UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**Compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com atividade frente à
micro-organismos multirresistentes**
Planejamento, síntese e avaliação da atividade antimicrobiana

Adelson Lopes da Silva Neto

Dissertação para obtenção do Título de
Mestre

Orientador:
Prof. Tit. Dr. **Leoberto Costa Tavares**

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**Compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com atividade frente à
micro-organismos multirresistentes**
Planejamento, síntese e avaliação da atividade antimicrobiana

Adelson Lopes da Silva Neto

Versão Corrigida

São Paulo
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

33586c c	<p>Silva Neto, Adelson Lopes da</p> <p>Compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com atividade frente a micro-organismos multirresistentes: Planejamento, síntese e avaliação da atividade antimicrobiana / Adelson Lopes da Silva Neto. - São Paulo, 2017.</p> <p>301 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Orientador: Tavares, Leoberto Costa</p> <p>1. Fármaco. 2. Planejamento. 3. Química Farmacêutica. 4. Síntese. 5. Química Orgânica. I. T. II. Tavares, Leoberto Costa, orientador.</p>
-------------	---

**Compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com atividade frente à
micro-organismos multirresistentes**

Planejamento, síntese e avaliação da atividade antimicrobiana

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Tit. Dr. Leoberto Costa Tavares
Orientador/Presidente

Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka
1º. Examinador

Prof. Dr. Guilherme Costa Matsutani
2º. Examinador

São Paulo, 1 de Fevereiro de 2017

CERTIFICADO DE DEFESA

Certifico, para os devidos fins, que o(a) Sr(a). **Adelson Lopes da Silva Neto** defendeu em sessão pública no dia 01 de fevereiro de 2017, a dissertação, intitulada: "Compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com atividade frente à micro-organismos multirresistentes Planejamento, síntese e avaliação da atividade antimicrobiana", tendo sido aprovado(a), fazendo jus ao título de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Área: Tecnologia Químico-Farmacêutica.

São Paulo, 01 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

DEDICATÓRIA

Aos meus grandes amores, minha pretinha Sofia e meu branquelo Guilherme.

A minha esposa Vanessa, companheira e amiga.

*Aos meus pais, Cleusa e Ademar, por todo incentivo e apoio incondicional, pela educação,
pelos valores e ensinamentos, por mostrarem sempre o melhor caminho a ser seguido.*

Penetra surdamente no reino das palavras.
Lá estão os poemas que esperam ser escritos.
Estão paralisados, mas não há desespero.
Há calma e frescura na superfície intata.
Ei-los sós e mudos, em estado de dicionário.
Convive com teus poemas, antes de escrevê-los.
Tem paciência, se obscuros. Calma, se te provocam.
Espera que cada um se realize e se consuma.
Com seu poder de palavra.
E seu poder de silêncio.
Não forces o poema a desprender-se do limbo.
Não colhas no chão o poema que se perdeu.
Não adules o poema. Aceita-o.
Como ele aceitará sua forma definitiva e concentrada no espaço.
Chega mais perto e contempla as palavras.
Cada uma tem mil faces secretas sob a face neutra.
E te pergunta, sem interesse pela resposta.
Pobre ou terrível, que lhe deres:
– *Trouxeste a chave?*

Carlos Drummond de Andrade
Procura da Poesia

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Leoberto, pela oportunidade de poder fazer parte do seu grupo de pesquisa, por ter aberto as portas da Universidade de São Paulo para que eu pudesse concretizar mais esta etapa de grande importância para minha formação pessoal e acadêmica. Pela amizade construída ao longo desses quatro anos, pela dedicação, pelo incentivo, pelos puxões de orelha que não foram poucos. Por ter acreditado e não desistido de seu aluno.

À Dra. Fanny Palace Berl, pela amizade construída nesses anos. Pelos ensinamentos desde o primeiro momento em que tive a oportunidade de integrar o grupo de pesquisa do Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos. Por ter compartilhado seus conhecimentos, pela companhia durante a realização das sínteses, que muitas vezes nos fizeram quebrar a cabeça, e também durante os trabalhos microbiológicos. Pelo incentivo, pelas ideias, por olhar de igual para igual. Por ser quem você é, grande pesquisadora e amiga.

Ao Rodrigo Rocha Zorzi, pelos ensinamentos práticos durante o período de integração ao grupo. Pelo tempo dedicado a ensinar parte das técnicas necessárias para realização deste trabalho. Aos amigos Salomão Doria Jorge e Leandro de Sá Bortolozzo, pelas ideias, pelas horas de conversa e descontração em meio ao trabalho.

Ao técnico de laboratório e amigo João Sussumo Murayama, por ter cuidado de tudo para que nos preocupássemos apenas com o andamento das pesquisas. Pelas horas de conversa, pelo apoio moral e incentivo. Aos Alunos de Iniciação Científica do LPDF: Aline, Ana, Carol, Lais e Leonardo. E as amigas e amigos da Pós-Graduação: Ana Rosa, Eleane, Luciana, Danilo e Renan, pela amizade construída.

À Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka, por ter nos cedido gentilmente as bactérias multirresistentes, pela participação no exame de qualificação deste trabalho. Pelas ideias e pela atenção dada sempre que procurada em seu laboratório.

Aos pesquisadores Dr. John Anthony McCulloch e Dra. Lara Mendes de Almeida do Laboratório de Microbiologia Clínica, coordenado pela Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka, por terem feito o repique das cepas multirresistentes para que fossem cedidas para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira e a Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, pela participação na banca de exame de qualificação, pelas ideias e ensinamentos.

Às queridas amigas, Dra. Cristiane Mika Fujii e Dra. Silva Regina dos Santos, do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, por terem cedido as cepas de bactérias ATCC para o nosso laboratório. Pelo empenho em nos ajudar sempre que necessário, com total dedicação em todo os momentos.

Aos Professores da Universidade de Mogi das Cruzes, Prof. Dr. Guilherme Costa Matsutani e Prof. Dr. Marcus Vinicius de Oliveira, por todos ensinamentos durante a Graduação, pela amizade e por terem acreditado em seu aluno ao assinarem as cartas de referência necessárias ao ingresso no Programa de Pós-Graduação da FCF/USP.

Às secretárias do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Miriam, Elza, Rose e Tania pela atenção e solicitude. Ao Irineu e Sueli da Secretária de Pós-Graduação pela atenção e prontidão em nos ajudar sempre que preciso. À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa e auxílio financeiro. À CAPES e a FAPESP pelo suporte financeiro.

RESUMO

SILVA NETO, A. L. **Compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com atividade frente à micro-organismos multirresistentes. Planejamento, síntese e avaliação da atividade antimicrobiana.** 2017. 301f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O surgimento de bactérias multirresistentes é uma ameaça global. Essas bactérias têm sido associadas com infecções hospitalares, no entanto, diversos casos de infecções multirresistentes adquiridas na comunidade vêm sendo relatados, o que acende um alerta quanto a propagação destes micro-organismos para além do ambiente hospitalar. Em todo o mundo, o consumo de antibióticos tem aumentado significativamente tanto nos setores diretamente relacionados à saúde, como também nos setores ligados a produção de alimentos como: agricultura, pecuária, suinocultura e avicultura. Sendo o uso destinado aos cuidados veterinários de animais de corte produtores de alimentos, um dos mais preocupantes atualmente. Aliado ao uso indiscriminado de antibióticos há de se considerar a disseminação de genes de resistência no meio ambiente, principalmente através da água de esgoto não tratado. Além disso, é importante observar a contribuição negativa do descarte irregular de lixo hospitalar, assim como a do descarte de resíduos provenientes dos processos de produção de antibióticos pelas indústrias farmacêuticas. Em conjunto, esses fatores têm contribuído consideravelmente para o surgimento e propagação de novos mecanismos de resistência antimicrobiana. Outro fator preocupante é a velocidade com que estes novos mecanismos de resistência cruzam fronteiras internacionais se disseminando facilmente em todo o mundo. Este fator tem preocupado líderes mundiais, os quais consideram o aparecimento de “superbactérias” um pesadelo, que pode vir a ser em um futuro próximo uma catástrofe mundial. Diante desse quadro preocupante, a necessidade de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para combater essas infecções se torna iminente. Neste contexto, os compostos nitro-heterocíclicos tais como os nitrofurânicos tem se destacado por sua atividade contra bactérias com caráter de multirresistência. Por isto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de novos compostos nitrofurânicos, tendo como composto-protótipo a nifuroxazida. O processo de desenvolvimento das estruturas análogas à nifuroxazida foi realizado a partir do planejamento da série de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos, com base nos parâmetros estabelecidos pela Regra dos 5 de Lipinski, para obtenção de compostos com características farmacocinéticas e farmacodinâmicas que favoreçam a biodisponibilidade, com vistas a administração por via oral. Os ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos foram realizados com base nos testes

quantitativos de sensibilidade a agentes antimicrobianos por método de diluição para bactérias de crescimento aeróbio, norma M07-A9 (2012), e nos métodos de padrões de crescimento para testes de suscetibilidade a antimicrobianos, vigésimo terceiro suplemento informativo, M100-S23 (2013), ambos aprovados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Os resultados obtidos através da avaliação da atividade antimicrobiana demonstraram que do total de 26 compostos sintetizados, 18 (69%) apresentaram atividade antimicrobiana significativa ($\leq 2 \mu\text{M}$) frente *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; 14 (54%) frente *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina; 5 (19%) frente *Staphylococcus aureus* cepa heterogênea com resistência intermediária à vancomicina, hVISA-FCFHV36, sendo esta a cepa mais resistente; 9 (34%) frente *Staphylococcus epidermidis* com perfil de resistência a linezolida; e 9 (34%) frente *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina fenótipo *vanA*. Entre eles o composto c24, 6-amino-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida, apresentou atividade significativa frente a todas cepas, sendo superior a nifuroxazida, NF; nitrofurantoína, NTF; oxacilina, OXA; e vancomicina, VAN; [(*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, c24 – $\text{IC}_{90} = 0.31 \mu\text{M} \pm 0.06$; NF – $\text{IC}_{90} = 2.39 \mu\text{M} \pm 0.08$; NTF – $\text{IC}_{90} = 5.26 \mu\text{M} \pm 0.39$; OXA – $\text{IC}_{90} = 1.14 \mu\text{M} \pm 0.18$; VAN – $\text{IC}_{90} = 0.31 \mu\text{M} \pm 0.06$); (*Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina, c24 – $\text{IC}_{90} = 0.52 \mu\text{M} \pm 0.26$; NF – $\text{IC}_{90} = 5.37 \mu\text{M} \pm 0.67$; NTF – $\text{IC}_{90} = 8.20 \mu\text{M} \pm 1.66$; OXA – $\text{IC}_{90} = \text{s. a.}$; VAN – $\text{IC}_{90} = 0.50 \mu\text{M} \pm 0.20$); (*Staphylococcus aureus* cepa heterogênea com resistência intermediária à vancomicina, hVISA-FCFHV36, c24 – $\text{IC}_{90} = 0.82 \mu\text{M} \pm 0.07$; NF – $\text{IC}_{90} = 7.22 \mu\text{M} \pm 0.29$; NTF – $\text{IC}_{90} = 13.14 \mu\text{M} \pm 0.94$; OXA – $\text{IC}_{90} = \text{s. a.}$; VAN – $\text{IC}_{90} = 0.88 \mu\text{M} \pm 0.05$); (*Staphylococcus epidermidis* com perfil de resistência a linezolida, c24 – $\text{IC}_{90} = 0.74 \mu\text{M} \pm 0.02$; NF – $\text{IC}_{90} = 4.36 \mu\text{M} \pm 0.54$; NTF – $\text{IC}_{90} = 8.46 \mu\text{M} \pm 0.60$; OXA – $\text{IC}_{90} = 12.66 \mu\text{M} \pm 0.36$; VAN – $\text{IC}_{90} = 1.40 \mu\text{M} \pm 0.28$); e (*Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina fenótipo *VanA*, c24 – $\text{IC}_{90} = 0.72 \mu\text{M} \pm 0.02$; NF – $\text{IC}_{90} = 5.09 \mu\text{M} \pm 0.08$; NTF – $\text{IC}_{90} = 9.28 \mu\text{M} \pm 0.32$; OXA – $\text{IC}_{90} = 12.26 \mu\text{M} \pm 0.72$, VAN – $\text{IC}_{90} = \text{s. a.}$)]. Entre as propriedades moleculares de maior influência na atividade do composto c24 estão ClogP e PSA, com grande potencial de aplicação no processo de planejamento de novos derivados nitrofurânicos.

