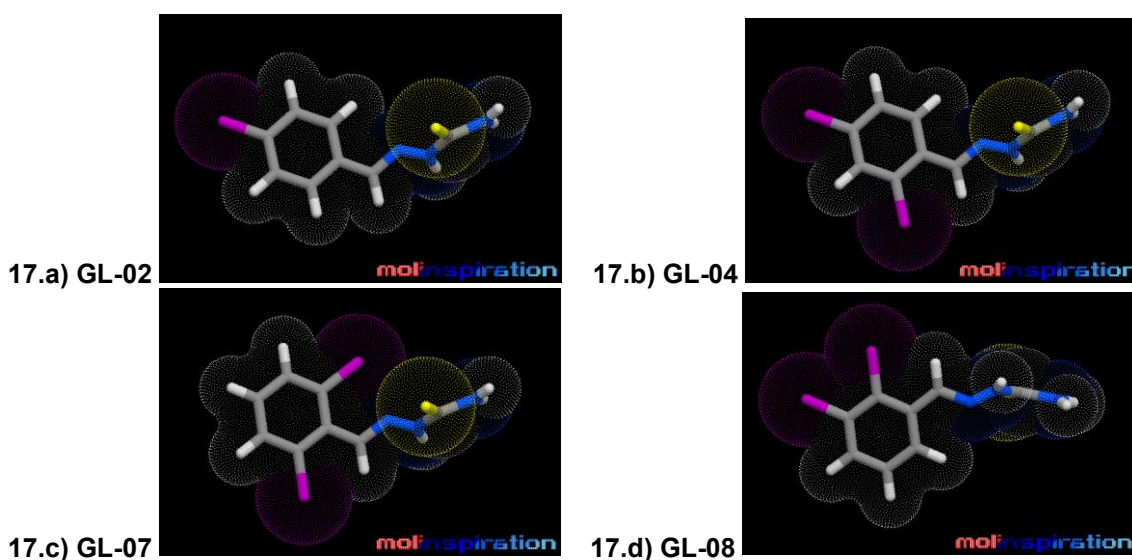
Fonte: NANES-LIMA, 2024.

- *Dotted* das HIDRAZINA-1-CARBOTIOAMIDAS

Na **Figura 17 (b-d)** estão as estruturas moleculares em pontilhado (*Dotted*) das GLs (04, 07 e 08) representando como os elétrons estão distribuídos ao redor do núcleo de cada átomo. Cada um destes isômeros, apesar de ter a mesma fórmula molecular, ou seja, a mesma quantidade de átomos de cada elemento químico, apresentou uma superfície molecular pontilhada única, refletindo sua estrutura tridimensional distinta. Os isômeros, GL-07 e GL-08, são discretamente mais hidrofóbicos que o isômero GL-04, o que pode indicar uma maior solubilidade em ambientes lipídicos. No entanto, GL-02 (**Figura 17.a**), que tem um átomo de cloro a menos na sua estrutura molecular, quando comparado a outras hidrazinas estudadas, exibiu uma superfície molecular pontilhada com uma distribuição de carga levemente

mais polarizada, assemelhando-se a molécula GL-04 (diclorada em posição *orto-para*), sugerindo que podem ter uma maior afinidade por alvos biológicos polares; esta característica pode ter contribuído com o potencial antioxidante detectado. Estas análises nos permitem prever e entender melhor as propriedades físico-químicas e a atividade biológica potencial de cada molécula. Isso destaca a importância de considerar a estrutura tridimensional na concepção e otimização de moléculas bioativas

Figura 17.(a-d) - As estruturas moleculares em pontilhado (*Dotted*) das hidrazina-1-carbotioamidas; **17.a)** GL-02 = 2-[(4-clorofenil) metilideno] hidrazina-1-carbotioamida; **17.b)** GL-04 = 2-[(2,4-diclorofenil)metilideno] hidrazina-1-carbotioamida; **17.c)** GL-07 = 2-[(2,6-diclorofenil)metilideno] hidrazina-1-carbotioamida; **17.d)** GL-08 = 2-[(2,3-diclorofenil)metilideno] hidrazina-1-carbotioamida; geradas no *Galaxy Visualizer* da ferramenta *Molinspiration*® mostrando distribuição eletrônica ao redor dos núcleos atômicos.



Fonte: NANES-LIMA, 2024.

5.3 Atividade antibacteriana

5.3.1 Concentração inibitória mínima e Concentração Bactericida mínima

Os antibióticos utilizados como controle foram clindamicina e cloranfenicol, para as bactérias Gram-positivas, e amicacina e cloranfenicol, para as bactérias Gram-negativas em concentrações que variaram de 1.024 µg/mL a 8 µg/mL. Os resultados estão na **Tabela 20** e, foram interpretados pelo CLSI M-100 S-30 (2020).

Tabela 20 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos antibióticos controle.

Antibióticos controle ⇒	AMI	CLI	CLO
Linhagens bacterianas ↓	CIM µg/mL (Interpretação)		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	< 8 (S*)	8 (S)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	<8 (S*)	16 (S)
<i>Staphylococcus aureus</i> 01	-	<8 (S*)	<8 (S)
<i>Staphylococcus aureus</i> 02	-	< 8 (S*)	< 8 (S)
MRSA ATCC 33591	-	< 8 (S*)	16 (S)
MRSA 216	-	< 8 (S*)	8 (S)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	< 8 (S*)	< 8 (S)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 360	-	< 8 (S*)	< 8 (S)
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	-	< 8 (S)	< 8 (S)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	< 8 (S)	< 8 (S)
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> 125	-	< 8 (S)	< 8 (S)
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> ZN	-	< 8 (S)	< 8 (S)
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> 216	-	< 8 (S)	< 8 (S)
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	-	8	8 (S)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	-	8	8 (S)
<i>Enterococcus faecalis</i> VRE ATCC 51299	-	16	16 (S)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<8 (S)	-	8 (S)
<i>Escherichia coli</i> ESBL+	< 8 (S)	-	8 (S)
<i>Escherichia coli</i> H2S+ ESBL+	< 8 (S)	-	8 (S)
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 13883	< 8 (S)	-	8 (S)
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 700603	< 8 (S)	-	8 (S)
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KPC+	< 8 (S)	-	256 (R)
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> ESBL+	< 8 (S)	-	8 (S)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	< 8 (S)	-	32 (S)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR	1.024 (R)	-	512 (R)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	< 8 (S)	-	16 (S)

AMI = ampicilina; **CLI**=clindamicina; **CLO**=cloranfenicol; **CIM**=concentração inibitória mínima; **(-)** =CIM não realizada; **µg/mL**= microgramas por mililitro; **(<)** = menor que; **ATCC** = *American Type Culture Collection*; **MRSA**=*S. aureus* resistente a meticilina; **MR**=multirresistente; **(S)**=sensível; **(S*)**=sensível no teste de disco difusão; **(R)**=resistente. Resultados interpretados pelo CLSI M-100 S-30 (2020).

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

- FENILACRILAMIDAS

Entre as quinze atividades com maior probabilidade de serem ativos (Pa) para os derivados de 2-cianoacetamida identificadas pelo PASS Online®, não foi observada atividade antibacteriana.

Na **Tabela 21** estão os resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das

fenilacrilamidas, EE-01 e EE-04, frente a linhagens de referência e isolados clínicos. Em relação ao gênero *Staphylococcus* spp., houve detecção de CIM=256 µg/mL para a EE-01 na linhagem *S. aureus* 02. No restante das linhagens de *S. aureus* a CIM não foi determinada (ND) até a maior concentração testada. Ambas as moléculas apresentaram atividade frente ao isolado clínico de *S. saprophyticus*, com CIM de 64 µg/mL; no entanto, apenas a EE-01 teve CBM determinada, sendo igualmente 64 µg/mL. Adicionalmente, observou-se que a EE-04 chegou a inibir consideravelmente o crescimento de *S. saprophyticus* pois houve crescimento de raras colônias bacterianas em ágar BAB até a concentração de 1.024 µg/mL.

A atividade das fenilacrilamidas destacou-se frente ao gênero *Streptococcus* spp., especialmente nas linhagens de *Streptococcus* do grupo *Viridans* (125 e ZN), ambas as moléculas demonstraram boa atividade obtendo CIM e CBM inferiores a 8 µg/mL. A atividade frente a *S.* do grupo *Viridans* 216 foi discrepante em relação as outros isolados do mesmo grupo com CIM de 128 µg/mL e CBM de 1.024 µg/mL para ambas as moléculas; possivelmente porque esta linhagem teve passagem por cinco antibióticos durante o tratamento de uma pneumonia causada pelo MRSA 216, também analisado neste estudo, e isolado das fossas nasais da mesma paciente (Comunicação verbal); a pressão seletiva poderia explicar esse comportamento. Para *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 detectou-se CIMs de 64 µg/mL (EE-01) e 128 µg/mL (EE-04) obtendo assim atividade antibacteriana moderada.

Não foram determinadas CIMs, até a maior concentração testada, para nenhuma das linhagens dos gêneros *Enterococcus* spp. e *Klebsiella* spp., nem para as de *E. coli* e *P. aeruginosa*, e nem para a de *S. epidermidis* ATCC 12228, nas concentrações padronizadas do teste de atividade antibacteriana sendo a maior concentração de 1.024 µg/mL. De acordo com Guimarães, Momesso e Pupo (2010), as bactérias Gram-negativas são mais resistentes a ação dos antibióticos devido à natureza mais complexa da parede celular que os impedem de cruzar efetivamente esta barreira lipídica. Não se detectou atividade antibacteriana para as EEs frente a nenhuma linhagem Gram-negativa testada. Para ter acesso à célula bacteriana, os antibióticos devem atravessar a parede celular através dos canais proteicos de porina, embebidos na estrutura lipídica, que apresentam o interior com características hidrofílicas. Assim, os antibióticos que possuem maior atividade frente a bactérias

Gram-negativas, são aqueles que apresentam grupos ionizáveis em suas estruturas químicas permitindo que os mesmos passem por estes canais de porina e alcancem o interior da célula bacteriana.

Tabela 21 – Avaliação da atividade antibacteriana das fenilacrilamidas frente a linhagens de referência e isolados clínicos.

Linhagens bacterianas	CIM / ↓CBM das fenilacrilamidas	
	EE-01	EE-04
<i>Staphylococcus aureus</i> 02	256 / ND	ND / ND
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	64 / ↓64	64 / ND
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	64 / ↓1.024	128 / ↓1.024
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> 125	<8 / ↓<8	<8 / ↓<8
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> ZN	<8 / ↓<8	<8 / ↓<8
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> 216	128 / ↓1.024	128 / ↓1.024

EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **EE-04** = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; **ND** = CIM não determinada; **CIM** = Concentração Inibitória Mínima em microgramas por mililitro (µg/mL); (**<**) = menor que; (**↓**) = **CBM** = Concentração Bactericida Mínima (µg/mL); **ATCC** = *American Type Culture Collection*. Em fundo cinza estão as CIMs e/ou CBMs menores.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

O estudo de Chen e colaboradores (2016) descreve uma estratégia eficiente e econômica para construir polímeros antimicrobianos com componente catiônico líquido e arquitetura hiper-ramificada. O poli(acrilato de aminoetil) catiônico (PAEA), escolhido por sua baixa atividade hemolítica e direcionamento para membranas bacterianas carregadas negativamente, mostrou alta eficácia contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Os polímeros antibióticos, também conhecidos como imitadores sintéticos de peptídeos antimicrobianos (SMAMPs), são à base de metacrilamida, não tem resistência bacteriana detectável, e são uma alternativa promissora a antibioticoterapia. Estudos sugerem que esses polímeros atuam destruindo a membrana citoplasmática das bactérias. Além disso, não foram encontrados mutantes resistentes após 30 dias de exposição ao polímero AB-19 (TYAGI, MISHRA, 2021).

Os resultados de atividade antibacteriana das EEs são promissores, especialmente contra isolados clínicos de *Streptococcus* do grupo *Viridans*, com concentrações bactericidas mínimas inferiores a 8 µg/mL. Apesar de pertencerem à classe das acrilamidas, as fenilacrilamidas apresentaram um perfil de segurança superior no estudo toxicológico não clínico, destacando-se o isômero EE-01 (diclorado

em *orto-orto*), que não exibiu potencial hemolítico nas concentrações testadas nesta pesquisa, que variaram de 50 a 400 µg/mL. Esses achados são encorajadores, considerando que a toxicidade celular é um desafio crítico no desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas

- FENILACRILATOS

Entre as quinze atividades com maior probabilidade de serem ativos (Pa) identificadas pelo PASS Online© para os derivados de 2-cianoacetato de etila, não foi observada atividade antibacteriana. Na **Tabela 22** estão os resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos fenilacrilatos, AL-09 e AL-10, frente a linhagens de referência e isolados clínicos.

Frente ao gênero *Staphylococcus* spp., ambas as moléculas apresentaram atividade frente ao isolado clínico de *S. saprophyticus*, com CIM de 256 µg/mL chegando a inibir consideravelmente o crescimento desta bactéria pois houve crescimento de poucas colônias bacterianas em ágar BAB até a maior concentração testada (1.024 µg/mL). No restante das linhagens de *S. aureus* a CIM não foi determinada (ND), ou seja, houve crescimento em todas as concentrações do teste.

A atividade das ALs destacou-se frente ao gênero *Streptococcus* spp., especialmente nos isolados clínicos de *S.* do grupo *Viridans* (125 e ZN), ambas as moléculas demonstraram atividade considerável obtendo CIM < 8 µg/mL, exceto para a AL-10 frente a linhagem ZN com CIM=32 µg/mL, as CBMs variaram de 8 a 256 µg/mL. A CIM determinada frente a linhagem *S.* do grupo *Viridans* 216 foi de 512 µg/mL para AL-09. Para *S. pyogenes* ATCC 19615 detectou-se CIMs de 128 µg/mL (AL-09) e 256 µg/mL (AL-10) e CBMs de 1.024 µg/mL e 512 µg/mL, respectivamente.

Não foram determinadas CIMs, até a maior concentração do teste, para nenhuma das linhagens dos gêneros *Enterococcus* spp. e *Klebsiella* spp., nem para as linhagens de *E. coli*, *P. aeruginosa*, e nem para os isolados clínicos de *S. agalactiae* e *S. epidermidis* ATCC 12228, nas concentrações padronizadas do teste de atividade antibacteriana.

Tabela 22 – Avaliação da atividade antibacteriana dos fenilacrilatos frente a linhagens de referência e isolados clínicos.