Palavras chave: Infecções hospitalares, bactérias multirresistentes, compostos nitro-heterocíclicos, planejamento de fármacos, síntese, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

SILVA NETO, A. L. **Compounds 5-nitro-2-furfurilidene with activity against multi-drug resistant microorganisms. Design, synthesis and evaluation of antimicrobial activity.** 2017. 301f. Thesis (MA) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2017.

The emergence of multidrug-resistant bacteria is a global threat. These bacteria have been associated with nosocomial infections. However, several cases of community-acquired multidrug-resistant infections have already been identified. Which warns about the spread of these microorganisms beyond the hospital environment. Worldwide, antibiotic consumption has increased significantly both in health-related sectors as well as in food producing sectors, such as agriculture, livestock, pig farming and poultry farming. Being the use of veterinary care of food producing animal, one the most worrisome currently. In addition, it is important to note the negative contribution of irregular disposal of hospital waste, as also the removal of waste from the pharmaceutical industry. Together, these factors are contributing to the emergence and spread of new forms of antimicrobial resistance. Another worrying factor is the speed with which these new forms of resistance cross international borders and spread easily throughout the world. This fact has worried world leaders, who consider the emergence of “superbugs” a nightmare, which may be in the near future to a world catastrophe. Faced with this worrisome context, the need to develop new agents to contain these infections becomes imminent. In this context, the nitroheterocyclic compounds have been highlighting by their activity against multidrug-resistant bacteria. Therefore, this work had the aim of developing new nitrofuran compounds, using the nifuroxazide as the prototype compound. The development of analogous structures of nifuroxazide were carried out from designing of the set of 5-nitro-2-furfurilidene compounds, based on the parameters established by Lipinski's Rule of Five to obtain compounds with pharmacokinetic and pharmacodynamics characteristics that improve bioavailability, focusing on oral administration. The antimicrobial activity evaluation tests of the compounds were carried out based on the *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard-Ninth Edition*, M07-A9 (2012) and *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*, M100-S23 (2013), approved by *Clinical and Laboratory Standards Institute*. The results obtained through the evaluation of the antimicrobial activity showed that of the 26 compounds synthesized, 18 (69%) presented antimicrobial activity $\leq 2 \mu\text{M}$ against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; 14 (54%) against oxacillin-resistant *Staphylococcus*

aureus; 5 (19%) against heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, hVISA–FCFHV36, being this the most resistant strain; 9 (34%) against linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis*; and 9 (34%) against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* *vanA* phenotype. Among them, the most active compound c24, 6-amino-*N'*-((5-nitrofur-2-yl)methylene)-2-naphthohydrazide has significant activity against all strains, being better than nifuroxazide, NF; nitrofurantoin, NTF; oxacillin, OXA; and vancomycin, VAN; [(*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, c24 – IC₉₀ = 0.31 μM ± 0.06; NF – IC₉₀ = 2.39 μM ± 0.08; NTF – IC₉₀ = 5.26 μM ± 0.39; OXA – IC₉₀ = 1.14 μM ± 0.18; VAN – IC₉₀ = 0.31 μM ± 0.06); (oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*, c24 – IC₉₀ = 0.52 μM ± 0.26; NF – IC₉₀ = 5.37 μM ± 0.67; NTF – IC₉₀ = 8.20 μM ± 1.66; OXA – IC₉₀ = s. a.; VAN – IC₉₀ = 0.50 μM ± 0.20); (heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, hVISA–FCFHV36, c24 – IC₉₀ = 0.82 μM ± 0.07; NF – IC₉₀ = 7.22 μM ± 0.29; NTF – IC₉₀ = 13.14 μM ± 0.94; OXA – IC₉₀ = s. a.; VAN – IC₉₀ = 0.88 μM ± 0.05); (linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis*, c24 – IC₉₀ = 0.74 μM ± 0.02; NF – IC₉₀ = 4.36 μM ± 0.54; NTF – IC₉₀ = 8.46 μM ± 0.60; OXA – IC₉₀ = 12.66 μM ± 0.36; VAN – IC₉₀ = 1.40 μM ± 0.28); e (vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* *VanA* phenotype, c24 – IC₉₀ = 0.72 μM ± 0.02; NF – IC₉₀ = 5.09 μM ± 0.08; NTF – IC₉₀ = 9.28 μM ± 0.32; OXA – IC₉₀ = 12.26 μM ± 0.72, VAN – IC₉₀ = s. a.)]. The properties of greatest influence on the activity of compound c24 are ClogP and PSA, with great potential of application in the process to design of new nitrofur-derivatives.

Keywords: nosocomial infections, multi-drug resistant bacteria, nitroheterocyclic compounds, drug-design, synthesis, antimicrobial activity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	A descoberta de novos dos antibióticos e o surgimento de resistência bacteriana	23
1.2	O gênero <i>Staphylococcus</i> spp.....	28
1.3	O gênero <i>Enterococcus</i> spp.....	31
1.4	Mecanismos de resistência bacteriana e os alvos da ação dos antibióticos	35
1.5	Desenvolvimento de novos fármacos.....	39
1.6	Compostos Nitro-Heterocíclicos.....	48
1.7	JUSTIFICATIVA.....	53
2	OBJETIVO	59
2.1	Objetivos específicos	59
2.2	Plano de Trabalho	59
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
3.1	Materiais.....	61
3.1.1	Reagentes.....	61
3.1.2	Solventes.....	62
3.1.3	Meios de Cultivo.....	62
3.1.4	Softwares	63
3.2	Bactérias.....	64
3.3	MÉTODOS	64
3.3.1	Síntese dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.....	64
3.3.2	Síntese de hidrazidas substituídas.....	65
3.3.3	Síntese de bases de Schiff.....	66
3.4	Identificação dos compostos sintetizados	66
3.5	Preparo das soluções dos compostos e fármacos de referência	67
3.6	Ensaio microbiológicos de avaliação da atividade antimicrobiana	68
3.7	Microdiluição dos compostos e preparo do branco analítico.....	69
3.8	Preparo do inóculo e adição as microplacas com compostos previamente microdiluídos	70
3.9	Determinação da atividade antimicrobiana	72
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1	Planejamento da série de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos	75

4.2	Síntese dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos	83
4.3	Síntese e identificação das hidrazidas substituídas	83
4.4	Síntese e identificação de bases de Schiff.....	85
4.5	Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	100
4.6	Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos frente à <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina	107
4.7	Avaliação dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos frente à <i>Staphylococcus aureus</i> heterogênea com resistência intermediária à vancomicina hVISA-FCFHV36.....	120
4.8	Atividade antimicrobiana dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente	128
4.9	Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos frente à <i>Enterococcus faecalis</i> fenótipo <i>vanA</i>	136
5	CONCLUSÕES.....	147
	REFERÊNCIAS.....	149
ANEXO 1	Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN ^1H e ^{13}C).....	160
ANEXO 2	Espectros de Correlação Heteronuclear de Carbono e Hidrogênio - HETCOR.....	188
ANEXO 3	Gráficos de Dispersão dos Parâmetros de Lipinski. Descritores Moleculares x Compostos.....	198
ANEXO 4	Gráficos de Dispersão dos Parâmetros de Lipinski. Inibição do Crescimento (IC_{90}) x Descritor Molecular. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	200
ANEXO 5	Gráficos de Dispersão dos Parâmetros de Lipinski. Inibição do Crescimento (IC_{90}) x Descritor Molecular. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina.....	202
ANEXO 6	Gráficos de Dispersão dos Parâmetros de Lipinski. Inibição do Crescimento (IC_{90}) x Descritor Molecular. <i>Staphylococcus aureus</i> cepa heterogênea com resistência intermediária à vancomicina hVISA-FCFHV36.....	204
ANEXO 7	Gráficos de Dispersão dos Parâmetros de Lipinski. Inibição do Crescimento (IC_{90}) x Descritor Molecular. <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente.....	206
ANEXO 8	Gráficos de Dispersão dos Parâmetros de Lipinski. Inibição do Crescimento (IC_{90}) x Descritor Molecular. <i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina fenótipo <i>vanA</i>	208
ANEXO 9	Curvas Dose-Resposta <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	216

ANEXO 10	Curvas Dose-Resposta. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina.....	226
ANEXO 11	Curvas Dose-Resposta. <i>Staphylococcus aureus</i> heterogênea com resistência intermediária à vancomicina.....	242
ANEXO 12	Curvas Dose-Resposta. <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente.....	258
ANEXO 13	Curvas Dose-Resposta. <i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina fenótipo <i>vanA</i>	274
ANEXO 14	Curvas Dose-Resposta. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213. Trabalho de Conclusão de Curso. Ana Carolina Hahns.....	290

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fármacos antimicrobianos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) no período de 1980 a 2012	24
Figura 2.	Linha do tempo da introdução de novos antibióticos em relação ao surgimento de resistência bacteriana.....	25
Figura 3.	Micrografia Eletrônica de Varredura de <i>Staphylococcus aureus</i> aumentada em 10.000x.....	28
Figura 4.	Estrutura e composição de parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	30
Figura 5.	Micrografia Eletrônica de Varredura de <i>Enterococcus faecalis</i> aumentada em 10.000x.....	32
Figura 6.	Mecanismos de resistência bacteriana.....	37
Figura 7.	Alvos moleculares da ação dos antibióticos.....	38
Figura 8.	Estrutura química da sildenafila (Viagra® – Pfizer).....	41
Figura 9.	Estrutura química do rofecoxibe (Vioxx® – Merck).	41
Figura 10.	Fases do desenvolvimento de novos fármacos.....	42
Figura 11.	Ranking dos 15 medicamentos mais vendidos em 2016.....	44
Figura 12.	10 maiores companhias farmacêuticas em 2016.....	45
Figura 13.	Fármacos nitrofurânicos usados na terapia antiparasitária e antimicrobiana.....	49
Figura 14.	Atividade antimicrobiana de compostos com estrutura azometínica e oxadiazolínica com e sem a presença do grupo nitro.	50
Figura 15.	Compostos análogos a nifuroxazida desenvolvidos pelo grupo Tavares e colaboradores.....	52
Figura 16.	Linha do tempo da descoberta de novos fármacos antimicrobianos.....	54
Figura 17.	Mortes anuais atribuídas a resistência a antibióticos	57
Figura 18.	Fluxograma das principais etapas experimentais do plano de trabalho.	60
Figura 19.	Etapas da rota sintética para obtenção dos compostos planejados.....	65
Figura 20.	Rota de síntese das hidrazidas substituídas	65
Figura 21.	Rota de síntese das bases de Schiff	66
Figura 22.	Esquema representativo das etapas que compõe o processo de síntese e preparo das soluções estoque dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.....	67

Figura 23.	Esquema representativo das etapas de cultivo e preservação das cepas de bactérias multirresistentes.....	69
Figura 24.	Esquema representativo das etapas de microdiluição dos compostos e preparo do branco analítico em microplacas de fundo chato	70
Figura 25.	Esquema geral das etapas realizadas durante o ensaio de avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos frente as cepas multirresistentes.	71
Figura 26.	Esquema representativo das concentrações finais dos compostos e fármacos de referência após adição do inóculo as microplacas.....	72
Figura 27.	Curva dose-resposta e condições de ajuste (OriginPro 9).....	73
Figura 28.	Esquema representativo das etapas de análise estatística dos resultados	74
Figura 29.	Estrutura química da nifuroxazida. Em destaque a ligação imina característica de bases de Schiff.....	75
Figura 30.	Estrutura química dos grupos substituintes dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.	77
Figura 31.	Gráficos de dispersão dos descritores moleculares considerados no planejamento dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos	80
Figura 32.	Composto c22 (<i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida)	81
Figura 33.	Estrutura do composto c22 (<i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida). R15: posição dos grupos substituintes.....	82
Figura 34.	Diagrama de Craig.....	82
Figura 35.	Mecanismo de esterificação de Fisher (adaptado de MARCH, 2001).....	84
Figura 36.	Mecanismo de reação de hidrazinólise (adaptado de MARCH, 2001).	85
Figura 37.	Mecanismo de obtenção das bases de Schiff (adaptado de MARCH, 2001).	86
Figura 38.	Esquema reacional da síntese do composto com grupo substituinte ciano.	87
Figura 39.	Espectro de RMN ¹ H do composto c7: 2-ciano- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida. Em destaque os picos de impureza.....	88
Figura 40.	Espectro de RMN ¹ H do composto c7: 2-ciano- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida sintetizado com a hidrazida recristalizada.....	89
Figura 41.	Espectro de RMN de ¹³ C do composto c7: : 2-ciano- <i>N'</i> -((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida sintetizado com a hidrazida recristalizada.....	90
Figura 42.	Esquema reacional da síntese do éster 6-amino-2-naftoato de metila.	91
Figura 43.	Espectro de RMN ¹ H e ¹³ C do intermediário éster 6-amino-2-naftoato de metila..	92

Figura 44.	Esquema reacional da síntese da hidrazida substituída 6-amino-2-naftohidrazida.	93
Figura 45.	Espectros de RMN ^1H e ^{13}C da hidrazida substituída 6-amino-2-naftoidrazida.	94
Figura 46.	Esquema reacional da síntese da base de Schiff do composto c24.	95
Figura 47.	Espectro de RMN ^1H da base de Schiff do composto c24.	96
Figura 48.	Espectro de RMN ^{13}C da base de Schiff do composto c24.	97
Figura 49.	Atividade Antimicrobiana dos compostos c1, c2, c3 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	102
Figura 50.	Atividade antimicrobiana dos compostos c4 e c5 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	102
Figura 51.	Atividade antimicrobiana dos compostos c8, c9 e c10 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	102
Figura 52.	Atividade antimicrobiana dos compostos c11 e c12 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	103
Figura 53.	Atividade antimicrobiana dos compostos c13 e c14 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	103
Figura 54.	Atividade antimicrobiana dos compostos c16 e c17 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	103
Figura 55.	Atividade antimicrobiana dos compostos c18 e c19 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	104
Figura 56.	Atividade antimicrobiana dos compostos c5, c20 e c21 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	104
Figura 57.	Atividade antimicrobiana dos compostos com variação estruturais do grupo naftaleno frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	106
Figura 58.	Atividade antimicrobiana dos fármacos de referência frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	106
Figura 59.	Mecanismo de hidrólise catalisado pelas β -lactamases.	110
Figura 60.	Comparação das estruturas e das composições das paredes celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativa.	110
Figura 61.	Estrutura química da meticilina.	111
Figura 62.	Estruturas químicas da benzilpenicilina e oxacilina.	111
Figura 63.	Atividade antimicrobiana dos compostos c1, c2 e c3 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina.	113

Figura 64.	Atividade antimicrobiana dos compostos c4 e c5 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina.	113
Figura 65.	Atividade antimicrobiana dos compostos c6, c7 e c15 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina.....	114
Figura 66.	Atividade antimicrobiana dos compostos c8, c9 e c10 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina.....	114
Figura 67.	Atividade antimicrobiana dos compostos c11 e c12 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina.....	114
Figura 68.	Atividade antimicrobiana dos compostos c13 e c14 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina.....	115
Figura 69.	Atividade antimicrobiana dos compostos c16 e c17 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina.....	115
Figura 70.	Atividade antimicrobiana dos compostos c18 e c19 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina.	116
Figura 71.	Atividade antimicrobiana dos compostos c20 e c21 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina.....	116
Figura 72.	Atividade antimicrobiana dos compostos com variação estruturais do grupo naftaleno frente à <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina.....	117
Figura 73.	Gráficos de dispersão das propriedades moleculares mais relevantes na atividade do composto c24.....	118
Figura 74.	Atividade antimicrobiana dos fármacos de referência frente à <i>Staphylococcus aureus</i> resistente oxacilina.	119
Figura 75.	Atividade antimicrobiana dos compostos c1, c2, e c3 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> hVISA–FCFHV36.....	122
Figura 76.	Atividade antimicrobiana dos compostos c4 e c5 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> hVISA–FCFHV36.....	122
Figura 77.	Atividade antimicrobiana dos compostos c6, c7 e c15 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> hVISA–FCFHV36.....	122
Figura 78.	Atividade antimicrobiana dos compostos c8, c9 e c10 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> hVISA–FCFHV36.....	123
Figura 79.	Atividade antimicrobiana dos compostos c11 e c2 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> hVISA–FCFHV36.....	123
Figura 80.	Atividade antimicrobiana dos compostos c13 e c13 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> hVISA–FCFHV36.....	123

Figura 81.	Atividade antimicrobiana dos compostos c16 e c17 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> hVISA–FCFHV36.....	124
Figura 82.	Atividade antimicrobiana dos compostos c18 e c19 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> hVISA–FCFHV36.....	124
Figura 83.	Atividade antimicrobiana dos compostos c20 e c21 frente à <i>Staphylococcus aureus</i> hVISA–FCFHV36.....	125
Figura 84.	Atividade antimicrobiana dos compostos com variações estruturais do grupo naftaleno frente <i>Staphylococcus aureus</i> hVISA–FCFHV36.....	126
Figura 85.	Atividade antimicrobiana dos fármacos de referência frente à <i>Staphylococcus aureus</i> hVISA– FCFHV36.....	127
Figura 86.	Estrutura química da linezolida.....	129
Figura 87.	Estrutura química do cloranfenicol e flofenicol.....	129
Figura 88.	Atividade antimicrobiana dos compostos c1, c2 e c3 frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente.....	130
Figura 89.	Atividade antimicrobiana dos compostos c4 e c5 frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente.....	131
Figura 90.	Atividade antimicrobiana dos compostos c6, c7 e c15 frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente.....	131
Figura 91.	Atividade antimicrobiana dos compostos c8, c9 e c10 frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente.....	131
Figura 92.	Atividade antimicrobiana dos compostos c11 e c12 frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente.....	132
Figura 93.	Atividade antimicrobiana dos compostos c13 e c14 frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente.....	132
Figura 94.	Atividade antimicrobiana dos compostos c16 e c17 frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente.....	133
Figura 95.	Atividade antimicrobiana dos compostos c18 e c19 frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente.....	133
Figura 96.	Atividade antimicrobiana dos compostos c20 e c21 frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente.....	133
Figura 97.	Atividade antimicrobiana dos compostos com variações estruturais do grupo naftaleno frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente.....	134
Figura 98.	Atividade antimicrobiana dos fármacos de referência frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente.....	135

Figura 99.	Estrutura química da vancomicina	137
Figura 100.	Atividade antimicrobiana dos compostos c1, c2 e c3 frente à <i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina.	139
Figura 101.	Atividade antimicrobiana dos compostos c4 e c5 frente à <i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina.....	139
Figura 102.	Atividade antimicrobiana dos compostos c6, c7 e c15 frente à <i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina.	139
Figura 103.	Atividade antimicrobiana dos compostos c8, c9 e c10 frente à <i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina.	140
Figura 104.	Atividade antimicrobiana dos compostos c11 e c12 frente à <i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina.....	140
Figura 105.	Atividade antimicrobiana dos compostos c13 e c14 frente à <i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina.....	141
Figura 106.	Atividade antimicrobiana dos compostos c16 e c17 frente à <i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina.....	141
Figura 107.	Atividade antimicrobiana dos compostos c18 e c19 frente à <i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina.....	141
Figura 108.	Atividade antimicrobiana dos compostos c20 e c21 frente à <i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina.....	142
Figura 109.	Atividade antimicrobiana dos compostos com variações estruturais do grupo naftaleno frente <i>Enterococcus faecalis</i> fenótipo <i>vanA</i>	144
Figura 110.	Atividade antimicrobiana dos fármacos de referência frente <i>Enterococcus faecalis</i> fenótipo <i>vanA</i>	144
Figura 111.	Frequência e distribuição dos compostos mais ativos frente a cepas de bactérias multirresistentes.....	145
Figura 112.	Mapas de potencial lipofílico da nifuroxazida, e dos compostos c22 e c24. (SYBYL-X [®] Drug Design and Discovery Software Suite).....	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa de casos de morbidade e mortalidade relacionados a micro-organismos causadores de infecções hospitalares com caráter de multirresistência	26
Tabela 2. Descritores moleculares considerados no planejamento da série de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos	78
Tabela 3. Dados experimentais dos compostos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos: rendimento, faixa de fusão e massa molar	98
Tabela 4. Análise elementar dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos	100
Tabela 5. Sensibilidade antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	101
Tabela 6. Atividade antimicrobiana frente <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	107
Tabela 7. Sensibilidade antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina..	112
Tabela 8. Comparação dos valores das propriedades moleculares dos compostos c22 e c24... ..	117
Tabela 9. Comparação dos valores das propriedades moleculares da nifuroxazida e dos compostos c24 e c21	119
Tabela 10. Atividade antimicrobiana dos compostos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à oxacilina.....	120
Tabela 11. Sensibilidade antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> heterogênea com resistência intermediária à vancomicina (FCFHV36)	121
Tabela 12. Atividade antimicrobiana frente a cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> heterogênea com resistência intermediária à vancomicina hVISA–FCFHV36.....	127
Tabela 13. Sensibilidade antimicrobiana de <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente ..	130
Tabela 14. Atividade antimicrobiana dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> multirresistente.....	135
Tabela 15. Sensibilidade antimicrobiana de <i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina fenótipo <i>vanA</i>	138
Tabela 16. Atividade antimicrobiana dos compostos frente à <i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina fenótipo <i>vanA</i>	143
Tabela 17. Resumo dos valores médios de atividade antimicrobiana dos compostos (IC ₉₀ µM) frente as cepas de bactérias multirresistentes	146