Linhagens bacterianas	CIM / ↓ CBM dos fenilacrilatos	
	AL-09	AL-10
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 360	256 / ND	256 / ND
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	128 / ↓1.024	256 / ↓512
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> 125	<8 / ↓64	<8 / ↓256
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> ZN	<8 / ↓<8	32 / ↓128
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> 216	512 / ND	ND / ND

AL-09=Etil (2E)-2-ciano-3-(2,6-diclorofenil)acrilato; **AL-10**= Etil (2E)-2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato; **ND** = CIM não determinada; **CIM** = Concentração Inibitória Mínima em microgramas por mililitro (µg/mL); (<) = menor que; (↓) = **CBM** = Concentração Bactericida Mínima (µg/mL); **ATCC** = *American Type Culture Collection*. Em fundo cinza estão as CIMs e/ou CBMs menores.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Poucas são as fontes que exploram a atividade antibacteriana dos fenilacrilatos, ao contrário dos acrilatos que são amplamente estudados. O grupo de pesquisa de Kenawy e colaboradores (2019) sintetizaram uma base de Schiff em quitosana funcionalizada com metil acrilato contendo grupos p-nitrobenzaldeído, resultando em um novo composto, o AmCs-pNBA, que mostrou atividades antimicrobiana, antioxidante e antibiofilme significativamente superiores às da quitosana original, além de apoiar a viabilidade e proliferação celular sem causar hemólise. AmCs-pNBA exibiu inibição do crescimento microbiano em concentrações variando entre 50 e 200 µg/mL em 16 linhagens, entre bactérias e leveduras. Frente a linhagem de *S. aureus* ATTC 25923 a CIM foi 100 µg/mL. Esses resultados destacam o potencial do AmCs-pNBA como um novo candidato a biomaterial com propriedades antibacterianas, antibiofilme e antioxidantes aprimoradas, abrindo uma nova perspectiva em aplicações biomédicas. A principal vantagem dessa funcionalização foi a sua preparação bem-sucedida à temperatura ambiente, que evitou a polimerização do acrilato de metila e permitiu que ele reagisse completamente com a quitosana.

Outro estudo investigou as propriedades antibacterianas e a hemocompatibilidade de 27 polímeros sintéticos diferentes preparados por polimerização de transferência de cadeia por adição-fragmentação reversível (RAFT). As atividades antibacterianas foram testadas contra *P. aeruginosa* PA01 e *E. coli* K12. Os polímeros lineares, hiperramificados e estrelados foram correlacionados com sua topologia, demonstrando que os polímeros estrelados exibiram maior bioatividade em

comparação com os hiperramificados e lineares, sem toxicidade em relação às células sanguíneas, indicando uma promissora estratégia para desenvolvimento de polímeros antibacterianos sintéticos (AQUIB *et al.*, 2024).

- BENZILIDENEMALONONITRILAS

Entre as quinze atividades com maior probabilidade de serem ativos (Pa) identificadas pelo PASS Online© para as benzilidenemalononitrilas, não foi observada atividade antibacteriana. Na **Tabela 23** estão os resultados da determinação da CIM e da CBM das moléculas benzilidenemalononitrilas, APM-04 e APM-05, frente a linhagens de referência e isolados clínicos.

Frente ao gênero *Staphylococcus* spp., ambas as moléculas apresentaram atividade no isolado clínico *S. aureus* 02, a CIM para a APM-04 foi 256 µg/mL e para APM-05 foi 1.024 µg/mL. Observou-se ainda atividade antibacteriana da APM-04 frente a outras três linhagens de *S. aureus* com CIM variando entre 128 a 512 µg/mL, e CBM de 512 µg/mL para as linhagens *S. aureus* 01 e o isolado clínico MRSA 216. Ambas as moléculas apresentaram atividade frente a linhagem de *S. saprophyticus*, com CIM de 64 µg/mL; no entanto a CBM da APM-04 foi 64 µg/mL e a da APM-05 foi 128 µg/mL. Adicionalmente, observou-se que a APM-04 chegou a inibir o crescimento de *S. epidermidis* ATCC 12228 com CIM de 256 µg/mL com atividade bactericida na concentração de 512 µg/mL.

A atividade das benzilidenemalononitrilas destacou-se frente ao gênero *Streptococcus* spp., incluindo *S. pyogenes*, *S.* do grupo *Viridans* e *S. agalactiae*. A atividade da APM-04 foi quase idêntica à da APM-05, exceto pela primeira ter CIM não determinada para *S. agalactiae*. Nas linhagens de *S.* do grupo *Viridans* (125, ZN e 216), ambas as moléculas apresentaram boa atividade obtendo CIM e CBM inferiores a 8 µg/mL. Para *S. pyogenes* ATCC 19615 detectou-se CIMs de 256 µg/mL e CBM 512 µg/mL para a APM-04, e CIM de 128 µg/mL e CBM de 256 µg/mL para a APM-05, resultando assim em atividade antibacteriana moderada.

A atividade da APM-04, contrariamente as outras moléculas testadas neste estudo - EEs, ALs e GLs - destacou-se frente a ordem Enterobacterales com atividade antibacteriana moderada com CIMs entre 512 a 1.024 µg/mL em linhagens de

referência e isolados clínicos de *E. coli* e *K. pneumoniae* de subespécies diferentes. Não foram determinadas CIMs das APMs para nenhuma das linhagens de *P. aeruginosa*, de *Enterococcus* spp. e nem para a ATCC 25922 de *E. coli* nas concentrações padronizadas do teste de atividade antibacteriana.

Tabela 23 – Avaliação da atividade antibacteriana das benzilidenemalononitrilas frente a linhagens de referência e isolados clínicos.

Linhagens bacterianas	CIM / ↓ CBM das benzilidenemalononitrilas	
	APM-04	APM-05
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	512 / ND	ND / ND
<i>Staphylococcus aureus</i> 01	256 / ↓512	ND / ND
<i>Staphylococcus aureus</i> 02	256 / ND	1.024 / ND
MRSA 216	128 / ↓512	ND / ND
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	256 / ↓1.024	ND / ND
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 360	64 / ↓64	64 / ↓128
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	256 / ↓512	128 ↓1.024
<i>Streptococcus agalactiae</i> (SVag)	ND / ND	1.024 / ND
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> 125	<8 / ↓16	<8 / ↓<8
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> ZN	<8 / ↓<8	<8 / ↓<8
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> 216	<8 / ↓<8	<8 / ↓<8
<i>Escherichia coli</i> ESBL+ (Abscesso)	512 / ND	ND / ND
<i>Escherichia coli</i> H2S+ ESBL+	1.024 / ND	ND / ND
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 13883	1.024 / ND	ND / ND
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC 700603 ESBL+	1.024 / ND	ND / ND
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> KPC+	1.024 / ND	ND / ND
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> ESBL+	1.024 / ND	ND / ND

APM-04 = 2,6-Diclorobenzilidenemalononitrila; **APM-05** = 2,4-Diclorobenzilidenemalononitrila; **ND** = CIM não determinada; **CIM** = Concentração Inibitória Mínima em microgramas por mililitro (µg/mL); (**<**) = menor que; (**↓**) = **CBM** = Concentração Bactericida Mínima (µg/mL); **ATCC** = *American Type Culture Collection*. Em fundo cinza estão as CIMs e/ou CBMs menores.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

As mesmas moléculas foram analisadas por Azad e colaboradores (2021); mostrando-se promissoras em diversas aplicações, destacando-se atividade anticancerígena, frente a linhagem MDA-MB-231 oriunda de adenocarcinoma de glândula mamária, e também atividade antibacteriana frente a *S. aureus* e *E. coli*. O grupo usou as siglas C1, para APM-04, e C2 para APM-05, com os respectivos nomes químicos, 2-(2,6-dichlorobenzylidene) malononitrile e 2-(2,4-dichlorobenzylidene) malononitrile.

- HIDRAZINA-1-CARBOTIOAMIDAS

Entre as quinze atividades com maior probabilidade de serem ativos (Pa) identificadas pelo PASS Online© para as hidrazina-1-carbotiamidas, foi observada atividade antibacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis* e frente a *M. leprae*. Na **Tabela 24** estão os resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das hidrazina-1-carbotioamidas, GL-02, GL-04, GL-07 e GL-08, frente a linhagens de referência e isolados clínicos.

Frente ao gênero *Staphylococcus* spp., apenas GL-02 inibiu moderadamente o crescimento de *S. saprophyticus* apresentando CIM = 256 µg/mL; nenhuma outra linhagem de *Staphylococcus* spp. foi inibida pelas GLs. A atividade antibacteriana das hidrazina-1-carbotioamidas destacou-se frente ao gênero *Streptococcus* spp., apresentando menores CIMs (<8 µg/mL) e CBMs (16 a 128 µg/mL) frente aos isolados clínicos de *S.* do grupo *Viridans*, destaca-se a atividade da GL-02 na linhagem *S.* do grupo *Viridans* 125. Frente a *S. pyogenes* ATCC 19615 obtiveram-se CIMs e CBMs semelhantes a determinadas para fenilacrilamidas, fenilacrilatos e benzilidenemalononitrilas. Não foram determinadas CIMs para nenhuma das linhagens de *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa*, *S. agalactiae* e *S. epidermidis* ATCC 12228.

É digno de nota a atividade da GL-08 frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 com CIM/CBM menor que 8 µg/mL e da GL-04 frente a *E. faecium* ATCC 6569 com CIM/CBM de 256 µg/mL.

Han e İnce (2022) desenvolveram novos derivados de tetracaína tiosemicarbazida e avaliaram sua atividade antimicrobiana. As moléculas sintetizadas apresentaram uma variação de atividade antimicrobiana, com valores de CIM entre 4 e 256 µg/mL. A molécula 2h, (2-[4-(butilamina) benzoil]-N-(3,5-bistrifluorometilfenil) hidrazina-1-carbotioamida), mostrou a melhor atividade, com CIM de 4 µg/mL para *S. aureus* e 8 µg/mL para *Candida albicans*. As moléculas 2e, (2-[4-(butilamina) benzoil]-N-(2-fluorofenil) hidrazina-1-carbotioamida), e 2f, (2-[4-(butilamina) benzoil]-N-(4-nitrofenil) hidrazina-1-carbotioamida), demonstraram atividade moderada contra *C. albicans* e *S. aureus*, com CIM de 16 µg/mL. As moléculas analisadas neste estudo não demonstraram atividade antibacteriana frente a *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli*

ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 apesar da complexidade das moléculas ser maior que as das hidrazina-1-carbotioamidas analisadas nesta pesquisa.

Tabela 24 – Avaliação da atividade antibacteriana das hidrazina-1-carbotioamidas frente a linhagens de referência e isolados clínicos.

Linhagens bacterianas	CIM / ↓ CBM das Hidrazina-1-carbotioamidas			
	GL-02	GL-04	GL-07	GL-08
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 360	256 / ND	ND / ND	ND / ND	ND / ND
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	512 / ND	512 / ND	256 / ND	1.024 / ND
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> 125	<8 / ↓16	<8 / ↓128	<8 / ↓128	<8 / ↓128
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> ZN	<8 / ↓128	32 / ↓32	128 / ↓128	128 / ↓128
<i>Streptococcus</i> do grupo <i>Viridans</i> 216	128 / ↓128	128 / ↓64	128 / ↓128	128 / ↓128
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	ND / ND	256 / ↓256	ND / ND	ND / ND
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	ND / ND	ND / ND	ND / ND	<8 / ↓<8

GL-02 = (2E)-2-[(4-clorofenil)metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-04**= (2E) -2-[(2,4-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-07**= (2E) -2-[(2,6-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **GL-08**= (2E) -2-[(2,3-diclorofenil) metilideno]hidrazina-1-carbotioamida; **ND** = CIM não determinada; **CIM** = Concentração Inibitória Mínima em microgramas por mililitro (µg/mL); (**<**) = menor que; (**↓**) = **CBM** = Concentração Bactericida Mínima (µg/mL); **ATCC** = *American Type Culture Collection*. Em fundo cinza estão as CIMs e/ou CBMs menores.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

5.3.2 Associação entre molécula teste e cloranfenicol - *Checkerboard*

A CIM determinada frente a *S. aureus* 02 para a molécula EE-01 isolada foi de 256 para µg/mL; após associação, com o antibiótico licenciado cloranfenicol, pelo método *checkerboard*; ao calcular o índice de concentração inibitória fracionada, observou-se que os valores obtidos foram 0,25 e 0,38, indicando que ocorreu sinergismo entre a molécula teste e o antibiótico licenciado. Para a molécula APM-05 a CIM foi de 1.024 µg/mL, após associação, os valores foram 0,38 e 0,50, resultando também em sinergismo.

No entanto, os valores da associação entre APM-04 e cloranfenicol frente as quatro linhagens de *S. aureus* testadas remeteram a interpretação de “indiferente”, ou seja, nem houve antagonismo e nem sinergismo. A única diferença estrutural entre APM-04 e APM-05 é a posição no anel de um dos átomos de cloro que parece ter influenciado o sinergismo entre APM-05 e cloranfenicol. Nesta última molécula, um dos átomos de nitrogênio fica mais distante do átomo de cloro na posição (*para*) do anel benzênico, modificando assim a distribuição eletrônica ao redor dos núcleos atômicos definindo melhor a distribuição hidrofílica e hidrofóbica quando comparada

a APM-04, que só tem átomos de cloro nas duas posições (*orto*) - **Figura 12** - p. 50 - mostra o Potencial de Lipofilicidade Molecular (MLP) e a Área de Superfície Polar (PSA) e **Figura 16** – p. 90 - mostra a distribuição eletrônica ao redor dos núcleos atômicos (*Dotted*), das APMs. Quando isolada, a atividade antibacteriana da APM-04 foi de amplo espectro de ação, sugerindo que a posição (*orto-orto*) deve contribuir para interação do grupo farmacofórico com o(s) alvo(s) bacteriano(s).

O sinergismo ocorre quando a combinação de dois ou mais antimicrobianos resulta em um efeito maior do que a soma dos efeitos individuais de cada substância. Em outras palavras, a ação combinada é mais potente do que o esperado com base nas concentrações individuais (GAUDERETO, 2018). Foi isso que aconteceu com as moléculas EE-01, uma fenilacrilamida, e APM-05, uma benzilidenemalononitrila, quando associadas ao cloranfenicol, os resultados estão na **Tabela 25**.

Tabela 25 – Resultados do *checkerboard* das moléculas EE-01, APM-04 e APM-05 com cloranfenicol.

Molécula	Bactéria / CIM	ICIF (1º exper.)	ICIF (2º exper.)	Interpretação
EE-01	<i>S.aureus</i> 02/256	0,25	0,38	Sinergismo
APM-04	<i>S.aureus</i> ATCC 29213/512	2,00	3,00	Indiferente
	<i>S.aureus</i> 01/256	1,00	1,50	Indiferente
	<i>S.aureus</i> 02/256	2,25	1,50	Indiferente
	MRSA 216/128	1,50	2,50	Indiferente
APM-05	<i>S.aureus</i> 02/1.024	0,38	0,50	Sinergismo

EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **APM-04** = 2,6-Diclorobenzilidenemalononitrila; **APM-05** = 2,4-Diclorobenzilidenemalononitrila; **CIM** = Concentração inibitória mínima da molécula sintética isolada em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$); **ICIF** = Índice de Concentração Inibitória Fracionada.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

O cloranfenicol se liga especificamente e reversivelmente ao sítio peptidil transferase no rRNA 23S – RNA ribossômico 23 Svedberg - da subunidade 50S do ribossomo bacteriano. A peptidil transferase é uma enzima essencial para a formação das ligações peptídicas entre os aminoácidos durante a síntese proteica, inibindo assim a elongação da cadeia polipeptídica (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO 2010).

Embora o efeito sinérgico possa ser um indicativo de mecanismos de ação diferentes, não é uma regra. Pode ocorrer mesmo quando os antibióticos têm mecanismos de ação semelhantes, por exemplo, ambos podem impedir a formação da parede celular bacteriana, mas de maneiras diferentes, resultando em um efeito

mais potente quando usados juntos. Havendo, pois, a possibilidade do mecanismo de ação da EE-01 e da APM-05 serem ou não semelhante ao do cloranfenicol.