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
μL	Micro-Litro
μM	Micro-Molar
AmpC	β-Lactamase Cromossômica Classe C
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	Center for Disease Control and Prevention (Centro de controle e prevenção de doenças)
CHN	Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio
ClogP	Logaritmo do Coeficiente de Partição Calculado
D.O.	Densidade Óptica
DMF	<i>N, N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO _{d6}	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
ESBLs	Extended-Spectrum β-Lactamases (β-Lactamases de espectro ampliado)
Gene <i>mcr-1</i>	<i>Plasmid-Mediated Colistin Resistance-1</i> (Resistência à colistina mediada por plasmídeo-1)
HBA	Hydrogen Bond Acceptors (Aceptores de ligação de hidrogênio)
HBD	Hydrogen Bond Donors (Doadores de ligação de hidrogênio)
HIV	Human Deficiency Virus (Virus da imunodeficiência humana)
IRAS	Infeções Relacionadas à Assistência à Saúde
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LBDD	Ligand-Based Drug Design (Planejamento de fármaco baseado na estrutura do ligante)
MDR	Multi-Drug Resistant
MH	Mueller Hinton II Broth Cation Adjusted (Caldo Mueller Hinton 2 com ajuste de cátions)
MHz	Mega-Hertz
MIC	Minimum Inhibitory Concentration (Concentração inibitória mínima)
mL	Mili-Litro

MLST	Multilocus Sequence typing (Análise de sequência multilocus)
MM	Molar Mass (Massa molar)
mmol	Mili-mol
MR	Molar Refractivity (Refratividade Molar)
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina)
MβL	Metalo-β-Lactamase
NDM	New Dehli Metalobetalactamase
nm	Nanometro
PBP	Penicillin-Binding Protein (Proteína de ligação a penicilina)
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PD&I	Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
PDR	Pan-Drug Resistant
PFGE	Pulsed Field Gel Eletrophoresis (Eletroforese de campo pulsado)
ppm	Partes por milhão
PSA	Polar Surface Area (Área de superfície polar)
PVL	Panton-Valentine Leukocidin (Leucocidina Panton-Valentine)
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMNS ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
SCC _{mec}	Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i> (Cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i>)
TMS	Tetrametilsilano
TNF	Tumoral Necrosis Factor (Fator de necrose tumoral)
TSB	Trypticase Soy Broth (Caldo triptona de soja)
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (Toxina 1 da síndrome do choque endotóxico)
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV/VIS	Espectrometria de Absorção Ultravioleta/Visível
VRE	Vancomycin-Resistant Enterococci (Enterococos resistente à vancomicina)
XDR	Extensively-Drug Resistant
δ	Delta, letra Grega que representa o deslocamento químico em RMN
λ	Lambda, letra Grega que representa o comprimento de onda na Ciência Física
π	Pi, letra Grega que representa a constante de hidrofobicidade de Hansch
σ	Sigma, letra Grega que representa a constante de efeito eletrônico de Hammett

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) também chamadas de infecções hospitalares, causadas por bactérias multirresistentes tem se tornado um grave problema de Saúde Pública e sua incidência tem implicações de caráter social, ético e jurídico (SANTOS *et al.*, 2008) e, portanto, merece atenção dos órgãos governamentais e, principalmente, dos profissionais de saúde, os quais têm responsabilidade direta na prevenção e controle das infecções (SOUSA *et al.*, 2008).

No Brasil, conforme definido pelo Ministério da Saúde na Portaria n° 2.616, de 12 de Maio de 1998, IRAS são “infecções adquiridas 48 horas após a admissão do paciente na unidade hospitalar e que se manifestam durante a internação ou após a alta, quando puderem ser relacionadas com a internação ou procedimentos hospitalares”. Está mesma Portaria determina a criação da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, a qual é composta por representantes das áreas de medicina, enfermagem, farmácia, biomedicina e administração, e visa prevenir a incidência de infecções através de vigilância epidemiológica, assim como avaliar a eficácia das mesmas.

As IRAS afetam pacientes de todas faixas etárias, no entanto, os mais afetados são os extremos de idade como recém-nascidos (BRITO *et al.*, 2010; PORTO *et al.*, 2012) e idosos acima dos 60 anos (VILLAS BÔAS, RUIZ, 2004; IZAIAS *et al.*, 2014). Em recém-nascidos as infecções mais frequentes são infecções sanguíneas relacionadas ao uso de cateter venoso (45-50%), seguida de infecções respiratórias associadas à ventilação mecânica e uso de sonda nasogástrica (16-30%) e, infecções do trato urinário (8-18%). Entre os fatores de risco estão baixa idade gestacional e baixo peso (BRITO *et al.*, 2010). Nos idosos, os locais infecciosos mais frequentes são o trato respiratório (58,1%), trato urinário (28,6%) e infecção de regiões pós-cirúrgica (4,6%) (IZAIAS *et al.*, 2014).

Atualmente esse quadro tem piorado devido ao surgimento de micro-organismos resistentes a todos os fármacos antimicrobianos disponíveis na terapêutica, com destaque para as bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (LUTZ, BARTH, 2006; GELATTI *et al.*, 2009; CONCEIÇÃO *et al.*, 2010).

Cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) são responsáveis por grande incidência de infecções, com destaque para infecções na pele, no tecido subcutâneo em decorrência de cirurgias, osteomielites,

pneumonias, endocardites e bacteremia. Por fazer parte da microbiota da pele, não é incomum a ocorrência de infecções quando há quebra da barreira cutânea ou diminuição da imunidade dos pacientes (GELATTI *et al.*, 2009).

Quanto à resistência aos glicopeptídeos é importante ressaltar que esta está associada aos enterococos que possuem fenótipo do tipo *vanA* enterococos resistentes à vancomicina (VRE, Vancomycin-Resistant Enterococci), sendo este o mais prevalente no Brasil. Cepas com este fenótipo expressam níveis elevados de resistência à vancomicina e teicoplanina (CONCEIÇÃO *et al.*, 2010).

Entre as bactérias Gram-negativas destacam-se a *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e a *Klebsiella pneumoniae*, que frequentemente apresentam resistência aos antibióticos pertencentes à classe dos β -lactâmicos, tais como as penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas e monobactamas (LIMA *et al.*, 2008; TAKAGI *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2011).

Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* também têm se tornado preocupantes devido ao aumento da resistência aos antibióticos β -lactâmicos, o que resulta da presença da enzima metalo- β -lactamase, a qual confere resistência às cefalosporinas de 3ª geração. Essa preocupação também se deve ao fato de que estes micro-organismos são responsáveis por grande parte das infecções do trato respiratório, atualmente, prevalente em pacientes internados em unidades de terapia intensiva, com uso de facilitadores ou indutores mecânicos de respiração (LARANJEIRA *et al.*, 2010).

Recentemente as atenções têm se voltado às cepas de *Klebsiella pneumoniae*, uma vez que esse patógeno é capaz de produzir uma série de enzimas, como β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs, *Extended-Spectrum β -Lactamases*), carbapenemase (KPC, *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*), assim como metalo- β -lactamase (MBL) e β -lactamase cromossômica classe C (AmpC), o que diminui sobremaneira a eficácia do tratamento antibioticoterapêutico, principalmente de pacientes imunocomprometidos (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Considerando ainda a produção de enzimas como mecanismo de resistência mais comum, se não o principal entre bactérias multirresistentes, é importante observar que, desde 2009, ano em que foi identificada em amostras de *Klebsiella pneumoniae*, o tipo de resistência denominada Nova Dehli Metalobetalactamase (NDM, *New Dehli Metalobetalactamase*) de um paciente que vivia na Suécia mas que havia sido hospitalizado na Índia, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem alertado para uma possível disseminação deste tipo

resistência entre as enterobactérias na América Latina (ANVISA, 2011, 2013). Além de bactérias resistentes, fungos do gênero *Candida* spp. também causam infecções hospitalares. Este gênero compreende cerca de 200 espécies das quais aproximadamente 10% são responsáveis por infecções em humanos (CASTRO *et al.*, 2006; MALUCHE, SANTOS, 2008; BARBEDO, SGARBI, 2010). Em meio a toda diversidade do gênero *Candida* spp., a espécie *albicans* é a de maior prevalência e atinge desde pacientes com câncer, idosos, recém-nascidos, e principalmente pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), visto que esta também é uma doença infectocontagiosa sexualmente transmissível (MALUCHE, SANTOS, 2008; BARBEDO, SGARBI, 2010; ANWAR, MALIK, SUBHAN, 2012).

1.1 A descoberta de novos dos antibióticos e o surgimento de resistência bacteriana

A descoberta dos primeiros antibióticos teve início em 1910 com a descoberta do salvarsan, usado no tratamento da sífilis, o qual foi desenvolvido por Paul Ehrlich, considerado pai da quimioterapia e responsável pelos conceitos primários de que uma substância química em concentrações toleráveis pelo hospedeiro poderia ser utilizada contra infecções causadas por micro-organismos. Entretanto, o grande marco no tratamento de infecções bacterianas ocorreu em 1928, com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming. Após a introdução da penicilina na terapêutica, em 1940, período da Segunda Guerra Mundial, novos antibióticos foram descobertos e outros sintetizados a partir de estruturas conhecidas (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

De 1940 a 1960, foram descobertos alguns antibióticos através de triagem de produtos naturais, os quais em sua maioria são eficazes contra bactérias Gram-positivas. Entre eles estão a cefalosporina (β -lactâmico), estreptomicina (aminoglicosídeo), clortetraciclina (tetraciclina), eritromicina (macrolídeo), vancomicina (glicopeptídeo) e outros como cloranfenicol, clindamicina e polimixina B (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

A partir de 1960, foram introduzidos os primeiros antibióticos de origem semi-sintética, com atividade contra Gram-positivos e Gram-negativos. A maioria desses foi obtida a partir de protótipos β -lactâmicos da penicilina, da cefalosporina, do ácido clavulânico e do aztreonam, bem como de análogos da tetraciclina e aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina e amicacina). Na metade da década de 1980 desenvolveram-se as primeiras fluorquinolonas a partir do ácido nalidíxico e, já na década de 1990, pouco antes da introdução da linezolida no

mercado em 2000, pode-se notar uma diminuição na identificação e introdução de novos antibióticos na (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010; CHOPRA, 2013).

Figura 1. Fármacos antimicrobianos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) no período de 1980 a 2012. (Fonte: Adaptado de U. S. Department of Health and Human Services. Center for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013).

Apesar do desenvolvimento de fármacos antimicrobianos ter revolucionado o tratamento médico de infecções bacterianas, reduzindo consideravelmente a morbidade e mortalidade, o uso inadequado dos antimicrobianos fez com que micro-organismos, que antes causavam infecções facilmente tratáveis, desenvolvessem mecanismos de resistência e, em alguns casos, apresentassem resistência a vários antimicrobianos (SILVEIRA *et al.*, 2006).

É importante observar que, mesmo antes da introdução da penicilina na terapêutica, enquanto testes eram realizados, já eram encontradas cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a sua ação e, ao longo dos anos, outras bactérias desenvolveram mecanismos de resistência e um curto espaço de tempo, **Figura 2**, (CDC, 2013). O aumento expressivo da resistência antimicrobiana tem reduzido drasticamente a eficácia do tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, o que dificulta o tratamento, principalmente de pacientes vulneráveis, resultando no prolongamento do tempo de internação e no aumento dos índices de mortalidade.

Introdução do antibiótico

Resistência Identificada

Figura 2. Linha do tempo da introdução de novos antibióticos em relação ao surgimento de resistência bacteriana. **R:** Resistente; **PDR:** Pan-Drug Resistant; **XDR:** Extensively Drug Resistant Adaptado de U.S Department of Health and Human Services. Center for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013.

Tabela 1. Estimativa de casos de morbidade e mortalidade relacionados a micro-organismos causadores de infecções hospitalares com caráter de multirresistência

Micro-organismo	Tipo de infecção	Resistência	Estimativa anual do número de casos	Estimativa anual do número de mortes
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Pneumonia Infecção sanguínea	Multirresistente	7.300	500
<i>Candida</i> sp.	Candidíase	Antifúngicos azólicos Anfotericina B	3.400	220
<i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus faecalis</i> (VRE)	Infecção do trato urinário Infecção sanguínea	Vancomicina	20.000	1.300
<i>Klebsiella</i> e <i>E. coli</i> (CRE)	Infecção sanguínea	Carbapenemas	9.300	610
<i>Klebsiella</i> e <i>E. coli</i> (ESBLs)	Infecção sanguínea	Penicilinas Cefalosporinas Carbapenemas	26.000	1.700
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose	Isoniazida Rifampicina Amicacina	1.042	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infecção cirúrgica Infecção sanguínea Infecção do trato urinário	Aminoglicosídeos Carbapenemas Cefalosporinas Fluorquinolonas	6.700	440
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Infecções de pele Pneumonia Infecção sanguínea	Meticilina Oxacilina Cefalosporinas	80.000	11.000

Fonte: Adaptado de U. S. Department of Health and Human Services. Center for Disease Control and Prevention. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013.**

A resistência antimicrobiana atinge não somente a saúde, mas também os custos relacionados ao setor. Estima-se que o custo anual com tratamento antimicrobiano para o sistema de saúde dos Estados Unidos seja de aproximadamente US\$ 34 milhões de dólares, acompanhado por um custo adicional de mais US\$ 8 milhões em razão de infecções hospitalares (WHO, 2014). No Brasil, a taxa de incidência de IRAS é de aproximadamente 15%, no entanto não existem dados concretos sobre os custos gerados para o sistema único saúde (PADOVEZE, FORTALEZA, 2014).

É importante notar que entre os micro-organismos apresentados na **Tabela 1**, o *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) é responsável por cerca de 80.000 casos de infecções e 11.000 mortes anuais. O número crescente de infecções causadas por este micro-organismo é apontado por alguns autores como consequência do aumento do uso de vancomicina em pacientes hospitalizados (WATKINS, LEMONOVICH, FILE, 2012). A vancomicina é um antibiótico glicopeptídeo que inibe a síntese de parede celular e, que muitas

vezes é utilizado no tratamento de infecções graves. Em decorrência do uso extensivo vêm sendo observado que a concentração inibitória mínima utilizada em alguns casos é maior que o limite preconizado, que fica entre 2 e 4 µg/mL (WATKINS, LEMONOVICH, FILE, 2012).

No caso dos enterococos resistentes à vancomicina, a diminuição da suscetibilidade ou aumento da resistência aos antibióticos é mediada pelo operon *vanA* (WATKINS, LEMONOVICH, FILE, 2012). Bem como pela produção de proteínas de ligação à penicilina do tipo PBP2a em cepas MRSA, o que reduz a afinidade ou interação da meticilina e de outros antibióticos β-lactâmicos com o seu local de ligação (DODDS, HAWKET, 2009).

Aprovada pelo FDA em 2000, a linezolida (Zyvox® – Pfizer) é um fármaco membro da família da oxazolidinona, que vêm sendo utilizada como alternativa no tratamento de infecções causadas por cepas MRSA adquiridas tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade, no entanto, outras bactérias como *Staphylococcus epidermidis* tem demonstrado resistência adquirida a sua ação, principalmente nos casos de paciente internados por longo período de tempo (DODDS, HAWKET, 2009; PLETZ, BURKHARDT, WELTE, 2010; WATKINS, LEMONOVICH, FILE, 2012).

Nos últimos anos as estratégias usadas na descoberta de novos antimicrobianos, como triagem virtual e as ferramentas genômicas ou biotecnológicas não levaram à identificação de um número considerável de moléculas promissoras (MOELLERING JR, 2011). Além da dificuldade em desenvolver moléculas mais seletivas e menos tóxicas, outros fatores têm contribuído para que um número cada vez menor de novos antimicrobianos sejam desenvolvidos. Entre estes fatores estão a utilização de medicamentos genéricos como linha de primeira escolha pelas autoridades de saúde pública, o tempo limitado da terapia antimicrobiana, que difere do tratamento de doenças crônico-degenerativas que obrigam o paciente a consumir continuamente o medicamento, e por fim, o grau de exigência das agências reguladoras quanto ao processo de testes durante as fases clínicas do desenvolvimento (PROJAN, 2003; MOELLERING JR, 2011). Essa somatória de fatores tem desestimulado as grandes companhias farmacêuticas a manter programas de pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, e isto, tem reduzido substancialmente as possibilidades terapêuticas capazes de conter o avanço de micro-organismos com mecanismos de resistência que as tornam potencialmente letais.

1.2 O gênero *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus são cocos esféricos Gram-positivos que possuem cerca de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro. São imóveis e capazes de crescer em condições aeróbias e anaeróbias, suportam concentrações elevadas de sal, algo em torno de 10% de cloreto de sódio, além de sobreviverem a temperaturas que podem variar entre 18 e 40 °C (KONEMAN *et al.*, 2008; TRABULSI, ALTERTHUM, 2008; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014).

Figura 3. Micrografia Eletrônica de Varredura de *Staphylococcus aureus* aumentada em 10.000x.
Foto: Janice Haney Car (Center for Disease Control and Prevention, CDC).

O gênero é composto por 45 espécies e 24 subespécies, sendo que algumas destas fazem parte da microbiota natural, sendo encontradas em locais específicos, como por exemplo o *Staphylococcus aureus* que coloniza as narinas, *Staphylococcus capitis* são encontrados em regiões com grande número de glândulas sebáceas (ex.: testa), *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus hominis* que são encontradas nas axilas, assim como *Staphylococcus epidermidis* (KONEMAN *et al.*, 2008; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014).

Os estafilococos são bactérias de grande importância clínica, uma vez que são responsáveis por diversas doenças sistêmicas difíceis de serem tratadas, que afetam a pele, tecidos moles, ossos, trato urinário e outras infecções oportunistas. Dentro do gênero, as espécies mais comumente relacionadas as doenças são *Staphylococcus aureus*, sendo este o membro mais virulento e prevalente do gênero. *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus saprophyticus* também são

espécies de importância clínica (TRABULSI, ALTERTHUM, 2008; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014).

Staphylococcus aureus é conhecido por causar várias infecções graves em pacientes hospitalizados, ou seja, infecções relacionadas a assistência à saúde, mas também causa infecções comunitárias, isto é, fora do ambiente hospitalar. O nome “aureus” da espécie é devido a coloração amarelo ouro, resultado da expressão de pigmentos carotenoides que se formam durante seu crescimento. Esta espécie produz ainda a enzima coagulase que é encontrada em humanos e que também é utilizada como teste diagnóstico. Uma vez que uma colônia é suspensa do plasma, a coagulase se liga a um fator sérico, o qual converte fibrinogênio em fibrina, resultando na formação de coagulo. As espécies que não possuem esta característica são denominadas estafilococos coagulase negativas (TRABULSI, ALTERTHUM, 2008; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014).

Sob o aspecto fisiológico e estrutural os estafilococos são cobertos por uma camada cápsula polissacarídica, dos quais já são conhecidos 11 sorotipos capsulares. Destes os sorotipos 1 e 2 apresentam cápsulas espessas e suas colônias têm aparência mucóide, no entanto, são pouco associados a patogenias humanas. Por outro lado, os sorotipos mais relacionados com as patogenias são o 5 e o 8. A cápsula polissacarídica se constitui como um mecanismo de defesa bacteriano que impede a fagocitose do micro-organismo pelos leucócitos polimorfonucleares (KONEMAN *et al.*, 2008; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014).

A maioria das bactérias do gênero são capazes de produzir biofilme, o qual é constituído de monossacarídeos, proteínas e pequenos peptídeos. Este por sua vez é responsável pela fixação dessas bactérias em tecidos, equipamentos médico/hospitalares como cateteres, próteses, sondas e quaisquer outros materiais que possam ser contaminados, sendo este um importante mecanismo de resistência (KONEMAN *et al.*, 2008; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014).

Assim como as demais bactérias Gram-positivas, os estafilococos são constituídos de uma camada considerável de peptídeoglicano, o qual é formado por cadeias de glicano contruídas por cerca de 10 a 12 subunidades alternadas de ácido *N*-acetilmurâmico e *N*-acetilglicosamina. As subunidades de ácido *N*-acetilmurâmico são ligadas as cadeias laterais de oligopeptídeos e, em seguida, são unidas por ligações cruzadas através pontes de pentaglicina entre L-lisina de cadeia oligopeptídica e a D-alanina da cadeia adjacente. Ao contrário das bactérias Gram-negativas, o peptídeoglicano das Gram-positivas é formado por várias camadas de ligações cruzadas, o que torna a parede celular mais rígida (**Figura 4**).

Figura 4. Estrutura e composição de parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (Adaptado de TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Além de ser um importante componente da parede celular o peptídeoglicano age de maneira semelhante à endotoxina, o qual estimula a produção de pirogênio endógeno, a ativação do complemento e a produção de interleucina-1 pelos monócitos, bem como agregação dos leucócitos polimorfonucleares, levando a formação de abscesso (KONEMAN *et al.*, 2008; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014).

As proteínas de ligadoras de penicilina (PBP, penicillin-binding proteins), são enzimas responsáveis por catalisar a construção das camadas de peptídeoglicano, sendo importantes alvos das penicilinas e outros antimicrobianos β -lactâmicos. A resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) e a outras penicilinas está relacionada a aquisição do gene *mecA*, que codifica a alteração da PBP para PBP2a, que tem baixa afinidade de ligação a meticilina, a outras

penicilinas e cefalosporinas. O gene *mecA* está localizado no cassete cromossômico estafilocócico, *mec* (SCC*mec*, staphylococcal cassette chromosome *mec*), o qual possui seis sequências gênicas distintas para este elemento cromossomal (tipo I a VI). As cepas MRSA anteriormente eram consideradas restritas as infecções adquiridas no ambiente hospitalar, no entanto, a partir do conhecimento das sequências distintas que configuram a resistência aos β -lactâmicos e a outros antimicrobianos, sabe-se que estas também estão associadas as infecções comunitárias, as quais apresentam o SCC*mec* tipo IV (KONEMAN *et al.*, 2008; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014).

As cepas MRSA eram consideradas restritas as infecções adquiridas no ambiente hospitalar, no entanto, a partir do conhecimento das sequências distintas que configuram a resistência β -lactâmicos e a outros antimicrobianos, sabe-se que estas também estão associadas as infecções comunitárias, as quais apresentam o SCC*mec* tipo IV (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014).

Entre os diversos fatores de virulência presentes nos estafilococos, se destacam a grande variedade toxinas que são capazes de produzir. Entre elas, as toxinas alfa, beta, delta, gama e a leucocidina Pantón-Valentine (PVL, Pantón-Valentine Leucocidine), que são citolíticas e capazes de danificar membranas. Os estafilococos são capazes de produzir ainda duas toxinas esfoliativas (A e B), 18 enterotoxinas (A a R) e a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1, Toxic shock Syndrome Toxin-1). Quanto as doenças relacionadas aos estafilococos, podem ser citadas a síndrome da pele escaldada; intoxicação alimentar; choque tóxico; impetigo; foliculite; furúnculos; bacteremia; endocardite; pneumonia e osteomielite (LEVINSON, JAWETZ, 2007; TRABULSI, ALTERTHUM 2008; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014).