5.3.3 Modulação do efeito do cloranfenicol e da tetraciclina pela molécula teste

A modulação refere-se à alteração da atividade farmacológica de um antimicrobiano quando combinado com outra molécula. A modulação não necessariamente resulta em um efeito maior do que a soma dos efeitos individuais, como no sinergismo (CRUZ *et al.*, 2016). Os resultados para as EEs e ALs estão na **Tabela 26**.

- FENILACRILAMIDAS

Ocorreu modulação da atividade do antibiótico licenciado tetraciclina com 256 µg/mL da molécula EE-01, que é a concentração sub-inibitória pré-determinada frente ao isolado clínico de *S. aureus* 02. A molécula EE-04 também foi analisada por ter demonstrado leve atividade bacteriostática a partir da concentração 32 µg/mL frente a mesma linhagem, curiosamente também houve modulação da tetraciclina com 32 µg/mL. As fenilacrilamidas não modularam a atividade do cloranfenicol, mesmo ocorrendo sinergismo deste antibiótico licenciado com a EE-01.

- BENZILIDENEMALONONITRILAS

A atividade do antibiótico tetraciclina foi modulada com 1.024 µg/mL da molécula APM-05, uma concentração sub-inibitória pré-determinada contra o isolado clínico de *S. aureus* 02. A molécula APM-04 também foi testada a 256 µg/mL contra a mesma linhagem, mostrando modulação da tetraciclina.

A molécula 2,6-Diclorobenzilidenemalononitrila, APM-04, também modulou a atividade da tetraciclina nas linhagens de *S. aureus* ATCC 29212, *S. aureus* 01 e *S. aureus* 02, no entanto não modulou no isolado MRSA 216. Isto sugere que o possível mecanismo de ação desta molécula pode ser semelhante à dos antibióticos β-lactâmicos, pois na resistência a meticilina tem alteração da PBP2a, uma proteína ligante de penicilina de baixa afinidade, codificada pelo gene *mecA*. A PBP2a tem

baixa afinidade pelos β -lactâmicos, como a meticilina, o que permite que a síntese da parede celular seja mantida, mesmo quando as quatro PBPs clássicas são inativadas por esses antibióticos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO 2010).

Tabela 26 – Detecção da modulação das fenilacrilamidas e fenilacrilatos com antibióticos licenciados.

Molécula	Bactéria / CIM	CLO(#)	CLO + CIM(#)	TET(#)	TET + CIM(#)
EE-01	<i>S.aureus</i> 02/256	26	26	25	30 ↑↑
EE-04	<i>S.aureus</i> 02/ND	26	26	25	28 ↑↑
APM-04	<i>S.aureus</i> ATCC 29213 /512	20	20	17	23 ↑↑
	<i>S.aureus</i> 01/256	22	22	22	27 ↑↑
	<i>S.aureus</i> 02/256	26	26	25	30 ↑↑
	MRSA 216/128	21	21	10	10
APM-05	<i>S.aureus</i> 01/ND	22	22	22	25 ↑↑
	<i>S.aureus</i> 02/1.024	26	26	25	30 ↑↑

EE-01 = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **EE-04** = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; **APM-04** = 2,6-Diclorobenzilidenemalononitrila; **APM-05** = 2,4-Diclorobenzilidenemalononitrila; **CIM** = Concentração Inibitória Mínima da molécula sintética isolada em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$); **ND** = CIM não determinada; **CLO**=cloranfenicol; **TET**=tetraciclina; **(#)** = Halo em milímetros; **(↑↑)** = aumentou o halo em combinação com 30 μg do antibiótico licenciado.

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

As tetraciclinas exercem sua atividade antimicrobiana através da inibição da síntese de proteínas bacterianas, ligando-se ao centro de decodificação, impedindo assim a ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A. Especificamente, a superfície hidrofílica conservada da tetraciclina interage com o sulco menor irregular da hélice 34 e o laço da hélice 31 do 16S (WARNER *et al.*, 2022), componente da subunidade 30S do ribossomo procariótico.

Tanto as fenilacrilamidas quanto as benzilidenemalononitrilas modularam a atividade da tetraciclina, antibiótico que age na subunidade ribossomal 30 S, nas linhagens de *S. aureus* sensíveis a meticilina; e nenhuma das moléculas modularam a atividade do cloranfenicol, antibiótico que age na subunidade ribossomal 50 S.

A formação da ligação peptídica no ribossomo ocorre em um sítio ativo composto de RNA devido ação da enzima peptidil transferase ribossômica, a subunidade 50S sozinha possui todo o potencial de catalisar a formação de ligações peptídicas (WOHLGEMUTH; BERINGER; RODNINA, 2006). Essa informação é conhecida devido ao progresso das abordagens estruturais, bioquímicas e computacionais que forneceu detalhes do mecanismo catalítico da reação. O

ribossomo acelera a formação da ligação peptídica diminuindo a entropia de ativação da reação devido ao posicionamento dos dois substratos, ordenando a água no sítio ativo e fornecendo uma rede eletrostática que estabiliza os intermediários da reação. A transferência de prótons durante a reação parece ser promovida por um mecanismo combinado de transporte de prótons que envolve grupos hidroxila ribose no substrato de RNA transportador - tRNA (BERINGER; RODNINA, 2007).

As bombas de efluxo são partes integrantes da membrana plasmática bacteriana e são responsáveis por muitos casos de resistência a antibióticos. Os moduladores da resistência aos medicamentos são considerados as novas terapias antibacterianas mais adequadas. A molécula EE-01 apresentou efeito sinérgico no teste de *checkerboard* com o cloranfenicol, modulou o efeito do antibiótico tetraciclina, adicionalmente não produziu hemólise. A molécula APM-05 também obteve os mesmos resultados. Sugerindo o direcionamento da investigação do mecanismo de ação da EE-01 e da APM-05 como inibidor de bomba de efluxo. Estas características o classificam como potencial candidato a adjuvante de antibióticos licenciados.

NorA pertence à superfamília de facilitadores principais MFS, do inglês "*Major Facilitator Superfamily*"; sendo a primeira bomba efluxo a ser codificada cromossomicamente em *S. aureus*; ela expulsa antibióticos fluoroquinolônicos hidrofílicos, como norfloxacino e ciprofloxacino, que são substratos altamente eficazes. Adicionalmente pode expulsar cloranfenicol. É superexpressa em 43% das linhagens, especialmente MRSA. Possui 12 segmentos transmembranares TMS, do inglês "*Transmembrane Segment*" (DASHTBANI-ROOZBEHANI; BROWN, 2021). Ao analisar a estrutura da bomba de efluxo NorA em diferentes estados de protonação, adição ou remoção de prótons, de dois resíduos ácidos essenciais, Glu222 e Asp307, usando microscopia crioeletrônica, Li e colaboradores (2024) descobriram que quando os resíduos ganham prótons (protonação), a conformação da bomba se estabiliza em uma posição "*inward-occluded*" (fechada para dentro), onde formam ligações de hidrogênio com uma hélice no domínio N-terminal que bloqueia o local de ligação do substrato (ciprofloxacino); e quando perdem prótons (desprotonação), as interações entre os domínios se desfazem, abrindo o bolso para a entrada do antibiótico. Ou seja, os resíduos Glu222 e Asp307 evitam que prótons e antibióticos se liguem ao mesmo

tempo, garantindo que a bomba funcione corretamente, conferindo proteção eficiente a sobrevivência da bactéria e determinando a resistência as fluoroquinolonas.

As moléculas benzilidenemalononitrilas, APM-04 e APM-05, mostraram-se promissoras como inibidores de PBP4, isso poderia acontecer reduzindo a expressão de PBP4 ou afetando sua função. *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) é uma preocupação global de saúde. Historicamente, a resistência ao MRSA tem sido atribuída à aquisição do gene *mecA* (ou *mecC*), que codifica a proteína alternativa de ligação à penicilina, PBP2a, com baixa afinidade para β -lactâmicos. No entanto, estudos recentes destacaram que a proteína de ligação à penicilina 4 (PBP4) também desempenha um papel crítico na resistência à meticilina do *S. aureus*, especialmente entre as linhagens de MRSA adquiridas na comunidade. A PBP4, codificada pelo gene *pbp4*, tem sido considerada um alvo terapêutico intrigante, pois seus inibidores podem restaurar a suscetibilidade do MRSA aos β -lactâmicos. Também é conhecido que a base molecular para o papel da proteína ligadora de penicilina 4 (PBP4) do *S. aureus* na resistência antimicrobiana é destacada pelo fato de que a PBP4 possui atividade de β -lactamase hidrolisando antibióticos, como ampicilina e cefotaxima (NAVRATNA *et al.*, 2010). Além disso, descobriu-se que a PBP4 é essencial para a invasão e colonização de osteócitos lacunocanaliculares de *S. aureus* (OLCN) no osso, proporcionando um nicho para infecções ósseas recorrentes (YOUNG *et al.*, 2022).

A α -hemolisina (AHL) é uma toxina importante na patogênese do *S. aureus*, e sua inibição pode ser uma estratégia eficaz para tratar infecções causadas por essa bactéria. Derivados de β -ciclodextrina, anticorpos monoclonais e medicamentos reposicionados, como a ivacaftor, mostram potencial na inibição da AHL em bicamadas lipídicas planares, representando avanços significativos no tratamento de infecções estafilocócicas. Além disso, o tamoxifeno (TEIXEIRA *et al.*, 2021) e a furosemida, por análise de ancoragem molecular, teoricamente bloqueiam as correntes iônicas na constrição do canal causado pela AHL (TEIXEIRA *et al.*, 2022).

O software Molinspiration© previu atividade farmacológica teórica moderada como inibidor enzimático para as moléculas da classe das fenilacrilamidas, EE-01 (-0,46) e EE-04 (-0,54). Já a previsão teórica para as benzilidenemalononitrilas foi de uma possível atividade moderada como moduladores de canais iônicos, (-0,62) para APM-04 e (-0,54) para APM-05.

5.3.4 Docking molecular

Foi avaliado a interação das fenilacrilamidas, EE-01 e EE-04, e das benzilidenemalononitrilas, APM-04 e APM-05, com três alvos de ligação proteicos do *S. aureus* usando *docking* molecular: **(a)** Proteína ligadora de penicilina 4 (PBP4), **(b)** a bomba de efluxo NorA e **(c)** α -hemolisina (AHL); determinando-se afinidade de ligação, em quilocalorias por mol, entre as moléculas e os alvos. Os resultados podem ser conferidos na **Tabela 27**.

As fenilacrilamidas e as benzilidenemalononitrilas teoricamente se ligaram à PBP4 com afinidade de ligação que variou entre $-6,591 \pm 0,12$ kcal/mol (EE-01) a $-6,909 \pm 0,14$ kcal/mol (APM-04), resultados bem próximos, mas não superiores a afinidade de ligação da penicilina ($-7,307 \pm 0,2$ kcal/mol); enquanto que a ligação a NorA variou entre $-7,354 \pm 0,04$ kcal/mol (EE-01) a $-8,241 \pm 0,09$ kcal/mol (APM-05), sendo maiores do que a afinidade de ligação ao ciprofloxacino ($-6,641 \pm 0,13$ kcal/mol). Quanto a afinidade de ligação a α -hemolisina a variação foi de $-6,183 \pm 0,1$ kcal/mol (APM-04) a $-6,724 \pm 0,2$ kcal/mol (EE-04), mostrando semelhança com a molécula ligante penicilina (PEN) que teve afinidade de ligação $-6,659 \pm 0,2$ kcal/mol. Os resultados indicam estratégias inovadoras para superar a resistência bacteriana, ao combinar as moléculas - EEs e APMs - com antibióticos licenciados, potencializando sua eficácia ou restaurando a atividade contra bactérias resistentes.

Tabela 27 – Resultados da ancoragem molecular.

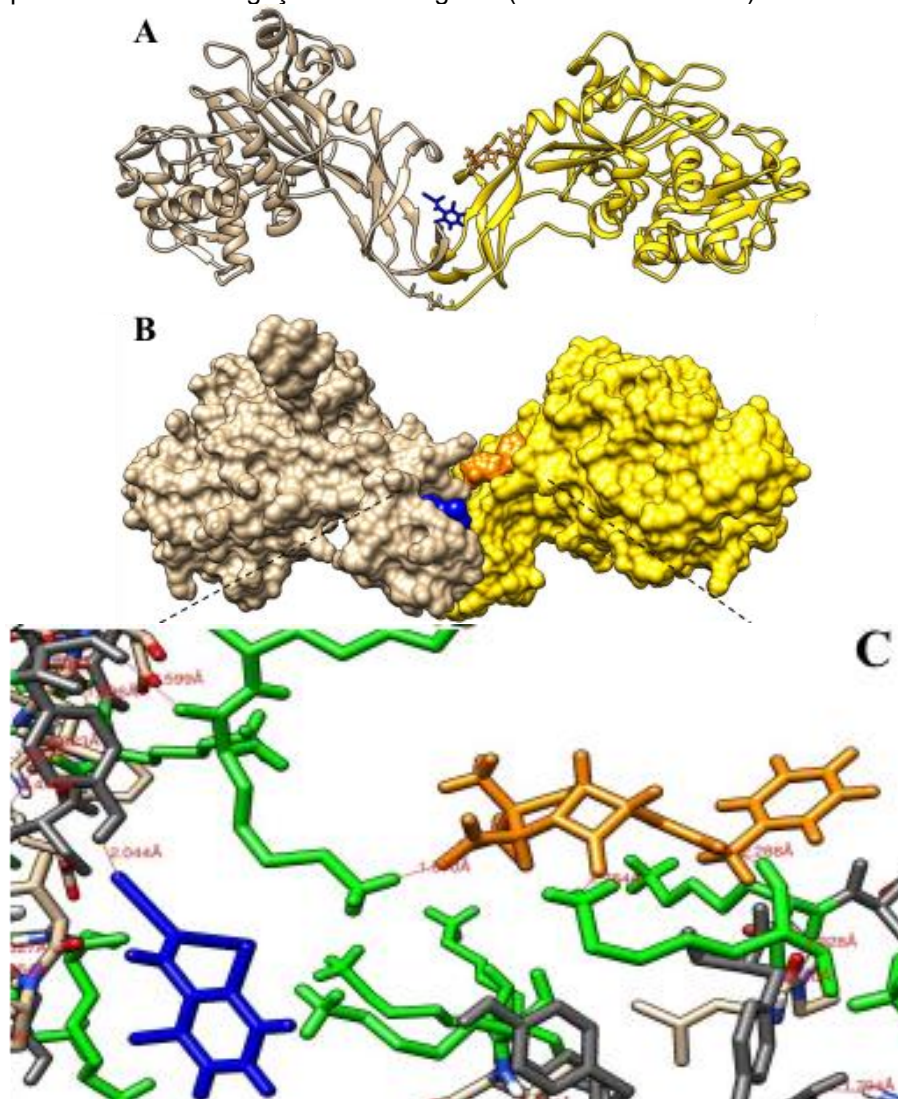
Ligantes	Afinidade entre ligante e alvo (Kcal/mol)		
	PBP4	NorA	α HL
EE-01	$-6,591 \pm 0,12$	$-7,354 \pm 0,04^b$	$-6,25 \pm 0,005$
EE-04	$-6,764 \pm 0,08$	$-7,525 \pm 0,07^b$	$-6,724 \pm 0,2$
APM-04	$-6,909 \pm 0,14$	$-7,5 \pm 0,14^b$	$-6,183 \pm 0,1$
APM-05	$-6,844 \pm 0,08$	$-8,241 \pm 0,09^b$	$-6,336 \pm 0,08$
Ciprofloxacino	-	$-6,641 \pm 0,13$	-
Penicilina	$-7,307 \pm 0,2^a$	-	$-6,659 \pm 0,2$

Dados expressos como média \pm e.p.m.; ^ap < 0,05 (ANOVA one-way: ligante vs. molécula teste); ^bp < 0,001 (ANOVA one-way: ciprofloxacino vs. ligantes); **EE-01** = 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilamida; **EE-04** = 2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilamida; **APM-04** = 2,6-Diclorobenzilidenemalononitrila; **APM-05** = 2,4-Diclorobenzilidenemalononitrila; Kcal/mol = quilocalorias por mol; **PBP4** = *penicillin-binding protein 4* (transpeptidase classe B); **NorA** = efflux pump (bomba de efluxo); **α -HL** = α -hemolysin (toxina estafilocócica).

Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Na análise de *docking* molecular com o alvo PBP4, as previsões indicaram que as moléculas APM-04 e penicilina (PEN) se posicionaram em regiões distintas entre as folhas β que conectam as cadeias A e B da proteína (**Figura 18.A-B**). APM-04 formou uma ligação de hidrogênio com o resíduo TYR338 (tirosina) da cadeia A, com comprimento de 2,044 Å, envolvendo o nitrogênio (grupo receptor de próton) da molécula e o grupo hidroxila do anel benzênico da TYR, possivelmente influenciando sua atividade contra *S. aureus*. Já a penicilina apresentou uma ligação de hidrogênio com o resíduo LYS335 (lisina) da cadeia A e duas com o resíduo LYS264 da cadeia B, com comprimentos de 1,570 Å, 2,288 Å e 1,764 Å, respectivamente (**Figura C**).

Figura 18 - Imagens espaciais 3D da interação entre APM-04 (azul), penicilina (laranja) e o alvo PBP4 (cadeia A: bronze; cadeia B: dourado). A: Estrutura α -hélices e β -folha de PBP4 e molecular dos ligantes. B: Estrutura hidrofóbica de PBP4 e dos ligantes; C: Resíduos de aminoácidos TYR (cinza) e LYS (verde) que estabeleceram ligações de hidrogênio (linhas em vermelho) com APM-04 e penicilina.



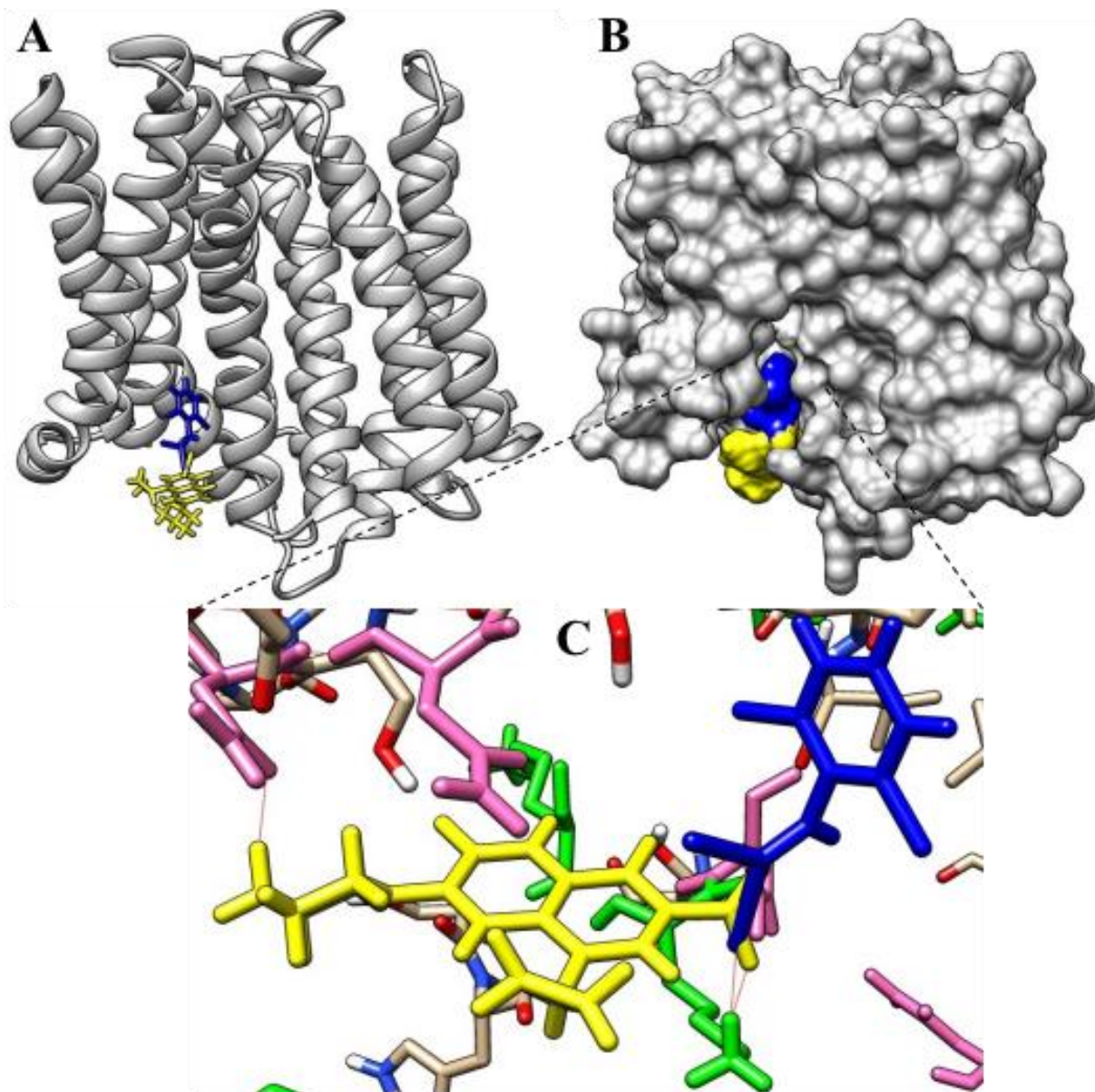
Fonte: Elaborada pela autora, 2024.

Com o alvo NorA, as previsões teóricas indicaram que os ligantes APM-04 e ciprofloxacino (CIP) se posicionaram em uma região semelhante, localizada entre duas α -hélices próximas das doze que compõem a bomba de efluxo, voltada para a porção intracelular da bomba (**Figura 19.A-B**). As interações teóricas que estabilizaram este posicionamento variaram de interações hidrofóbicas a ligações de hidrogênio mais fortes, com ambas as moléculas sendo previstas para se ligar ao resíduo LYS127 com comprimentos de 1,924 Å para APM-04 e 1,547 Å para CIP (**Figura 19.C**). Isso indica que APM-04 e ciprofloxacino compartilham pelo menos um sítio de ligação comum. Além disso, foi previsto que ciprofloxacino estabelece outra ligação de hidrogênio com o resíduo ASN307 (asparagina), com 1,889 Å de distância.

Ao se ligar na bomba de efluxo NorA, o ciprofloxacino interfere no mecanismo de expulsão da molécula, reduzindo a capacidade da célula bacteriana de eliminar o antibiótico; sendo, portanto, um inibidor de bomba de efluxo. Isso resulta em uma maior concentração intracelular do ciprofloxacino, permitindo que ele exerça sua ação bactericida ao inibir a DNA girase e a topoisomerase IV, enzimas essenciais para a replicação e transcrição do DNA bacteriano. Dessa forma, o ciprofloxacino não só age diretamente contra o DNA bacteriano, mas também neutraliza a resistência mediada pela NorA, aumentando sua eficácia (ZIMMERMANN *et al.*, 2019). A molécula APM-04 tem potencial para inibir bomba de efluxo, sugerindo que os dois grupos receptores de prótons poderiam desprotonar a bomba de efluxo NorA.

Estudos recentes indicam que a inibição da bomba de efluxo NorA pelo ciprofloxacino pode ser evidenciada pela redução da CIM em linhagens que superexpressam NorA, como na linhagem SA1199B. Além disso, há evidências de sinergia quando o ciprofloxacino é administrado em combinação com inibidores específicos da NorA, como o nilotinibe, amplificando a inibição e aumentando a eficácia terapêutica (ZIMMERMANN *et al.*, 2019). Inibidores da NorA, previamente identificados, também demonstraram reduzir significativamente a formação de biofilme em *S. aureus* (KAATZ; SEO, 1995). Considerando que a APM-04 se liga ao resíduo LYS127, um sítio também utilizado pelo ciprofloxacino, essa benzilidenemalononitrila poderia potencializar o efeito das fluoroquinolonas em associação, inibir o desenvolvimento de biofilmes e da bomba de efluxo NorA, além de aumentar sua concentração intracelular.

Figura 19 - Imagens espaciais 3D da interação entre APM-04 (azul), ciprofloxacino (amarelo) e o alvo NorA (cinza). A: Estrutura α -hélices de NorA e molecular dos ligantes; B: Estrutura hidrofóbica de NorA e dos ligantes; C: Resíduos de aminoácidos ASN (rosa) e LYS (verde) que estabeleceram ligações de hidrogênio (linhas em vermelho) com APM-04 e ciprofloxacino.

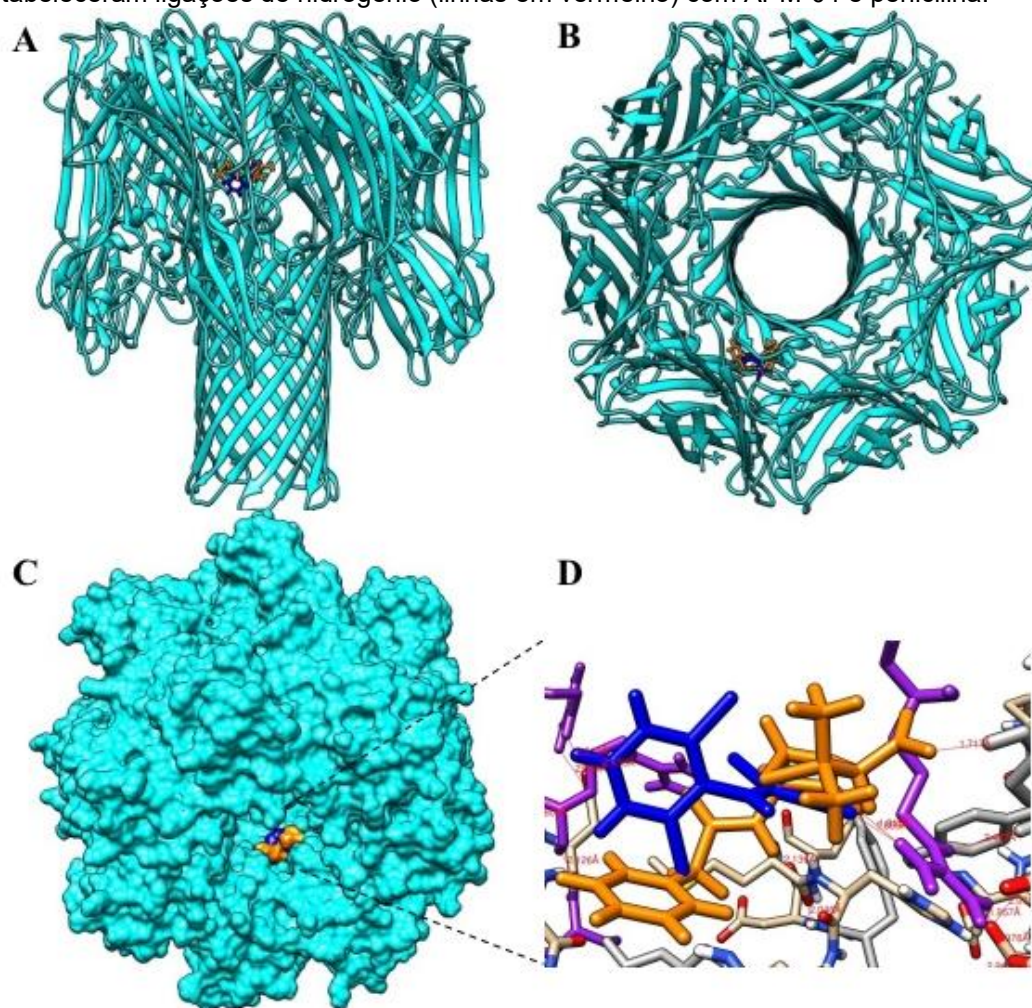


Fonte: NANES-LIMA, 2024.

Ainda nos estudos de interação teórica, as previsões de *docking* molecular indicaram que APM-04 e PEN apresentaram posicionamentos semelhantes, com sobreposição observada entre esses dois ligantes e a α -hemolisina (AHL) (**Figura 20.A-B**). Observou-se que os ligantes não se posicionaram sobre o poro do canal, mas em uma região próxima entre as folhas β (**Figura 20.B**). A sobreposição entre

APM-04 e PEN foi confirmada pelas previsões de ligações de hidrogênio de ambos com o resíduo ARG104 (arginina), com distâncias de 1,869 Å e 1,815 Å, respectivamente, indicando o mesmo sítio de ligação na AHL (**Figura 20.C**). Também foi previsto que a penicilina forma uma ligação de hidrogênio adicional com o resíduo TYR102 (tirosina), com comprimento de 1,717 Å. Devido à capacidade da α -HL de promover a formação de canais iônicos e causar lise celular, torna-se urgente desenvolver novas estratégias de tratamento. Com base nas previsões de *docking* molecular, presume-se que a APM-04 inibe a formação do canal transmembranar pela α -HL, o qual é ligeiramente seletivo para cátions, impedindo sua ação citotóxica e protegendo as hemácias do hospedeiro.

Figura 20 (A-D) - Imagens espaciais 3D da interação entre APM-04 (azul), penicilina (laranja) e o alvo AHL (ciano). Estrutura β -folha da AHL (A, visão lateral; B, visão superior) e molecular dos ligantes. C: Estrutura hidrofóbica da AHL e dos ligantes; D: Resíduos de aminoácidos ARG (roxo) e TYR (cinza) que estabeleceram ligações de hidrogênio (linhas em vermelho) com APM-04 e penicilina.



Fonte: NANES-LIMA, 2024.

A α -HL do *S. aureus* é uma toxina de alta virulência que forma poros na membrana celular de diversas células, incluindo hemácias, monócitos, linfócitos e células endoteliais. Esses poros funcionam como canais iônicos, permitindo a passagem de íons e outras pequenas moléculas, o que resulta na lise osmótica das células afetadas (RASHIDIEH *et al.*, 2015). O poro (canal proteico heptamérico) é formado pela oligomerização de sete protômeros de α -HL na membrana celular. O protômero da α -HL se liga ao receptor ADAM10 da célula hospedeira; o estabelecimento do poro na membrana celular permite a saída de moléculas importantes como o ATP, causa o efluxo de íons K⁺ e o influxo de íons Ca²⁺, ativando o inflamassoma NLRP3 e a caspase-1, levando à lise celular (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018).