1.3 O gênero *Enterococcus* spp.

Os *Enterococcus* spp., **Figura 5**, são micro-organismos que compõem a flora intestinal e biliar. Em pequena quantidade também podem ser encontrados na vagina e uretra masculina. Os enterococos estão em segundo lugar entre as bactérias responsáveis por infecções hospitalares, ficando atrás apenas dos *Staphylococcus* spp. O aumento do número de infecções causadas pelos enterococos ocorre em virtude de sua resistência aos antibióticos β -lactâmicos como as penicilinas e cefalosporinas de várias gerações, bem como em virtude do surgimento

de cepas com alto nível de resistência à vancomicina (KONEMAN *et al.*, 2008; TRABULSI, ALTERTHUM 2008).

Figura 5. Micrografia Eletrônica de Varredura de *Enterococcus faecalis* aumentada em 10.000x.
Foto: Peter Wardel (Center Disease Control and Prevention, CDC).

Os enterococos são compostos por mais de dez espécies diferentes que incluem *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus*, *E. dispar* e *E. mundtii*. Estas espécies são isoladas com pouca frequência de infecções humanas. Em animais já foram identificadas espécies como *E. canis*, *E. villorum*, *E. porcinus*, *E. ratti*, *E. asini*, *E. phoeniculicola*, e do meio ambiente *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*. E meio a tamanha diversidade de espécies, duas são de grande importância, uma vez que, são responsáveis pela maioria das infecções enterocócicas em humanos. *Enterococcus faecalis* é a cepa isolada com maior frequência, cerca de 80 a 90%. Enquanto que *Enterococcus faecium* ocupa o segundo lugar, respondendo por cerca de 10 a 15% das infecções (KONEMAN *et al.*, 2008, TRABULSI, ALTERTHUM 2008; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014).

Os enterococos apresentam diversos fatores de virulência, entre eles a produção de citolisina/hemolisina que causam a lise de eritrócitos de humanos, e também de coelhos, cavalos, e bovinos, apresentando toxicidade significativa (KONEMAN *et al.*, 2008). No *E. faecalis* a atividade citolítica/hemolítica requer a expressão de seis genes: *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *cylB*, *cylA* e *cylI*, para que a expressão da molécula funcional ocorra. A molécula funcional apresenta dois domínios, sendo uma região operacional *CylL_L*, o qual é termoestável, e uma segunda região responsável pela ativação *CylL_S*, caracteristicamente termolábil. As duas subunidades apresentam grande afinidade, e na ausência da célula-alvo formam complexos

inativos. Algumas das etapas de formação da molécula funcional são realizadas por proteínas como a Cy1M e Cy1A que participam da modificação pós-transcricional da molécula nas fases intra e extracelular, respectivamente. O transporte de peptídeos para o meio extracelular é realizado pela proteína transmembrânica Cy1B, enquanto que, a proteção da célula produtora é conferida pela proteína citoplasmática Cy1I (TRABULSI, ALTERTHUM, 2008).

Outro fator de virulência de grande importância para os enterococos, é a capacidade de produzir uma proteína de agregação codificada por plasmídeo, ligada à superfície da célula bacteriana, que promove a agregação das bactérias facilitando a troca de genes que codificam mecanismos de resistência através de conjugação. Esta proteína de agregação também facilita a aderência dos enterococos as células epiteliais intestinais do hospedeiro (KONEMAN *et al.*, 2008). A expressão da proteína agregativa é feita pelo plasmídeo pAD1, que carrega o gene ASA1. As sequências específicas presentes no gene ASA1 fazem o reconhecimento de receptores como as integrinas, indicando o local onde pode haver interação com as células e tecidos (TRABULSI, ALTERTHUM, 2008).

Aproximadamente 40% dos *E. faecalis* isolados de amostras de sangue provenientes de endocardite produzem uma proteína de superfície extracelular, denominada Esp., que apresenta características bioquímicas e funcionais semelhantes a outras adesinas. Esta proteína protege as bactérias do ataque de anticorpos por meio do afastamento da superfície celular. Além disso, a presença desta proteína facilita a formação de biofilme em superfícies abióticas (KONEMAN *et al.*, 2008; TRABULSI, ALTERTHUM, 2008). Existe ainda, a possibilidade de produção de gelatinases ou metalopeptidase extracelular, que possuem atividade semelhante à das proteinases, particularmente com a elastase de *Pseudomonas aeruginosa*. Estas gelatinases presentes nos enterococos podem causar hidrólise de uma série de componentes do organismo, como a hidrólise de insulina e glucagon, fibrinogênio, colágeno, elastina, hemoglobina, neurotensinas, bem como a hidrólise de peptídeos bioativos (TRABULSI, ALTERTHUM, 2008).

Grande parte das cepas de *E. faecalis* e algumas de *E. faecium* isoladas de bacteremia produzem superóxido extracelular que pode aumentar a virulência desses enterococos nos abscessos de microbiota mista (KONEMAN *et al.*, 2008). Os ácidos lipoteicóicos constituem o antígeno do grupo sorológico D de Lancefield dos enterococos e também podem atuar na virulência ao modificar a produção de fator de necrose tumoral (TNF, Tumoral Necrosis Factor) e de interferon, os quais são essenciais no controle da replicação celular das bactérias. Por fim, 50 a 60% das cepas de *E. faecalis* produzem cocolisina, uma metaendopeptidase extracelular

que pode inativar a endotelina, um peptídeo vasoativo (KONEMAN *et al.*, 2008; TRABULSI, ALTERTHUM 2008; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014).

Os enterococos são responsáveis por diversas infecções, podendo afetar o trato urinário, causar bacteremia, endocardite, infecções intra-abdominais e pélvicas, infecções de feridas e tecidos moles, sepse neonatal e, raramente, meningite. A maioria dessas infecções é de origem hospitalar e estão diretamente relacionadas ao quadro de saúde do paciente, os quais incluem condições como imunossupressão, neoplasia, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, infecções do trato respiratório, diabetes e prematuridade. A meningite causada pelos enterococos costuma ser rara tanto em adultos quanto em crianças, podendo ocorrer de forma espontânea ou adquirida como infecção pós-operatória (KONEMAN *et al.*, 2008; TRABULSI, ALTERTHUM 2008).

A resistência antimicrobiana dos enterococos está diretamente ligada ao seu potencial patogênico. São resistentes em baixo nível aos aminoglicosídeos e às lincosamidas, sendo resistentes também a ação das sulfonamidas. A resistência de alto nível aos aminoglicosídeos disseminou-se entre várias espécies, tais como *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* e *E. mundtii*. Os enterococos apresentam ainda alto nível de resistência as penicilinas e cefalosporinas (KONEMAN *et al.*, 2008).

A resistência adquirida aos glicopeptídeos, como a vancomicina e teicoplanina em espécies de *Enterococcus* spp. corresponde a cinco fenótipos diferentes, designados como *vanA*, *vanB*, *vanD* e *vanG*, sendo os fenótipos *vanA* e *vanB* os mais prevalentes e de maior importância clínica no Brasil. Esses fenótipos correspondem aos grupos de genes que codificam enzimas que criam os componentes estruturais que resultam na resistência a maioria dos antimicrobianos. A resistência aos glicopeptídeos é decorrente da síntese de diferentes precursores de peptídeoglicano que são incorporados à parede celular e apresentam uma redução na afinidade de ligação pela vancomicina, teicoplanina ou ambas. Normalmente, as cepas sensíveis à vancomicina possuem cadeias laterais de peptídeoglicano que terminam com o depsipeptídeo “D-alanil-D-alanina”, local onde os antibióticos glicopeptídicos se ligam. Nas cepas resistentes aos glicopeptídeos, o depsipeptídeo é substituído por “D-alanil-D-lactato” (em cepas com os fenótipos *vanA*, *vanB* e *vanD*) ou por “D-alanil-D-serina” (em cepas com os fenótipos *vanE* e *vanG*) (KONEMAN *et al.*, 2008; TRABULSI, ALTERTHUM 2008; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014).

As cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* que possuem o fenótipo *vanA*, tipicamente exibem resistência de alto nível induzível mediada por transposon, tanto à vancomicina (MIC de 64 a

1.000 µg/mL) quanto a teicoplanina (MIC de 16 a 512 µg/mL). As cepas com fenótipo *vanB* possuem resistência adquirida induzível a várias concentrações de vancomicina (MIC de 4 a 1.000 µg/mL), porém permanecem sensíveis à teicoplanina (MIC de 0,5 a 1 µg/mL), embora raras, cepas com fenótipo *vanB* também podem ser resistentes a teicoplanina. Os isolados que expressam o fenótipo *vanB* também incluem cepas de *E. faecalis* e *E. faecium*. Algumas cepas de *E. faecium* expressam o fenótipo *vanD*. Essas cepas exibem resistência constitutiva à vancomicina (MIC de 28 a 64 µg/mL) e à teicoplanina (MIC de 4 a 64 µg/mL) não sendo este mecanismo de resistência transferível a outros enterococos. As cepas de *E. faecalis* que expressam os fenótipos *vanG* e *vanE* possuem resistência de baixo nível induzível à vancomicina (MIC de 16 µg/mL), porém, permanecem sensíveis à teicoplanina (MIC de 0,5 µg/mL) (KONEMAN *et al.*, 2008).

Outros dois fenótipos são conhecidos, porém, apresentam pouca relevância clínica. São os fenótipos *vanC* e *vanF*. O fenótipo *vanC* corresponde a resistência intrínseca a glicopeptídeos observada em *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens*. Esse grupo de genes *vanC* não é transferido por conjugação para outros micro-organismos e, em geral, é de expressão constitutiva e de origem cromossômica. O fenótipo *vanF* refere-se ao grupo de genes de resistência aos glicopeptídeos encontrado na antiga espécie de *Bacillus*, denominada *Paenibacillus popilliae*. Entre todos os fenótipos dos enterococos já descritos, o fenótipo *vanA* é o mais preocupante, visto que, cepas de bactérias que carregam esse fenótipo são capazes de transferir marcadores de resistência por meio do mecanismo de conjugação a outros enterococos e outros micro-organismos Gram-positivos, incluindo *Staphylococcus aureus* (KONEMAN *et al.*, 2008).

1.4 Mecanismos de resistência bacteriana e os alvos da ação dos antibióticos

O aparecimento de bactérias multirresistentes traz consigo consequências drásticas, uma delas é a possibilidade de retrocesso a chamada “era pré-antibiótico”, o que significa dizer que já existem micro-organismos resistentes a todas as classes de antibióticos (CDC, 2013). A Organização Mundial da Saúde reconhece que as bactérias multirresistentes são umas das principais preocupações a nível de saúde pública mundial, e que seu controle pode ser determinante para que uma possível catástrofe mundial seja evitada (WHO, 2014).