A comunidade científica busca incessantemente por novos antimicrobianos para tratar infecções por bactérias multirresistentes, focando na descoberta de novos alvos e potencialização de moléculas conhecidas. Com avanços na modificação molecular, essa segunda opção é viável e promissora. Uma estratégia envolve a escolha de um alvo molecular, validação, identificação de um composto-protótipo e sua otimização até aprovação clínica (DIAS; CORREA, 2001). Outra estratégia é a FBDD, que é uma estratégia para descobrir novas estruturas ativas, usando fragmentos privilegiados no *design* de medicamentos. Essas estruturas facilitam a interação com biomacromoléculas e são distintas dos ligantes endógenos. *Fragment-based drug design* usa fragmentos privilegiados para desenhar novas estruturas, essas estruturas, presentes em vários fármacos protótipos, fornecem pontos ligantes para vários biorreceptores, cuja seletividade pode ser modulada (DUARTE *et al.* 2007). Dentre esses fragmentos privilegiados temos as moléculas sintéticas, tais como as fenilacrilamidas, os fenilacrilatos, as benzilidenemalononitrilas e as hidrazina-1-carbotioamidas, que apesar de suas reatividades serem pouco discutidas na literatura frente a alvos biológicos, podem atuar como excelentes ligantes por apresentarem um perfil de aceptores/doadores de Michael, principalmente em biomoléculas nucleofílicas/eletrofílicas (EKICI *et al.*, 2006), podendo interagir com proteínas de caráter opostos, incluindo quaisquer um dos alvos proteicos de resistência bacterianos, tais como transpeptidases, bombas de efluxo e β -lactamases.

São características das quatro classes de moléculas analisadas neste trabalho científico, serem aceptores/doadores de Michael por participarem de uma reação de adição conjugada conhecida como adição de Michael. Essa reação envolve a adição nucleofílica de um nucleófilo a um composto carbonílico α , β -insaturado (ou seja, contendo uma ligação dupla entre os carbonos α e β) (MATTOS; MARZORATI, 1999). Essa característica pode ser a responsável, de alguma maneira, por algumas das atividades citotóxicas e antibacterianas detectadas nas análises *in vitro* para as moléculas analisadas nesta pesquisa.

Entre as moléculas estudadas neste trabalho, duas classes (EEs e APMs) foram selecionadas para avaliação da modulação com o antibiótico tetraciclina frente a linhagens de *S. aureus*. Considerando as dificuldades no tratamento de infecções causadas por linhagens MRSA e os alvos moleculares revisados disponíveis no *Protein Data Bank* para *S. aureus*, foi realizado o *docking* molecular com a APM-04.

Diante do cenário atual, é imprescindível adotar abordagens que promovam o uso racional de antibióticos. Isso implica na prescrição criteriosa e adequada, limitando seu uso apenas às situações necessárias. A escolha dos agentes apropriados deve ser baseada em testes de sensibilidade. Além disso, a implementação de medidas preventivas contra infecções é fundamental para minimizar a necessidade da antibioticoterapia. Infecções causadas por bactérias multirresistentes são uma das principais ameaças à saúde global. Estima-se que, se não forem tomadas medidas eficazes, essas infecções poderão causar até 10 milhões de mortes anuais até 2050. Portanto, é crucial investir em pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, bem como em estratégias de prevenção e controle de infecções. Com a redução das opções terapêuticas, infecções que hoje têm tratamento simples podem se tornar mais graves no futuro, à medida que os recursos para as combater diminuam.

Os resultados obtidos incentivam que estudos *in vitro* para investigar outras atividades biológicas e toxicológicas das fenilacrilamidas, fenilacrilatos, benzilidenemalononitrilas e hidrazina-1-carbotioamidas sejam realizados visando contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos. É importante ressaltar que muitas moléculas promissoras estudadas em laboratório podem levar anos para serem aprovadas para uso clínico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

➤ Contextualização do problema de Resistência Bacteriana

- A resistência bacteriana representa uma ameaça crescente à saúde pública mundial e requer ação de todos os setores do governo e da sociedade. A busca por soluções inovadoras é essencial, considerando que, no Brasil, em 2019, foram contabilizadas aproximadamente 90 mortes por dia diretamente associadas a infecções causadas por bactérias multirresistentes.

➤ Objetivo da pesquisa

- Avaliar a atividade antibacteriana e os efeitos toxicológicos de moléculas sintéticas.

➤ Importância das moléculas sintéticas estudadas

- As fenilacrilamidas (EEs), fenilacrilatos (ALs), benzilidenemalononitrilas (APMs) e hidrazina-1-carbotioamidas (GLs) são moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, atuando como aceptores de Michael.

➤ Pontos relevantes na análise *in silico*

- Molinspiration©: todas as moléculas apresentaram ótima biodisponibilidade oral teórica, variando de 85,92% (EEs) a 92,58% (APMs).

- admetSAR©: as moléculas analisadas não são teoricamente cancerígenas, nem teratogênicas, nem mutagênicas e nem carcinogênicas de classe III, apresentando DL₅₀ em ratos entre 585,83 mg/kg (EEs) e 857,20 mg/kg (GLs dicloradas). Toxicidade oral aguda teórica: Categoria III (EEs), categoria II (ALs e APMs), categoria I (GLs).

➤ Pontos relevantes na avaliação dos efeitos toxicológicos

- EE-04 e AL-09 mostraram Concentração Lítica Mínima (CLM) de 400 µg/mL para tipos sanguíneos específicos. Todas as GLs apresentaram CLM de 200 µg/mL.

- EE-01, AL-10 e APMs não exibiram atividade hemolítica.

- Benzilidenemalononitrilas: As APMs reduziram em cerca de 30% a oxidação produzida pela fenilhidrazina.

➤ Pontos relevantes na Atividade Antibacteriana

- Todos os grupos de moléculas demonstraram atividade frente aos isolados clínicos de *Streptococcus* do Grupo *Viridans* e *Staphylococcus saprophyticus*.
- APM-04: atividade frente a linhagem de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.
- GL-04: bactericida, CIM e CBM de 256 µg/mL em *Enterococcus faecium* ATCC 6569.
- GL-08: CIM e CBM inferior a 8 µg/mL em *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- *Checkerboard* com Cloranfenicol: EE-01 e APM-05 demonstraram sinergismo quando analisadas frente ao isolado clínico *Staphylococcus aureus* 02 de foliculite.
- Modulação da atividade da tetraciclina em linhagens de *S. aureus*: EE-01, EE-04, APM-04 e APM-05 modularam a tetraciclina, exceto APM-04 na linhagem MRSA 216.

➤ Molécula destaque: APM-04 (2,6-diclorobenzilidenemalononitrila)

- Redução de 30% na oxidação induzida pela fenilhidrazina.
- Amplo espectro: Enterobacterales, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.
- Modulou a tetraciclina: Em linhagens de *S. aureus* sensíveis a meticilina (MSSA).
- Interação com proteínas bacterianas: Pode atuar como aceptores de Michael adicionando um nucleófilo a um composto carbonil insaturado.
- *Docking* Molecular: Boa afinidade de ligação teórica a PBP4 ($-6,909 \pm 0,14$ kcal/mol) e a α -HL ($-6,183 \pm 0,1$ kcal/mol) quando comparadas com penicilina. Ótima afinidade de ligação teórica a NorA ($-7,5 \pm 0,14$ kcal/mol) quando comparada ao ciprofloxacino.
- APM-04 faz uma ligação de hidrogênio com PBP4 podendo inibir a sua atividade.
- APM-04 tem 2 grupos receptores de prótons podendo desprotonar NorA.
- APM-04 é molécula candidata a inibidora da ação da α -hemolisina.

➤ Contribuições para o Desenvolvimento Tecnológico em Medicamentos

- O estudo sugere que a combinação de APM-04 com antibióticos licenciados pode potencializar a eficácia do fármaco contribuindo para o desenvolvimento de medicamentos inovadores.

➤ Impacto na Saúde Pública e Ciência Farmacêutica

- A pesquisa contribui para o enfrentamento da resistência bacteriana e pode inspirar futuras investigações para ampliar o arsenal do tratamento de infecções bacterianas.

REFERÊNCIAS

- ABCMED, 2023. **Anemia hemolítica induzida por drogas**. Disponível em: <<https://www.abc.med.br/p/sinais.-sintomas-e-doencas/1460700/anemia-hemolitica-induzida-por-drogas.htm>>. Acesso em: 7 jun. 2024.
- ADLER, S.; BASKETTER, D.; CRETON, S.; PELKONEN, O.; VAN BENTHEM, J.; ZUANG, V.; ANDERSEN, K. E. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects—2010. **Arch. Toxicol.**, v. 85, n. 5, p. 367-485, 2011.
- AFZAL, S.; AL-RASHILDA, M.; HAMEED, A.; PELLETIER, J.; SÉVIGNY, J.; LOBAL, J. Functionalized Oxindolin Hydrazine Carbothioamide Derivatives as Highly Potent Inhibitors of Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases. **Front. Pharmacol.**, v. 11, p. 1-18, 2020.
- AGUILAR, G. R. *et al.* The burden of antimicrobial resistance in the Americas in 2019: a cross-country systematic analysis. **Lancet Reg. Health Am.**, v. 25, p. 100561, 2023.
- AKINS, R. L.; KATZ, B. D.; MONAHAN, C.; ALEXANDER, D. Characterization of high-level daptomycin resistance in *Viridans* group *Streptococci* developed upon in vitro exposure to daptomycin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 59, n. 4, p. 2102–2112, 2015.
- ALEKSHUN, N. M.; LEVY, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell.**, v. 128, p. 1037-1050, 2007.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quím. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANDRADE, L. N.; CURIAO, T.; FERREIRA, J. C.; LONGO, J. M.; CLÍMACO, E. C.; MARTINEZ, R.; BELLÍSSIMO-RODRIGUES, F.; BASILE-FILHO, A.; EVARISTO, M. A.; PELOSO, P. F. D.; RIBEIRO, V. B.; BARTH, A. L.; PAULA, M. C.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R.; DARINI, A. L. C.; COQUE, T. M. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 60, n. 1, p. 3084-3090, 2006.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada - **RDC nº 55, de 11 de dezembro de 2015**. Dispõe sobre as Boas Práticas em tecidos humanos para uso terapêutico. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 dez. 2015.

AQUIB, MD; SCHAEFER, S.; GMEDHIN, H.; CORRIGAN, N.; BOBRIN, V.A.; BOYER, C. Shape matters: Effect of amphiphilic polymer topology on antibacterial activity and hemocompatibility. **Eur. Polym. J.**, v.205, p.112698, 2024.

ARAÚJO, C.R.M.; LEITE-FILHO, C.A.; SANTOS, V.L.A.; MAIA, G.L.A.; GONSALVES, A.A. Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual SciFinder®. **Quím. Nova**, v. 38, n. 6, 2015.

ARBOS, K.A.; CLARO, L.M.; BORGES, L.; SANTOS, C.A.; WEFFORT-SANTOS, A.M. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutr. Res.**, v.28, n.7, p.457-63, 2008.

ARRUDA, I.E.; MACEDO, B.V.S.; MACEDO, J.C.; CAMPOS, W.R.A.; ARAÚJO, C.R.M.; GONSALVES, A.A. Preparação de hidrazona e N-acilidrazona usando fármacos comerciais como reagentes: aulas práticas de síntese de compostos bioativos. **Quím. Nova**, v.43, n.5, p.642-648, 2020.

AZAD, I.; KHAN, T.; AHMAD, R.; KAMAL, A.; KHAN, A. R.; NASIBULLAH, M. A Simplistic Approach for Preparation of Alkylidenemalononitrile Derivatives: Characterization, *In silico* Studies, Quantum Chemical Evaluation, Molecular Docking, and *In vitro* Biological Activity Evaluation. **J. Mol. Struct**, v.1228, 2021.

BAIRWA, R.; KAKWANI, M.; TAWARI, N.R.; LALCHANDANI, J.; RAY, M.K.; RAJAN, M.G.; DEGANI, M.S. Novel molecular hybrids of cinnamic acids and guanylhyazones as potential antitubercular agents. **Bioorg Med Chem Lett**. v.20, n.5, p.1623-5, 2010.

BALASUBRAMANIAN, R.; VAN BOECKEL, T.P.; CARMELI, Y.; COSGROVE, S.; LAXMINARAYAN, R. Global incidence in hospital-associated infections resistant to antibiotics: an analysis of point prevalence surveys from 99 countries. **PLoS Med.**, v.20, n.6, e1004178, 2023.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; ALFENAS, R.C.G.; ALFENAS, R.C.G.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2014.

BATISTA, M. T. A.; RODRIGUES, H. G.; FONSECA, L. C.; BONETTI, A. M.; PENHA-SILVA, N.; NERES, A. C.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Estudo dos efeitos do pesticida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos. **Rev. Eletr. Farm.**, v. 3, p. 22-24, 2007.

BEGUM, Z.; ULLAH, S.; AKRAM, M.; UZAIR, M.; ULLAH, F.; AHSANULLAH; PELLETIER, J.; SÉVIGNY, J.; IQBAL, J.; HASSAN, A. Identification of

thienopyrimidine glycinates as selective inhibitors for h-NTPDases. **Bioorg Chem**, v.129, p.106196, 2022.

BERINGER, M.; RODNINA, M.V. The Ribosomal Peptidyl Transferase. **Molecular Cell.**, v.26, n. 3, Page, p.311-321, 2007.

BOKOSI, F.R.B.; BETECK, R.M.; LAMING, D.; HOPPE, H.C.; TSHIWAWA, T.; KHANYE, S.D. Synthesis of 2-(N-cyclicamino)quinoline combined with methyl (E)-3-(2/3/4-aminophenyl)acrylates as potential antiparasitic agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 354, n.7, p. e2000331, 2021.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília: ANVISA, 2013.

BrCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, 2023.

CAMARGO, T.M.; ALVES, M.I.F.; OLIVEIRA, S.J.; SHITARA, E.S.; OSHIMA-FRANCO, Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MHb). **RBAC**, v.39, n.2, p.95-98, 2007.

CARVALHO, A.C.C. **A presença de fármacos e cafeína em água superficial e destinada ao consumo humano**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

CARVALHO, E. B.; BORGES, É. L.; CARLOS, L. M. B.; SILVA, M. A. M.; MAGALHÃES, S. M. M.; GOMES, F. V. B. A. F.; CARVALHO, M. J. C.; QUIXADÁ, A. T. S.; PITOMBEIRA, M. H. S. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, p. 149-152, 2007.

CASSINI, A.; HÖGBERG, L.D.; PLACHOURAS, D.; QUATTROCCHI, A.; HOXHA, A.; SIMONSEN, G.S.; COLOMB-COTINAT, M.; KRETZSCHMAR, M.E.; DEVLEESSCHAUWER, B.; CECCHINI, M.; OUAKRIM, D.A.; OLIVEIRA, T.C.; STRUELENS, M.J.; SUETENS, C.; MONNET, D.L. Burden of AMR Collaborative Group. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **Lancet Infect. Dis.**, v.19, p. 56–66, 2019.

CHEN, S.-Q.; XU, L.; HE, C.; LI, P.-Y.; LU, X.-X.; LI, J.-M.; LI, H.-J.; HE, W.-D.; YANG, L. Long-subchain hyperbranched poly(aminoethyl acrylate): A potent antimicrobial polymer with low hemolytic toxicity. **J. Polym. Sci.: Part A, Polymer Chemistry**, Hoboken, v. 54, n. 21, p. 3462-3469, 2016.

CHENG, F.; LI, W.; ZHOU, Y.; SHEN, J.; WU, Z.; LIU, G.; LEE, P.W.; TANG, Y. AdmetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. **J Chem Inf Model**, v. 52, n. 11, p.3099-3105, 2012.

CHENG, F.; SHEN, J.; YU, Y.; LI, W.; LIU, G.; LEE, P.W.; TANG, Y. *In silico* prediction of *Tetrahymena pyriformis* toxicity for diverse industrial chemicals with substructure pattern recognition and machine learning methods. **Chemosphere**, v.82, n. 11, p. 1636-1643, 2011.

CHU, Q., CHEN, W., JIA, R., YE, X., LI, Y., LIU, Y., JIANG, Y., ZHENG, X. *Tetrastigma hemsleyanum* leaves extract against acrylamide-induced toxicity in HepG2 cells and *Caenorhabditis elegans*. **J Hazard Mater**. v. 393, p.1-12, 2020.

CLARO, L.G.; LEONART, M.S.S.; COMAR, S.R.; NASCIMENTO, A.J. Effect of vitamins C and E on oxidative processes in human erythrocytes. **Cell Biochem. Funct.**, v. 24, p. 531–535, 2006.

CLATWORTHY, A.E.; PIERSON, E.; HUNG, D.T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. **Nat. Chem. Biol.**, v.3, p.541–548, 2007.

CLSI. *CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE*. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **CLSI supplement M100-S30**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. **CLSI document M07-A9** [ISBN 1-56238-784-7]. Vol. 32 No. 2. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2012.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. **CLSI document M07-A10** [ISBN 1-56238-988-2]. Vol. 35 No. 2. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2015.

COSTA, A.A.F.; ALVES, C.N.; CARDOSO, F.J.B.; MOLFETTA, F.A. Estudos de modelagem molecular em derivados de acrilamida como inibidores de serina protease viral NS3/NS2B do vírus da dengue, **Rev. Virtual Quím.**, v. 9, n. 6, 2017.

COSTA, S.M.O.; MENEZES, J.E.S.A. **Química orgânica I**. 2. ed. Fortaleza: EdUECE, 2015.

CRUZ, F.J.A.; BRITO, I.P.; SOBRAL, F.M.A.; SOUSA, L.A.T.; ALVES, E.F.; ANDREZA, R.S. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora dos extratos metanólico e hexânico da folha de *Allium cepa*. **Rev. Cienc. Salud**, v.14, n.2, p. 191-200, 2016.

CURRAN-EVERETT, D.; BENOS, D. Diretrizes para relatórios estatísticos em periódicos publicados pela American Physiological Society. **AJP - Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.287, n.2, p.G307, 2004.

DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. B. **Practical Hematology**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2016.

DAI, C.; LI, H.; ZHAO, W.; FU, Y.; CHENG, J. Bioactive functions of chlorogenic acid and its research progress in pig industry. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.**, v.1, n.1, p.1-20, 2023.

DARBY, E.M.; TRAMPARI, E.; SIASAT, P.; SOLSONA GAYA, M.; ALAV, I.; WEBBER, M.A.; BLAIR, J.M.A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.21, p.280–295, 2023.

DASHTBANI-ROOZBEHANI, A.; BROWN, M.H. Efflux Pump Mediated Antimicrobial Resistance by Staphylococci in Health-Related Environments: Challenges and the Quest for Inhibition. **Antibiotics (Basel)**, v.10, n.12, p.1502, 2021.

DAVIES, J. E. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. **Ciba Found Symp**, v. 207, p. 15-27, 1997.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DE PASCALE, G.; WRIGHT, G.D. Antibiotic resistance by enzyme inactivation: from mechanisms to solutions. **Chembiochem.**, v.11, p.1325–1334, 2010.

DHALIWAL, G.; CORNETT, P.A.; TIERNEY, L.M. J.R. Hemolytic Anemia. **Am Fam Physician**, v.69, n.11, p.2599-2607, 2004.

DIAS, G.T. **Avaliação da toxicidade *in silico* e das atividades hemolítica, antioxidante e antibacteriana *in vitro* das formas óleo essencial e óleo essencial microencapsulado de *Lippia pedunculosa***. 2018. Monografia (Graduação) - Bacharelado em Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

DIAS, R.L.A.; CORREA, A.G. Aplicações da química combinatória no desenvolvimento de fármacos. **Quím. Nova**, v. 24, n. 2, p. 236-242, 2001.

DOERN, C.D.; BURNHAM, C.A.D. It's Not Easy Being Green: The *Viridans* Group *Streptococci*, with a Focus on Pediatric Clinical Manifestations. **J. Clin. Microbiol.**, v.48, n. 11, p. 3829-3835, 2010.

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

EDUARDO, L.S.; FARIAS, T.C.; FERREIRA, S.B.; FERREIRA, P.B.; LIMA, Z.N.; FERREIRA, S.B. Antibacterial activity and time-kill kinetics of positive enantiomer of α -pinene against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.18, n.11, p.917-924, 2018.

EKICI, Ö.D.; LI, Z.Z.; CAMPBELL, A.J.; JAMES, K.E.; ASGIAN, J.L.; MIKOLAJCZYK, J.; SALVESEN, G.S.; GANESAN, R.; JELAKOVIC, S.; GRÜTTER, M.G.; POWERS, J.C. Designer, synthesis, and evaluation of az-peptide Michael acceptors as selective and potente inhibitors of caspases-2,-3,-6,-7,-8,-9, and -10. **J. Med. Chem.**, v.49, n.19, p.5728-5749, 2006.

ELHACHEM, M.; BOU-MAROUN, E.; ABBOUD, M.; MAROUN, R.G.; CAYOT, P. Combination of screen-printed carbon electrode and molecularly imprinted polymers for the selective determination of phenolic compounds in wine. **Antioxidants (Basel)**. v.15, n.11, p. 2036, 2022.

ENDIMIANI, A.; DEPASQUALE, J. M.; FORERO, S.; PEREZ, F.; HUJER, A. M.; ROBERTS-POLLACK, D.; FIORELLA, P. D.; PICKENS, N.; KITCHEL, B.; CASIANO-COLÓN, A. E.; TENOVER, F. C.; BONOMO, R. A. Emergence of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: a new challenge to our healthcare system. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 64, n. 5, p. 1102-1110, 2009.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. **J Med Chem**, v. 43, p. 3714-3717, 2000.

EUCAST Definitive Document Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Terminology. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 4, p. 291-296, 1998.

FABRIN, G.; VIZZOTTO, B. S. Resistência bacteriana a polimixinas: uma revisão dos atuais panoramas brasileiro e mundial. **Discipl. Sci. Ciênc. Saúde**, v. 20, n. 2, p. 321-339, 2019.

FAN, D.; YANG, H.; LI, F.; SUN, L.; DI, P.; LI, W.; TANG, Y.; LIU, G. *In silico* prediction of chemical genotoxicity using machine learning methods and structural alerts. **Toxicol. Res**, v. 7, p. 211-220, 2018.

FARAG, M.R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity, **Chem.-Biol. Interact.**, v. 279, p. 73-83, 2018.

FERNANDES, P.B. Antibacterial discovery and development—the failure of success? **Nat. Biotechnol.**, v. 24, p. 1497-1503, 2006.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R.E.W. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.25, p.661–681, 2012.

FERNÁNDEZ-ALBERTI, A. FINK, N.E. Red Blood Cell Osmotic Fragility Confidence Intervals: a Definition by Application of a Mathematical Model. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 38, n.5, p.433 - 436, 2000.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A Fitoterapia No Mundo Atual. **Quim. Nova**, v. 33, n. 9, 1829-1829, 2010.

FIGUEIREDO JÚNIOR, E. C.; CAVALCANTI, Y. W.; LIRA, A. B.; PESSÔA, H. L. F.; LOPES, W. S.; SILVA, D. R.; FREIRES, I. A.; ROSALEN, P. L.; COSTA, E. M. M. B.; PEREIRA, J. V. Phytochemical composition, antifungal activity, *in vitro* and *in vivo* toxicity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves extract. **B LATINOAM CARIBE PL**, v.15, n. 5, p. 536, 2021.

FORESTO, R.D.; MENEZES, L.M.; NISHIMURA, L.T.; CRISTELLI, M.P.; VIANA, L.A.; SANTOS, D.W.C.L.; REQUIÃO-MOURA, L.R.; TEDESCO-SILVA, H.; MEDINA-PESTANA, J. Challenges of Multidrug-resistant New Delhi Metallo-beta-Lactamase (NDM-1)-producing Enterobacteriaceae in Kidney Transplant Patients. **Braz. J. Nephrol.**, v.45, n.1, p. 116-120, 2021.

GARCIA-DE-LA-MARIA, C.; XIONG, Y. Q.; PERICAS, J. M.; ARMERO, Y.; MORENO, A.; MISHRA, N. N.; RYBAK, M. J.; TRAN, T. T.; ARIAS, C. A.; SULLAM, P. M.; BAYER, A. S.; MIRO, J. M. Impact of high-level daptomycin resistance in the *Streptococcus mitis* group on virulence and survivability during daptomycin treatment in experimental infective endocarditis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 61, n. 5, e02418-16, 2017.

GAUDERETO, J.J. **Comparação de métodos para detecção de sinergismo *in vitro* de antibióticos contra bactérias gram-negativas multirresistentes.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

GOUVÊA-e-SILVA, L. F. **Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 2006.

GU, X., CHEN, J., ZHANG, Y., GUAN, M., LI, X., ZHOU, Q., SONG, Q., QIU, J. Synthesis and assessment of phenylacrylamide derivatives as potential anti-oxidant and anti-inflammatory agents. **Eur. J. Med. Chem.** v.180, p. 62-71, 2019.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím. Nova**, v. 33, n. 3, 2010.

GUO, M. Y.; YAO, K. H. Research Progress on the Mechanism of -Lactam Resistance in Group A *Streptococci in vivo*. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi**, v.26, n. 1, p. 92-97, 2024.

GUTH, J.; MARTINO, G.; PASAPANE, J.; RONCO, D. Aplicação de polímeros na proteção da pele. **Cosmetics & Toiletries**, v. 4, n. 3, p. 42-45, 1991.

- HAN, M.İ.; İNCE, U. Synthesis and antimicrobial evaluation of novel tetracain thiosemicarbazide derivatives. **Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.**, v.197, n.9, p.981-986, 2022.
- HANSEN, K.; MIKA, S.; SCHROETER, T.; SUTTER, A.; LAAK, A.T.; STEGER-HARTMANN, T.; HEINRICH, N.; MÜLLER, K.R. Benchmark Data Set for *in silico* Prediction of Ames Mutagenicity. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 49, n. 9, p. 2077-2081, 2009.
- HONG, Y.; BOITI, A.; VALLONE, D.; FOULKES, N.S. Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution. **Antioxidants**, v.13, n.3, p.312, 2024.
- HOSSEINPOOR, H; IRAJI, A; EDRAKI, N; PIRHADI, S; ATTARROSHAN, M; KHOSHNEVISZADEH, M; KHOSHNEVISZADEH, M. A Series of Benzyldenes Linked to Hydrazine-1-carbothioamide as Tyrosinase Inhibitors: Synthesis, Biological Evaluation and Structure-Activity Relationship. **Chem Biodivers**, v.17, n.8, p.1-12, 2020.
- HRANJEC, M.; GRDISA, M.; PAVELIC, K.; BOYKIN, D.M.; KARMINSKI-ZAMOLA, G. Synthesis and antitumor evaluation of some new substituted amidino-benzimidazolyl-furyl-phenyl-acrylates and naphtho [2,1-b] furan-carboxylates. **II Farmaco**, v.58, p.1319-24, 2003.
- HUSAIN, A.; AHMAD, A.; KHAN, S.A.; ASIF, M.; BHUTANI, R.; AL-ABBASI, F.A. Synthesis, molecular properties, toxicity and biological evaluation of some new substituted imidazolidine derivatives in search of potent anti-inflammatory agents. **Saudi Pharm. J.**, v. 24, n.1, p. 104-114, 2016.
- HYNDMAN, R.J.; ATHANASOPOULOS, G. **Forecasting: principles and practice**. 2^a. ed. Melbourne, Austrália: OTexts, 2018.
- JIANG, C.; YANG, H.; DI, P.; LI, W.; TANG, Y.; LIU, G. *In silico* prediction of chemical reproductive toxicity using machine learning. **J. Appl. Toxicol.**, v. 39, n.6, p. 844-854, 2019.
- JORGENSEN, J. H., FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clin. Infect. Dis.**, v. 49, n. 11, p.1749-1755, 2009.
- KAATZ, G.W.; SEO, S.M. Resistência multidrogas mediada por NorA induzível em *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.39, p.2650–2655, 1995.
- KAZMIERCZAK, K.M.; TSUJI, M.; WISE, M.G.; HACKEL, M.; YAMANO, Y.; ECHOLS, R.; SAHM, D.F. *In vitro* activity of cefiderocol, a siderophore cephalosporin, against a recent collection of clinically relevant carbapenem-non-

susceptible Gram-negative bacilli, including serine carbapenemase- and metallo- β -lactamase-producing isolates (SIDERO-WT-2014 Study). **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 53, n. 2, p. 177-184, 2019.

KEMPAIAH, R. K.; SRINIVASAN, K. Beneficial influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on erythrocyte integrity in high-fat fed rats. **J. Nutr. Biochem.**, v.17, p. 471-478, 2006.

KENAWY, E.; ALI, S.S.; AL-ETEWY, M.; SUN, J.; WU, J.; EL-ZAWAWY, N. Synthesis, Characterization and Biomedical Applications of a Novel Schiff Base on Methyl Acrylate-functionalized Chitosan Bearing P-nitrobenzaldehyde Groups. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.122, p. 833-843, 2019.

KNOP, L.B.; MARIA, D.A. Métodos substitutivos e a experimentação animal: um enfoque inovador. **Rev. Soc. Bras. Cienc. Anim. Lab.**, v. 4, Fascículo 2, p. 101-114, 2016.

KOMOIKE, Y.; MATSUOKA, M. In vitro and *in vivo* studies of oxidative stress responses against acrylamide toxicity in zebrafish. **J Hazard Mater**. 365:430-439, 2019.

KOWALSKA-KROCHMAL, B.; DUDEK-WICHER, R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 165, 2021.

KOZLOV, A.V.; JAVADOV, S.; SOMMER, N. Cellular ROS and Antioxidants: Physiological and Pathological Role. **Antioxidants**, v.13, n.5, p.602, 2024.

KUMAR, G.; LOGANATHAN, K.; RAO, B. Haemolytic activity of Indian medicinal plants toward human erythrocytes: an *in vitro* study. **Elixir Int. J. Bot.**, v. 40, p.5534-5537, 2011.

KUMAR, K.S; PRIYA, N.P.; ARAVINDAKSHAN, K.K. Synthesis, Crystal Structure, and *In Vitro* Cytotoxic, Antitumor And Antimicrobial Evaluation of a New Pyrazole Derivative N-3,5-Trimethyl-Nphenyl-1-H-Pyrazole-1-Carbothioamide. **Pharm. Chem. J.**, v.54, p.1079-1086, 2021.

KUMAR, S.; BALAYA, R. D. A.; KANEKAR, S.; RAJU, R.; PRASAD, T. S. K.; KANDASAMY, R. K. Computational Tools for Exploring Peptide-Membrane Interactions in Gram-Positive Bacteria. **Comput. Struct. Biotechnol.**, v. 21, p. 1995-2008, 2023.

KUMAR, V.; PARATE, S.; DANISHUDDIN; ZEB, AMIR; SINGH, P.; LEE, G.; JUNG, T.S.; LEE, K.W.; HA, M.W. 3D-QSAR-Based Pharmacophore Modeling, Virtual Screening, and Molecular Dynamics Simulations for the Identification of Spleen Tyrosine Kinase Inhibitors. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v.13, 2022.