Com surgimento cada vez mais rápido de novos mecanismos de resistência em todo o mundo, os antibióticos que anteriormente revolucionaram a história da medicina e salvaram milhares de vidas, estão deixando de ser eficazes contra inúmeras infecções anteriormente tratadas com facilidade. Esta ineficácia dos antibióticos tem sido atribuída não somente ao uso nos mais diversos setores, mas também a redução dos investimentos feitos pelas indústrias farmacêuticas destinados ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, uma vez que essa classe de medicamentos não dará o retorno esperado pelas indústrias, diante do tempo e custo investidos (VENTOLA, 2015). Sob o aspecto terapêutico os antibióticos são utilizados por um curto período de tempo, o que afeta diretamente o aspecto econômico, por não se enquadrarem no perfil de medicamentos destinados ao tratamento de doenças crônicas como diabetes, dislipidemias, hipertensão, asma, doenças gastrointestinais ou desordens psiquiátricas. Além disso, existem ainda os obstáculos regulatórios impostos pelas agências de saúde que são responsáveis tanto pela aprovação do novo antibiótico quanto pelas regras que restringem sua comercialização, o que também desestimula as indústrias farmacêuticas. Com isto, restam apenas as iniciativas de desenvolvimento de novos antimicrobianos em nível acadêmico, estando estas sujeitas ainda a redução de recursos financeiros, o que compromete sobremaneira o desenvolvimento das pesquisas (WRIGHT, SUTHERLAND, 2007; WRIGHT, 2010^{a,b}).

A prescrição incorreta ou indevida de antibióticos é um dos fatores que contribui significativamente para o surgimento de resistência. O tratamento indicado, a escolha do antibiótico ou a duração do tratamento são incorretos em cerca de metade dos casos. A ausência de testes que permitem a identificação rápida e eficaz do micro-organismo causador da infecção agrava ainda mais este quadro. Não o bastante, aproximadamente 60% das prescrições em unidades de terapia intensiva são consideradas desnecessárias ou inapropriadas (VENTOLA, 2015).

A resistência bacteriana é um processo biológico natural decorrente da pressão seletiva exercida pela exposição aos antibióticos (HOLMES *et al.*, 2016). Entre os diferentes mecanismos de resistência, **Figura 6**, são descritos na literatura a degradação enzimática da estrutura química da molécula do antibiótico, ou ainda a modificação de grupos funcionais de importância farmacológica na molécula, o que resulta na inativação ou não reconhecimento molecular entre o ligante e o receptor; o efluxo contínuo realizado por proteínas de transporte (bombas de efluxo) superexpressas na membrana que fazem a retirada do antibiótico para o meio extracelular, mantendo a concentração do antibiótico insuficiente para atuar nas funções

celulares da bactéria (COX, WRIGHT, 2013); modificação da estrutura química do alvo, seja ele a membrana ou parede celular, uma proteína, enzima, ribossomo ou DNA, o que afetará diretamente a ação farmacológico em decorrência do não reconhecimento entre o fármaco e seu receptor (SILVEIRA *et al.*, 2006); bem como a aquisição de plasmídeos de resistência provenientes de outras bactérias (TENOVER, 2006).

Figura 6. Mecanismos de resistência bacteriana (Figura representativa elaborada pelo autor).

Os antibióticos têm como alvo estruturas fisiológicas, componentes celulares e bioquímicos essenciais as bactérias. A ação dos antibióticos sob esses alvos pode resultar diretamente na morte do micro-organismo ou na inibição do seu crescimento. Entre os principais alvos bacterianos estão a parede celular, a membrana celular, a síntese de proteínas, a síntese de DNA e RNA, bem como a síntese ácido fólico interferindo em vias metabólicas essenciais, **Figura 7** (TENOVER, 2006; WRIGHT, SUTHERLAND, 2007; WRIGHT, 2010^{a,b}).

Os antibióticos que atuam inibindo a síntese de parede celular incluem os β -lactâmicos, como as penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas e os glicopeptídeos que incluem a vancomicina e a teicoplanina. Os β -lactâmicos inibem a síntese de parede celular interferindo nas enzimas necessárias para a síntese de peptídeoglicano. Enquanto que a vancomicina e teicoplanina impedem a formação das ligações cruzadas de peptídeoglicano necessárias durante a formação da parede celular (TENOVER, 2006).

Os macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, estreptograminas e oxazolidinonas atuam na inibição da síntese de proteínas. Os aminoglicosídeos e tetraciclina ligam-se a unidade 30s do ribossomo, enquanto que os macrolídeos, lincosamidas,

estreptograminas, cloranfenicol e linezolida ligam-se a subunidade 50s. Em ambos os casos a ligação com uma das subunidades impede a formação do complexo ribossomal necessário para a transcrição de proteínas (TENOVER, 2006; MACDOULGALL, CHAMBERS, 2012).

As fluorquinolonas tem como alvos a DNA-girase, e como dano final sua ação leva a quebra da fita de DNA durante o processo de replicação celular. As sulfonilamidas e a trimetoprima bloqueiam a via de metabólica de síntese de ácido fólico, impedindo a formação das bases nitrogenadas que darão origem ao DNA (TENOVER, 2006). As bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (VRE, Vancomycin-Resistant Enterococci) estão entre os principais patógenos Gram-positivos em termos de resistência aos antibióticos. Nas últimas cinco décadas as cepas de *Staphylococcus aureus*, MRSA, emergiram como uma das principais causas da disseminação de mecanismos resistência entre os Gram-positivos. Estas cepas são resistentes aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), a linezolida, tigeciclina, daptomicina, e a maioria das penicilinas e cefalosporinas (ROSSOLINI *et al.*, 2014).

Figura 7. Alvos moleculares da ação dos antibióticos (Figura representativa elaborada pelo autor).

Os micro-organismos Gram-negativos têm apresentado fenótipos de resistência ainda mais agressivos, variando de extremamente resistente (XDR, Extremely Drug-Resistant) a totalmente resistente (TDR, Totally Drug-Resistance). Estes fenótipos são encontrados com

frequência em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Klebsiella pneumoniae* comumente isoladas de infecções relacionadas à assistência à saúde. Por outro lado, a ocorrência de infecções comunitárias causadas por Gram-negativos tem crescido devido as cepas de *Escherichia coli* com espectro ampliado de resistência as β -lactamases, ESBLs, e *Neisseria gonorrhoeae* resistente as fluorquinolonas, tetraciclina, azitromicina, penicilinas e cefalosporinas (GOULD, 2009; ROSSOLINI *et al.*, 2014). Cada vez mais, novos micro-organismos desenvolvem ou adquirem mecanismos de resistência, tornando este contexto ainda mais preocupante.

1.5 Desenvolvimento de novos fármacos

A maioria dos fármacos novos se originam de pesquisas realizadas em universidades e institutos de pesquisas. No entanto, o processo de desenvolvimento de um novo fármaco depende, principalmente, do aporte de grande investimento financeiro e da integração de múltiplas tecnologias, por isto, a maioria dos novos fármacos são desenvolvidos em sua totalidade pelas grandes companhias farmacêuticas (KATZUNG, 2014).

A fase de estudos pré-clínicos ou translacionais é a base do processo de pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco, no qual são realizados estudos farmacológicos *in vitro*, até que sejam realizados os primeiros estudos *in vivo*, observando a utilização de modelos animais adequados para cada tipo de estudo a ser realizado. Os modelos de ensaios *in vitro* e *in vivo* são realizados para mimetizar a ação do fármaco no organismo. Durante os estudos das propriedades farmacocinéticas são avaliadas a absorção (permeabilidade através das membranas celulares), distribuição (interação com proteínas plasmáticas), metabolismo ou biotransformação (interação com enzimas do sistema microssomal CYP450 e a produção de metabólitos), e a eliminação (tempo de meia-vida e vias de eliminação) (PATRICK, 2009; LEITÃO, MONTANARI, MONTANARI, 2011).

As propriedades farmacodinâmicas são estudadas através de estudos enzimáticos, celulares, e estudos em animais. Os estudos toxicológicos que asseguram a utilização do fármaco em desenvolvimento são realizados através de métodos que avaliam a citotoxicidade, genotóxicidade, os efeitos sob as células do epitélio cardíaco, realizados através de ensaios com proteínas canais do *Gene Humano Relacionado ao Ether-a-go-go*, *HERG (Human Ether-a-go-go-Related Gene)* e os efeitos indutivos sobre as enzimas do citocromo P450, entre outros. Esta etapa pré-clínica ou translacional é determinante, visto que, a transição para a primeira fase de

estudos clínicos passa pelo que se pode chamar de “travessia do vale da morte” (**Figura 10**), o que significa dizer que se não forem obtidos resultados que comprovem a segurança da molécula em desenvolvimento, torna-se necessário retroceder a pesquisa de base, podendo haver na pior das hipóteses a descontinuidade do processo de pesquisa e desenvolvimento. Os estudos clínicos são divididos em 4 fases, e visam avaliar parâmetros farmacoterapêuticos em humanos. As três primeiras fases ocorrem antes da aprovação do fármaco e demandam cerca de 6 a 7 anos de pesquisa. A fase 4 é realizada após a aprovação do fármaco para a comercialização (PATRICK, 2009; LEITÃO, MONTANARI, MONTANARI, 2011).

A Fase I dos estudos clínicos dura em torno de um ano a um ano e meio, sendo realizada com um grupo pequeno de voluntários sadios, cerca de 20 a 50. Nesta fase, são estabelecidos parâmetros como: tolerância, dose efetiva, relação dose/efeito, bem como a observação dos possíveis efeitos colaterais. Para realização desses estudos são estabelecidos critérios de seleção dos voluntários, como sexo, idade, peso, raça, estado de saúde, e etc. No caso de fármacos antitumorais, os estudos clínicos nesta fase, são realizados em voluntários que apresentam a patologia. Por apresentarem janela terapêutica estreita e agirem de maneira não seletiva, ou seja, por terem efeitos tanto em células cancerosas quanto em células normais, essas moléculas não são administradas em pacientes sadios (PATRICK, 2009; LEITÃO, MONTANARI, MONTANARI, 2011).

Durante a realização dos estudos clínicos de Fase II, um grupo formado por cerca de 100 a 500 voluntários portadores da patologia estudada é estruturado para que sejam observadas a eficácia do fármaco, segurança, biodisponibilidade e bioequivalência. Estes estudos têm duração média de dois anos, sendo analisados durante este tempo, os aspectos terapêuticos e toxicológicos inerentes ao fármaco (PATRICK, 2009; LEITÃO, MONTANARI, MONTANARI, 2011).

Na Fase III os estudos clínicos são realizados com um grupo maior de voluntários, cerca de 1000 a 5000. Sendo estes estudos realizados em centros de pesquisa em diversos países, a fim de avaliar detalhadamente os aspectos relacionados ao perfil terapêutico, como indicação, dose e vias de administração, efeitos adversos, contraindicações, e vantagens terapêuticas em relação a produtos já existentes no mercado. Além disso, podem ser observados efeitos secundários e outras aplicações terapêuticas, como o que aconteceu com o Viagra® (citrato de sildenafil – Pfizer) inicialmente desenvolvido para o tratamento de angina, mas que acabou sendo registrado como medicamento para o tratamento da disfunção erétil, devido a observação

de que o mesmo causava ereção nos pacientes submetidos aos estudos clínicos (LEITÃO, MONTANARI, MONTANARI, 2011).

Figura 8. Estrutura química da sildenafil (Viagra® – Pfizer).

Ainda na Fase III, podem ser observados problemas relacionados ao metabolismo, toxicidade, e suas variações interindividuais decorrente da diversidade genômica dos voluntários. Esses problemas podem influenciar diretamente no sucesso terapêutico, visto que pacientes conhecidos como metabolizadores rápidos podem não responder ao tratamento, enquanto que, pacientes conhecidos como metabolizadores lentos, estão mais suscetíveis aos efeitos tóxicos devido ao acúmulo do fármaco no organismo (PATRICK, 2009; LEITÃO, MONTANARI, MONTANARI, 2011).