Laboratory of Molecular Modeling and Design. admetSAR©. A comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties. Shanghai, China: East China University of Science and Technology, [2012].

LAGUNIN, A.; FILIMONOV, D.; ZAKHAROV, A.; XIE, W.; HUANG, Y.; ZHU, F.; SHEN, T.; YAO, J.; POROIKOV, V. Computer-Aided Prediction of Rodent Carcinogenicity by PASS and CISOC-PSCT. **Mol. Inf.**, v. 28, n. 8, p. 806-810, 2009.

LAI, L.-Y.; SATISHKUMAR, N.; CARDOZO, S.; HEMMADI, V.; MARQUES, L. B.; HUANG, L.; FILIPE, S.R.; PINHO, M.G. CÂMARAS, H.F.; CHATTERJEE, S.S. As funções alteradas de PBP4 e GdpP medeiam sinergicamente a resistência a β -lactâmicos de alto nível e amplo espectro semelhante ao MRSA em *Staphylococcus aureus*. **mBio**, v. 15, n. 5, e0288923, 2024.

LEE, S.H.; LEE, J.R.; LUNDE, C.S.; KUBO, I. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Candida albicans* and other fungal pathogens to polygodial, a sesquiterpene dialdehyde. **Planta Med.**, v. 65, n. 3, p. 204-208, abr. 1999.

LEUNG, E.; WEIL, D.; RAVIGLIONE, M.; NAKATANI, H. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance. **Bull. World Health Organ.**, v. 89, p. 390-39, 2011.

LEWIS, K. The Science of Antibiotic Discovery. **Cell**, v. 181, n. 1, p. 29-45, 2020.

LI, J.; LI, Y.; KOIDE, A.; KUANG, H.; TORRES, V.J.; KOIDE, S.; WANG, D.-N.; TRAASETH, N.J. Proton-coupled transport mechanism of the efflux pump NorA. **Nature Communications**, v.15, n.4494, p.1-12, 2024.

LI, X., LIU, J.L., YANG, X.H., LU, X., ZHAO, T.T., GONG, H.B., ZHU, H.L. Synthesis, biological evaluation and molecular *docking* studies of 3-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-N-phenylacrylamide derivatives as inhibitors of HDAC activity. **Bioorg Med Chem.** v.20, n.14, p. 4430-6, 2012.

LIMA, E.; SILVA, F. S. H.; SILVA, N. M. F.; SILVA, K. R. A. A formação natural de acrilamida em alimentos e seus riscos para a saúde. **Rev. Presença**, v. 8, n. 17, p. 42-73, 2022.

LIMA, Z. N.; DE MOURA, R. O.; DINIZ, M. de F. F. M.; DE OLIVEIRA FILHO, A. A.; NEPOMUCENO, F. C. L.; BARBOSA, F. P. T.; VASCONCELOS, I. R. A.; CAVALCANTI, M. de A. T.; DOS SANTOS, G. L. D.; FERREIRA, S. B.; SILVA, L. A. P.; PESSÔA, H. de L. F. Avaliação *in silico* das atividades farmacológicas de isômeros dissustituídos com cloro: Etil (2E) -2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato e Etil (2E) -2-ciano-3-(2,4-diclorofenil) acrilato. **Braz. J. Health Rev.**, v. 7, n. 1, p. 4145–4166, (2024a).

LIMA, Z. N.; DE MOURA, R. O.; DINIZ, M. de F. F. M.; DE OLIVEIRA FILHO, A. A.; NEPOMUCENO, F. C. L.; PEREIRA, D. N.; CAVALCANTI, M. de A. T.; DOS SANTOS, G. L. D.; SILVA, L. A. P.; PESSÔA, H. de L. F. Non-clinical toxicological analysis of dichlorinated phenylacrylate isomers: Ethyl (2E)-2-cyano-3-(2,6-

dichlorophenyl)acrylate e Ethyl (2E)-2-cyano-3-(2,4-dichlorophenyl)acrylate. **Observ. Econ. Lat. Am.**, v. 22, n. 2, p. e3271, (2024b).

LING, L. L.; SCHNEIDER, T.; PEOPLES, A. J.; SPOERING, A. L.; ENGELS, I. *et al.* A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 455-459, 2015.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacogn. Rev.**, v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.

LORIAN, V. (Ed.). **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5^a ed. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 367-373, 2005.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Rev. Port. Saúde Pública**, v. 34, n. 1, 2016.

LUDBROOK, J. A apresentação de estatísticas em Farmacologia e Fisiologia Clínica e Experimental. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.35, n.10, p.1271-1274, 2008.

LUIZE, P.S.; TIUMAN, T.S.; MORELLO, L.G.; MAZA, P.K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **RBCF (BJPS)**, v.41, n.1, 2005.

MACASKILL, P. Standard deviation and standard error: interpretation, usage and reporting. **Med. J. Aust.**, v.208, n.2, p.63-64, 2018.

MAGALHÃES, C.S.; ALMEIDA, D.M., BARBOSA, H.J.C., DARDENNE, L.E. A dynamic niching genetic algorithm strategy for *docking* of highly flexible ligands. **Information Sciences**, v.289, p.206–24, 2014.

MARTINEZ, J. L.; BAQUERO, F. Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 7, p. 1771-1777, 2000.

MARTINS, A. S. **Prevalência e caracterização de resistência a polimixina B em Enterobactérias na cidade de Salvador, Bahia**. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz, Bahia, 2022.

MATTOS, M.C.; MARZORATI, L. Aspectos mecanísticos da adição de Michael. **Quím. Nova**, v.22, n.5, 1999.

McCOLLISTER, D.D.; OYEN, F.; ROWE, V.K. Toxicology of acrylamide. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 6, n. 2, p. 172-181, 1964.

MEDEIROS, A. A. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, Suplemento 1, p. S19-S45, 1997.

MIRANDA, É.J.P.; OLIVEIRA, G.S.S.; ROQUE, F.L.; SANTOS, S.R.; OLMOS, R.D.; LOTUFO, P.A. Susceptibility to antibiotics in urinary tract infections in a secondary care setting from 2005-2006 and 2010-2011, in São Paulo, Brazil: data from 11.943 urine cultures. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 56, n. 4, p. 313-324, 2014.

Molinspiration Cheminformatics, 2024. Molinspiration Property Calculation Services [Internet]. Slovensky Grob, Eslováquia: **Molinspiration**®. Disponível em: <www.molinspiration.com>. Acesso em: 20 Jan. 2022.

MOTTRAM D.S., WEDZICHA B.L., DODSON A.T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. **Nature**, v.419, p. 448-449, 2002.

NAOUM, P.C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M.S. Dosagem espectrométrica de metemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.26, n. 1, p. 19 -22, 2004.

NAVRATNA, V.; NADIG, S.; SOOD, V.; PRASAD, K.; ARAKERE, G.; GOPAL, B. Molecular basis for the role of *Staphylococcus aureus* penicillin-binding protein 4 in antimicrobial resistance. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 1, p. 134–144, 2010.

NECA, A.I.M.N. **Síntese e avaliação biológica de inibidores da monoamina oxidase para estratégias neuroprotectoras**. 2011. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

O'NEILL, J.; DAVIES, S.; FARRAR, J.; REX, J.; WHITE, L.J.; MURRAY, R.; HEALTH PROTECTION ANALYTICAL TEAM; PUBLIC HEALTH ENGLAND; WELLCOME TRUST. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. **The Review on Antimicrobial Resistance**, 2014.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J Antimicrob Chemother.**, v.52, n.1, p.1, 2003.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. **Test No.: 301: Ready Biodegradability**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. Paris: OECD Publishing, 1992.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. **Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure**. Paris: OECD Publishing, 2022.

OLIVEIRA, D; BORGES, A; SIMÕES, M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 252, 2018.

OLIVEIRA, M.T.; SILVA, J.P. Novos mecanismos de ação dos antibióticos e suas implicações clínicas. **Rev. Bras. Med.**, v. 45, n. 2, 2018.

OLIVEIRA, R.; AIRES, T. Resistência aos antimicrobianos. **Gaz. Méd.**, n.2, v.3, 2016.

OLKER, J.H.; ELONEN, C.M.; PILLI, A.; ANDERSON, A.; KINZIGER, B.; ERICKSON, S.; SKOPINSKI, M.; POMPLUN, A.; LALONE, C.A.; RUSSOM, C.L.; HOFF, D. The ECOTOXicology Knowledgebase: A Curated Database of Ecologically Relevant Toxicity Tests to Support Environmental Research and Risk Assessment. **ET&C**, v.41, n.6, p.1520-1539, 2022.

PAHIL, K. S.; GILMAN, M. S. A.; BAIDIN, V.; CLAIRFEUILLE, T.; MATTEI, P.; BIENIOSSEK, C.; DEY, F.; MURI, D.; BAETTIG, R.; LOBRITZ, M.; BRADLEY, K.; KRUSE, A. C.; KAHNE, D. A new antibiotic traps lipopolysaccharide in its intermembrane transporter. **Nature**, v. 625, p. 572–577, 2024.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PASS Online©. Prediction of Activity Spectra for Substances [Internet]. Moscou, Russia: Institute of Biomedical Chemistry of Russian. **PASS Online©**. Disponível em: <www.passonline.org>. Acesso em: 15 Jan. 2022.

PEDERSEN, M.; VRYONIDIS, E.; JOENSEN, A.; TÖRNQVIST, M. Hemoglobin adducts of acrylamide in human blood – What has been done and what is next? **Food Chem. Toxicol.**, v.161, 112799, 2022.

PEREIRA, C. T.; PEREIRA, M. E. T.; SIMÃO, K. L. A.; SIMÃO, B. L. A.; MEDEIROS, M. A. A.; ALVES, M. S.; TELES, Y. C. F.; SOUSA, A. P.; MEDEIROS, C. I. S.; OLIVEIRA, H. M. B. F.; OLIVEIRA-FILHO, A. A. Citotoxicidade do extrato acetato de etila de *Psidium guineense* swartz em células sanguíneas humanas: um estudo *in vitro*. **Rev. Univ. Vale Rio Verde**, v. 18, n. 1, 2020.

PEREIRA, D.N. **Avaliação preliminar da atividade antibacteriana de derivados fenilacrilatos substituídos**. 2016. Monografia (Graduação) – Bacharelado em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

PÉREZ, C.N.; MONTEIRO, J.L.F.; NIETO, J.M.L.; HENRIQUES, C.A. Influence of basic properties of Mg, Al-mixed oxides on their catalytic activity in knoevenagel condensation between benzaldehyde and phenylsulfonylacetonitrile. **Quím. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2341-2346, 2009.

PERICÀS, J.M.; NATHAVITHARANA, R.; GARCIA-DE-LA-MÀRIA, C.; FALCES, C.; AMBROSIONI, J.; ALMELA, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, J.; QUINTANA, E.; MARCO, F.; MORENO, A.; BAYER, A. S.; MIRÓ, J.M.; KARCHMER, A.W. Endocarditis

Caused by Highly Penicillin-Resistant *Viridans* Group *Streptococci*: Still Room for Vancomycin-Based Regimens. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 63, n. 8, 2019.

PHILLIPS, D.J.; HARRISON, J.; RICHARDS, S.; MITCHELL, D.E.; TICHAUER, E.; HUBBARD, A.T.M; GUY, C.; HANDS-PORTMAN, I.; FULLAM, E.; GIBSON, M.I. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Cationic Polymers against *Mycobacteria*: Toward Antitubercular Macromolecules. **Biomacromolecules**, v.18, n. 5, p. 1592-599, 2017.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 97, p. 55-74, 2015.

POJAROVA, M.; KAUFMANN, D.; GASTPAR, R.; NISHINO, T.; RESZKA, P.; BEDNARSKI, P. J.; VON ANGERER, E. [(2-Phenylindol-3-yl)methylene] propanedinitriles inhibit the growth of breast cancer cells by cell cycle arrest in G2/M phase and apoptosis. **BIOORG MED CHEM**, v. 15, n. 23, p. 7368-7379, 2007.

PUPO, M.T.; GUIMARÃES, D.O.; FURTADO, N.A.J.C.; BORGES, W.S. Em **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**; Taft, C. A., ed.; Ed. Research Signpost: Kerala, cap. 4, 2006.

QANDEEL, B.M.; MOWAFY, S., ABOUZID, K., FARAG, N.A. Lead generation of UPPS inhibitors targeting MRSA: Using 3D- QSAR pharmacophore modeling, virtual screening, molecular *docking*, and molecular dynamic simulations. **BMC Chemistry**, v.18, n.14, p.1-22, 2024.

QUADROS, A.O.; BRITO JR., L.C. Análise qualitativa do teste de fragilidade osmótica para amostras processadas a fresco ou após 24 horas de incubação a 37°C. **Rev. Bras. Anál. Clín.**, vol. 53, n.3, 2021.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E.L.A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J.C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 305-309, 1997.

RASHIDIEH, B. *et al.* A molecular modeling based screening for potential inhibitors to alpha hemolysin from *Staphylococcus aureus*. **Bioinformation**, v. 11, n. 8, p. 373, 2015.

RAUSCH, P.C.; AGOSTINETTO, L.; SIEGLOCH, A. E. Descarte de resíduos de medicamentos pela população rural. **Ambient. soc.**, v. 26, 2023.

RÉGIS, I.; PESENTI, E.C. Teste do micronúcleo písceo (MNP) e alterações morfológicas nucleares (AMN) em espécies de peixes. **Anais do EVINCI**, Curitiba, v. 1, n. 3, 2015.

REIS, L.S.; GONÇALVES, E.C.B.A.; MARIM, V.A. O perigo dos alimentos contendo amido. **Bol. Cent. Pesqui. Process. Aliment.**, v. 32, n. 1, p. 151-161, 2014.

REZENDE, P.; MASUNARI, A.; SANTOS, M. G. B.; MAMIZUKA, E. M.; VESSONI-PENNA, T. C.; TAVARES, L. C. Hansch Analysis of nifuroxazide analogues with antimicrobial activity against MRSA. **Drugs Fut.**, v. 27, p. 192-192, 2002.

RIBEIRO, E.A.; TOMICH, G.M.; COSTA, B.A.; OLIVEIRA, R.A.; JESUS, L.K.B. *Streptococcus agalactiae*: colonização de gestantes de alto risco em um hospital regional da Amazônia brasileira e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. **Rev Pan Amaz Saude**, v.12, p.1-9, 2021.

RIFAI, L., SALEH, F.A. A review on acrylamide in food: occurrence, toxicity, and mitigation strategies. **Int J Toxicol.** v.39, n.2, p. 93-102, 2020.

RIOS, J.O. ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE INDUZIDA POR FÁRMACOS. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, Rio de Janeiro, v.42 n. S2, 2020.

ROBINSON, R.L.M.; GLEN, R.C.; MITCHELL, J.B.O. Development and Comparison of *h*ERG Blocker Classifiers: Assessment on Different Datasets Yields Markedly Different Results. **Mol. Inform.**, v. 30, n.5, p.443-458, 2011.

ROCHA, W.R.V. da. **Atividade sinérgica e citotóxica da associação linalol antifúngicos e seus efeitos sobre fatores de virulência de espécies de *Candida***. 2021. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

RODRIGUES, K.M.M.T. **Estudo da toxicidade pré-clínica do extrato bruto etanólico de *Piper Aduncum***. 2023. 55 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2023.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, À.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROSA, L.L.S. **Atividade antibacteriana do isoeugenol frente cepas clínicas de *Staphylococcus aureus***. 2018. Dissertação (Mestrado em Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

ROSSOLINI, G. M.; MANTENGOLI, E. Antimicrobial Resistance in Europe and Its Potential Impact on Empirical Therapy. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 14, n. s6, p. 2-8, 2008.

SANGI, D.P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Quím. Nova**, v. 39, n. 8, 2016.

SANTANA, E. R. **Composição química, atividade antimicrobiana, potencial antioxidante e avaliação da citotoxicidade de compostos de *Eugenia brejoensis* (Myrtaceae)**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

SANTOS, E. E. P. **Síntese e avaliação da atividade antibacteriana de derivados de 2-cianoacetamida**. 2017. 57 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

SANTOS, L.H. **Docagem molecular**: em busca do encaixe perfeito e acessível. BIOINFO, Edição 1, 2021.

SANTOS, R.M.; COSTA, L.P. Desafios na luta contra a resistência bacteriana: uma visão geral. **Rev. Patol. Microbiol.**, v. 51, n. 3, 2019.

SANTOS, V.L.A.; GONSALVES, A.A.; ARAÚJO, C.R.M. Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de Lipinski e preparação de heterociclo 1, 3, 4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. **Química Nova**, v.41, n.1, p.110-115, 2018.

SASHO, S.; OBASE, H.; ICHIKAWA, S.; KITAZAWA, T.; NONAKA, H.; YOSHIZAKI, R.; ISHII, A.; SHUTO, K. Synthesis of 2-imidazolidinylidene propanedinitrile derivatives as stimulators of gastrointestinal motility. 1. **J. Med. Chem.**, v. 36, n. 5, p. 572-579, 1993.

SASHO, S.; OBASE, H.; ICHIKAWA, S.; YOSHIZAKI, R.; ISHII, A.; SHUTO, K. Synthesis and *in vitro* gastrointestinal motility enhancing activity of 3-aryl-2-imidazolidinylidene propanedinitrile derivatives. **BIOORG MED CHEM LETT**, v.4, n. 4, p. 615-618, 1994.

SASHO, S.; SEISHI, T.; KAWAMURA, M.; HIROSE, R.; TOKI, S.; SHIMADA, J. Diamine derivatives containing imidazolidinylidene propanedinitrile as a new class of histamine H3 receptor antagonists. Part I. **BIOORG MED CHEM LETT**, v. 18, n. 7, p. 2288-2291, 2008.

SCHAENZER, A.J.; WRIGHT, G.D. Antibiotic resistance by enzymatic modification of antibiotic targets. **Trends Mol. Med.**, v.26, p.768–782, 2020.

SCHRADER, J. Ectonucleotidases as bridge between the ATP and adenosine world: reflections on Geoffrey Burnstock. **Purinergic Signalling**, v.18, p.193-198, 2022.

SICILIANO, V.; PASSEROTTO, R. A.; CHIUCHIARELLI, M.; LEANZA, G. M.; OJETTI, V. Difficult-to-Treat Pathogens: A Review on the Management of Multidrug-Resistant *Staphylococcus epidermidis*. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 5, p. 1126, 2023.

SILVA, D.; MENDES, E.; SUMMERS, E. J.; NECA, A.; JACINTO, A. C.; REIS, T.; AGOSTINHO, P.; BOLEA, I.; JIMENO, M. L.; MATEUS, M. L.; OLIVEIRA-CAMPOS, A. M. F.; UNZETA, M.; MARCO-CONTELLI, J.; MAJEKOVA, M.; RAMSAY, R. R.; CARREIRAS, M. C. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of nitrile-containing compounds: Exploring multiple activities as anti-Alzheimer agents. **DRUG DEV RES**, v. 81, n. 2, p. 215-231, 2020.

SILVA, K.A.; SILVA, A.L.N.; GOMES, Y.R.M.S.; SÁ, M.K.S.; MAGALHÃES, T.N.; ALVES, N.N.N.; RAMOS, R.A.; CASSEB, A.A.; MILITÃO, J.S.L.T.; MESQUITA, E.A. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do extrato de *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) e sua equivalência com compostos quinolólicos e avermectina. **Res. Soc. Dev.**, v. 11, n. 15, 2022.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

SILVA, T. Antibioticoterapia: sinergismo e antagonismo. Rural Centro, 2013. *In*: Rural Centro. [Campo Grande], 09 de setembro 2013.

SILVÉRIO, M.D.O.; CASTRO, C.F.S.; MIRANDA, A.R. Avaliação da atividade antioxidante e inibitória da tirosinase das folhas de *Dipteryx alata* Vogel (Baru). **Rev. bras. plantas med.**, v.15, n.1, p.59-65, 2013.

SILVERMAN, R. B.; HOLLADAY, M. W. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**. 3ª ed. Amsterdam: Academic Press, 2015.

SINDELDECKER, D.; STOODLEY, P. The Many Antibiotic Resistance and Tolerance Strategies of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biofilm**, v. 3, p. 100056, 2021.

SMITH, C.J.; PERFETTI, T.A.; RUMPLE, M.A.; RODGMAN, A.; DOOLITTLE, D.J. "IARC Group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. **Food Chem. Toxicol.**, v.38, p. 371-383, 2000.

SOUSA, G.L.S. **Síntese e avaliação do potencial antitumoral de novos derivados tiossemicarbazônicos-acridínicos**. 2019. 240f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2019.

SWAIN, B., ANGELI, A., SINGH, P., SUPURAN, C.T., ARIFUDDIN, M. New Coumarin / sulfocoumarin Linked Phenylacrylamides as Selective Transmembrane Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis and In-vitro Biological Evaluation. **Bioorg Med Chem**. v.28, n.15, p. 115586, 2020.

SWIRSKY, L.O. *Carcinogenic Potency Database* (CPDB). Wilmington: **ToxPlanet**, [2011].

SYED, Y.Y. Cefiderocol: A Review in Serious Gram-Negative Bacterial Infections. **Drugs**, v.81, p.1559–1571, 2021.

TAHERPOUR, A.A.; BEHNAM POUR, N. Modulation of antibiotic resistance in bacterial strains isolated from urinary tract infections by exposure to sub-MICs of cefotaxime. **Braz. J. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 1405-1412, 2014.

TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2020.

TEIXEIRA, L.R.; SILVA JÚNIOR, J.J.; VIEIRA, P.H.S.; CANTO, M.V.G.; FIGUEIRÊDO, A.G.M.; SILVA, J.L.V. Tamoxifen inhibits the anion channel induced by *Staphylococcus aureus* α -hemolysin: electrophysiological and docking analysis. **Res. Soc. Dev.**, v.10, n.2, e13010212326, 2021.

TEIXEIRA, L.R.; SILVA JUNIOR, J.J.; VIEIRA, P.H.S.; FIGUEIRÊDO, A.G.M.; CANTO, M.V.G.; MACHADO, D.C.; SILVA, J.L.V. Furosemide blocks the anion channel caused by *Staphylococcus aureus* α -hemolysin. **An Fac Med Olinda**, v.7, n.1, p.1, 2022.

THAI, K.-M.; NGO, T.-D.; PHAN, T.-V.; TRAN, T.-D.; NGUYEN, N.-V.; NGUYEN, T.-H.; LE, M.-T. Virtual Screening for Novel *Staphylococcus aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors From Natural Products. **Med. Chem. (Shp-sariqah, UAE)**, v. 11, n. 2, p. 135-155, 2015.

THEN, R.L. Mechanisms of resistance to trimethoprim, the sulfonamides, and trimethoprim-sulfamethoxazole. **Clin. Infect. Dis.**, v.4, p.261–269, 1982.

TIWARI, S.; NIZET, O.; DILLON, N. Development of a high-throughput minimum inhibitory concentration (HT-MIC) testing workflow. **Front. Microbiol.**, Sec. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy, v. 14, 2023.

TYAGI, A., MISHRA, A. Methacrylamide based antibiotic polymers with no detectable bacterial resistance. **Soft Matter**. v.17, n.12, p.3404-3416, 2021.

UCHÔA, I.S.; MAGALHÃES, M. do A. V. Teste de Micronúcleo um importante Biomarcador Celular / Micronucleus test an important Cellular Biomarker. **Braz. J. Health Rev.**, v. 3, n. 2, p. 3851–3857, 2020.

USEPA. *United States Environmental Protection Agency. Methods For Measuring The Acute Toxicity Of Effluents And Receiving Waters To Freshwater And Marine Organisms*. Washington, DC: Office of Water, 2002. (EPA-821-R-02-012).

VALE DE MACEDO, G.H.R.; COSTA, G.D.E.; OLIVEIRA, E.R.; DAMASCENO, G.V.; MENDONÇA, J.S.P.; SILVA, L.D.S.; CHAGAS, V.L.; BAZÁN, J.M.N.; ALIANÇA, A.S.D.S.; MIRANDA, R.C.M.; ZAGMIGNAN, A.; MONTEIRO, A.S.; SILVA, L.C.N. Interplay between ESKAPE pathogens and immunity in skin infections: An Overview of the Major Determinants of Virulence and Antibiotic Resistance. **Pathogens (Basel)**, v. 10, n. 2, p. 148, 2021.

VAN DUIN, D.; PATERSON, D. L. Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 30, n. 2, p. 377-390, 2016.

VELOSO, C.O.; PINTO, A.C.; SANTOS, E.N.; MONTEIRO, J.L.F. 23-P-29-Synthesis of fine chemicals intermediates over basic zeolites. **Stud. Surf. Sci. Catal.**, v. 135, p. 237, 2001.

VENDICHETIS, A. L. **Revisão da bibliografia de bactérias resistentes**: Principais causas e soluções. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UFSC, 2021.

VENTOLA, C.L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P T**, v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.

VICTAL, J.C.; VALÉRIO, L.B.; OSHIRO, M.C. BAPTISTA, S.C.; PINHEIRO, F. Métodos alternativos *in vitro* e *in silico*: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **Rev. Inter. Toxicol.**, v. 7, n. 2, p. 36-57, 2014.

VILLAR, H. O.; KOEHLER, R. T. Comments on the design of chemical libraries for screening. **Mol. Divers.**, v. 5, n. 1, p. 13-24, 2000.

VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; KATTAN, J. N.; LÓPEZ, J. A.; QUINN, J. P. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 4, p. 1553-1555, 2007.

WAHEDI, H.M.; CHAE, J.K.; SUBEDI, L.; KANG, M.C.; CHO, H.; KIM, S.; KIM, S.Y. NED416, a Novel Synthetic Sirt1 Activator, Promotes Cutaneous Wound Healing via the MAPK/Rho Pathway. **Int J Mol Med**. v.46, n.1, 2020.

WANG, L.; PAN, X.; JIANG, L.; CHU, Y.; GAO, S.; JIANG, X.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; LUO, S.; PENG, C. The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry: A Review. **Front. Nutr.**, v.9, p.1-22, 2022.

WANG, Y., WANG, S., TAO, X., WANG, Y., WU, Y., CHEN, N., HU, C., WANG, H., YU, S., SHENG, R. The SAR-based development of small molecular HBV capsid assembly modulators. **Med Chem Res**. v.31, n.9, p. 1414-430, 2022.

WARNER, A.J.; HATHAWAY-SCHRADER, J.D.; LUBKER, R.; DAVIES, C.; NOVINCE, C.M. Tetracyclines and bone: Unclear actions with potentially lasting effects. Review Article. **Bone**, v.159, n.82, p.116377, 2022.

WARREN, J. W. *et al.* Guidelines for antimicrobial treatment uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in woman. Infectious Diseases Society of America (IDSA). **Clin Infect Dis**, v. 29, p. 745-58, 1999.

WATKINS, R.R.; FILE, T.M. JR. Lefamulin: A Novel Semisynthetic Pleuromutilin Antibiotic for Community-acquired Bacterial Pneumonia. **Clin. Infect. Dis.**, v.71, n.10, p.2757–2762, 2020.

WEBBER, M.A.; PIDDOCK, L.J.V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.51, p.9–11, 2003.

WEFFORT-SANTOS, A. M.; ARBOS, K. A.; CLARO, L. M.; BORGES, L.; SANTOS, C. A. M. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutr. Res.**, v. 28, p. 457-463, 2008.

WILSON, D.N.; HAURYLIUK, V.; ATKINSON, G.C.; O'NEILL, A.J. Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.18, p.637–648, 2020.

WOHLGEMUTH, I.; BERINGER, M.; RODNINA, M.V. Rapid peptide bond formation on isolated 50S ribosomal subunits. **EMBO Rep.**, v. 7, p. 669-703, 2006.

WONG, Anthony. Centro de Assistência Toxicológica do Hospital das Clínicas de São Paulo (CEATOX). Palestrante do Seminário de Urgências Toxicológicas em Salvador/ BA. **Toxicologista alerta para o alto índice de intoxicação no Brasil.** Matéria publicada no Notícias On-line em 30 de abril de 2003.

WRIGHT, G.D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.57, p.1451–1470, 2005.

WU, J.; LIN, X.; LI, J.; LV, Z.; DUAN, N.; WANG, Z.; WU, S. Dual-color nanospheres based on aggregation-induced emission and catalytic hairpin assembly for simultaneous imaging of acrylamide and miR-21 in living cells. **J. Hazard. Mater.**, v. 462, p. 1-12, 2024.

XU, C.; CHENG, F.; CHEN, L.; DU, Z.; LI, W.; LIU, G.; LEE, P.W.; TANG, Y. Predição *in silico* da mutagenicidade química de Ames. **J. Chem. Inf. Model.**, v.52, n.11, p.2840-2847, 2012.

YANG, H.; LOU, C.; SUN, L.; LI, J.; CAI, Y.; WANG, Z.; LI, W.; LIU, G.; TANG, Y. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics**, Oxford, 2018.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J. W.; STEWARD, C. D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F. C. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.

YOUNG, M.; WALSH, D.J.; MASTERS, E.; GONDIL, V.S.; LASKEY, E.; KLACZKO, M.; AWAD, H.; McGRATH, J.; SCHWARZ, E.M.; MELANDER, C. Identification of *Staphylococcus aureus* Penicillin Binding Protein 4 (PBP4) Inhibitors. **Antibiotics**, v. 11, n. 10, p. 1351, 2022.

ZHANG, L. L.; YANG, H.; XIAO, H. P.; LU, J. M.; SHA, W.; ZHANG, Q. Determination of in vitro synergy by a checkerboard method when 3 core antimicrobial agents of the retreatment new scheme combined against MDR-MTB and XDR-MTB. **Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi**, v. 39, n. 6, p. 464-468, 2016.

ZHANG, S.; ZHENG, L.; XU, L.; SUN, H.; LI, H.; YAO, J.; LIU, K.; PENG, J. Subchronic toxicity study of the total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit in rats. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 62, p. 221-230, 2012.

ZHU, H.; MARTIN, T.M.; YE, L.; SEDYKH, A.; YOUNG, D.M.; TROPSHA, A. Quantitative Structure–Activity Relationship Modeling of Rat Acute Toxicity by Oral Exposure. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 22, n. 12, p. 1913–1921, 2009.

ZIMMERMANN, S.; KLINGER-STROBEL, M.; BOHNERT, J.A.; WENDLER, S.; RÖDEL, J.; PLETZ, M.W.; LÖFFLER, B.; TUCHSCHERR, L. Clinically Approved Drugs Inhibit the *Staphylococcus aureus* Multidrug NorA Efflux Pump and Reduce Biofilm Formation. **Front. Microbiol.**, v.10, p.1-13, 2019.