A quarta e última fase de estudos clínicos, Fase IV, inicia-se após a liberação do então medicamento para comercialização. Durante está fase são determinadas outras reações adversas menos frequentes e quantificadas as mais conhecidas. Efeitos tóxicos crônicos não detectados nas fases anteriores podem ser detectados nesta fase. A identificação de alguns efeitos tóxicos graves, e até mesmo a morte de pacientes ocasionada pelo uso do medicamento pode levar a retirada do mercado, como o que aconteceu com o Vioxx® (rofecoxibe – Merck), um anti-inflamatório não esteroideal que inibe especificamente ou preferencialmente a isoforma 2 da ciclo-oxigenase (COX-2), em que o uso prolongado aumentava os riscos de ataque cardíaco e acidente vascular cerebral, e que também levou a morte de pacientes (PATRICK, 2009; LEITÃO, MONTANARI, MONTANARI, 2011).

Figura 9. Estrutura química do rofecoxibe (Vioxx® – Merck).

Nos Estados Unidos, o tribunal do Texas condenou a Merck a pagar uma indenização de US\$ 253 milhões (cerca de R\$ 600 milhões de reais) à Carol Ernst, esposa de Robert Ernst que tomava o Vioxx® e que morreu durante o período em que fazia uso do medicamento. As consequências deste evento foram gravíssimas para a Merck, e incluíram a soma de mais de 4 mil ações relacionadas ao Vioxx® contra a farmacêutica somente nos Estados Unidos, além de outras que foram impetradas no exterior, inclusive no Brasil. Não o bastante, a empresa sofreu os reflexos com a queda de 5% de suas ações no mercado após a sentença do juiz (BBC BRASIL, 2005).

Estima-se que o tempo necessário para o desenvolvimento de um novo fármaco gire em torno de 10 a 15 anos, e que os custos envolvidos neste processo ultrapassem os US\$ 150 milhões podendo atingir a ordem de US\$ 1 bilhão até que chegue ao mercado. De cada 10 novos fármacos comercializados, apenas 1 dará o retorno esperado em razão dos investimentos feitos durante o processo de pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I), motivando as grandes companhias farmacêuticas a investir seus recursos destinados a PD&I nos medicamentos de maior apelo lucrativo. Em sua maioria, medicamentos destinados a proporcionar melhoria na qualidade de vida de pacientes em tratamento de doenças crônicas, uma vez que, estes estarão sujeitos a necessidade de uso contínuo do medicamento (PhARMA, 2016).

Figura 10. Fases do desenvolvimento de novos fármacos. Adaptado de BrightFocus and Clinical Trails (BrightFocus® Foundation, 2013).

Em todo o mundo, milhares de novos compostos são sintetizados, e outras centenas de milhares são testados a partir de bibliotecas de compostos. No entanto, novas modificações na estrutura de um novo composto líder de sucesso são necessárias. A necessidade de novas modificações ou otimização se dá em razão de fatores que podem alterar a potência, seletividade, metabolismo e/ou biotransformação, a toxicidade, e até mesmo a conveniência da dosagem, o que pode afetar diretamente a adesão ao tratamento farmacológico e consequentemente a venda do medicamento (PATRICK, 2009; LEITÃO, MONTANARI, MONTANARI, 2011).

O rigor das agências regulatórias durante processo de registro até aprovação que permitirá a comercialização do novo fármaco, constitui um dos grandes desafios crescentes resultante dos riscos relacionados a eficácia e segurança do novo medicamento. Infelizmente, apenas 10 a 15% dos novos fármacos que conseguem aprovação para comercialização representam avanços em inovação farmacêutica. Os demais fármacos comercialização não constituem inovação farmacêutica propriamente dita, sendo apenas variações moleculares de fármacos já disponíveis comercialmente. São os chamados fármacos “me too” ou “eu também”. Em sua maioria são lançados no mercado como estratégia de marketing pelas indústrias farmacêuticas, no entanto, são apenas medicamentos já conhecidos disfarçados de inovação (THOMAS, 2010; KATZUNG, 2014).

Apesar do custo elevado com desenvolvimento, as recompensas financeiras são enormes. Em 2007 o mercado global de produtos farmacêuticos foi estimado em US\$ 712 bilhões de dólares, sendo o retorno do investimento feito pelas indústrias farmacêuticas os mais altos de todas as indústrias (KATZUNG, 2014). Em 2016, quase 10 anos depois, a venda de produtos farmacêuticos superou a projeção mundial de cerca de US\$ 1 trilhão de dólares, podendo atingir US\$ 1.5 trilhões de dólares em 2020. Os fatores que podem explicar o aumento no consumo de produtos farmacêutico, incluem dados demográficos e econômicos globais como o aumento da expectativa de vida, seguida do rápido envelhecimento da população mundial associado com o aumento de doenças crônicas, e o crescimento urbano concentrado em regiões de maior poder econômico, o que gera aumento das despesas governamentais em saúde, com consequente crescimento da demanda por tratamentos mais efetivos. Soma-se a isso os preços elevados dos medicamentos associados principalmente com o período de proteção patentária, que assegura ao portador da inovação farmacêutica a exploração monopolizada da venda do medicamento (ITA Pharmaceuticals Top Markets Report, 2016).

	Nome	Princípio Ativo	Indicação	Fabricante	Vendas US\$
1º	Humira®	Adalimumabe	Imunobiológico	Abbvie	16.078
2º	Harvoni®	Ledipasvir e Sofosbuvir	HIV e Hepatite C	Gilead	9.081
3º	Enbrel®	Etanercept	Imunobiológico	Amgen / Pfizer	8.875
4º	Remicade®	Infliximabe	Imunobiológico	Johnson & Johnson Merck	8.234
5º	MabThera/Rituxan®	Rituximabe	Câncer	Roche	7.227
6º	Revlimid®	Lenalidomina	Câncer	Celgene	5.801
7º	Avastin®	Bevacizumabe	Câncer	Roche	6.715
8º	Herceptin®	Trastuzumabe	Câncer	Roche	6.714
9º	Lantus®	Insulina Glargina	Diabetes	Sanofi	6.057
10º	Pevnar 13®	Vacina Pneumocócica	Antibacteriano	Pfizer	5.718
11º	Xarelto®	Rivaroxabane	Doenças cardiovasculares	Johnson & Johnson Bayer	5.392
12º	Eylea®	Aflibercepte	Oftalmologia	Regeneron Pharmaceuticals Bayer	5.046
13º	Lyrica®	Pregabalina	Distúrbios neurológicos	Pfizer	4.966
14º	Neulasta®	Pegfilgrastima	Disfunções sanguíneas	Amgen	4.648
15º	Seretide/Advair®	Salmeterol	Asma	GlaxoSmithkline	4.252

Figura 11. Ranking dos 15 medicamentos mais vendidos em 2016. (Adaptado de GENENG NEWS, 2016 e PHARMA COMPASS 2016).

Os fármacos provenientes do processo de pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) que geram alta lucratividade, são os chamados “*Blockbusters*”, ou seja, os medicamentos mais vendidos ao longo de um ano, e que ultrapassam os mais de US\$ 1 bilhão de dólares com as vendas. Um dos grandes exemplos disso foi a venda do Lipitor® (Atorvastatina – Pfizer) destinado ao tratamento de dislipidemias e redução do colesterol, em que sua comercialização mundial em 2007 ultrapassou US\$ 12 bilhões de dólares. Em 2016 os 15 medicamentos mais vendidos no mundo superaram juntos, mais de US\$ 100 bilhões de dólares (**Figura 11**). Entre eles estão medicamentos voltados ao tratamento de doenças imunológicas (artrite reumatoide e transplante de órgãos); HIV e Hepatite C; câncer; diabetes; vacina antibacteriana; doenças cardiovasculares; doenças oftalmológicas; distúrbios neurológicos; disfunções sanguíneas e asma (GENENG NEWS, 2016; PHARMA COMPASS, 2016).

No mesmo ano a receita das 10 maiores companhias do segmento farmacêutico (**Figura 12**) atingiram mais US\$ 330 milhões. Este ranking levou em consideração a receita anual total, assim como o percentual de crescimento, a proporção da receita no segmento, e o total investido em PD&I (IGEAHUB, 2016).

Figura 12. 10 maiores companhias farmacêuticas em 2016 (Adaptado de IGEAHUB, 2016).

Embora as grandes companhias farmacêuticas ainda concentrem investimentos bilionários na busca por *blockbusters*, mudanças nesse cenário vêm sendo observadas, uma vez

que, a quebra de várias patentes abre as portas para a comercialização de medicamentos genéricos, com custos muito mais acessíveis dos que os praticados pelas companhias durante o período de proteção patentária. Acredita-se ainda que este cenário de grande faturamento fundamentado no modelo de pesquisa e desenvolvimento de moléculas bilionárias possa estar se esgotando, isto porque, a busca por novos *blockbusters* eleva os riscos financeiros que pode levar a perda de grandes quantias envolvidas nas pesquisas, além disso, essa busca concentrada pode reduzir o catálogo de medicamentos das companhias farmacêuticas. O que não significa que a pesquisa focada nos *blockbusters* deixará de ser praticada, mas sim, que pode haver uma ampliação no número de alvos biológicos a serem estudados com consequente surgimento de novas classes terapêuticas a serem exploradas (LEITÃO, MONTANARI, MONTANARI, 2011).

Adotadas pelas grandes companhias farmacêuticas nos últimos anos, as fusões têm sido adotadas como uma das estratégias de ampliação e expansão do mercado farmacêutico. Em 2008 o faturamento decorrente da fusão entre Pfizer & Wyeth rendeu cerca US\$ 61 bilhões. Outro exemplo disso foi o ocorrido entre Merck e Schering, no qual a fusão resultou em rendimento da ordem de US\$ 42 bilhões no mesmo período (LEITÃO, MONTANARI, MONTANARI, 2011).

No Brasil, as fusões ocorreram entre as grandes companhias farmacêuticas nacionais e multinacionais com companhias brasileiras fabricantes de medicamentos genéricos. Em Outubro de 2005 a Aché adquiriu a Biosintética por R\$ 600 milhões. Três anos mais tarde em 2008, a divisão Farma da Hypermarcas pagou R\$ 675 milhões pela Farmasa. No ano seguinte, em Dezembro de 2009 a Hypermarcas adquiriu a Neo Química por R\$ 1,3 bilhões (EXAME, 2010; ISTOÉ, 2011). Antes da aquisição feita pela Hypermarcas em Dezembro de 2009, a francesa Sanofi-Aventis adquiriu em Abril do mesmo ano a fabricante de genéricos Medley por R\$ 1,5 bilhões (ISTOÉ, 2011; EXAME, 2014). Em Outubro de 2010 foi a vez da americana Pfizer se juntar a Teuto com um investimento de R\$ 400 milhões pela aquisição de 40% dos negócios da empresa (VEJA, 2010; ISTOÉ, 2011; ÉPOCA, 2017). Ainda em Dezembro de 2010 a Hypermarcas faz uma nova aquisição, desta vez adquire a Mantecorp por cerca de R\$ 2,5 bilhões (ISTOÉ, 2011). É notório que as fusões entre duas companhias farmacêuticas é uma importante estratégia de expansão de mercado, assim como a formação de empreendimentos conjuntos, como o formado pela Merck, Cristália e Eurofarma visando ampliar o mercado de vendas de medicamentos genéricos (VEJA, 2012).

Um dos grandes exemplos da rentabilidade dos genéricos ocorreu após a quebra da patente do Viagra® em Junho de 2010. No dia seguinte após a patente do Viagra® expirar, a fabricante de genéricos EMS abasteceu as farmácias com versão do seu genérico em uma verdadeira operação de guerra. Em seis meses, as vendas do comprimido renderam a EMS mais R\$ 80 milhões de reais. No mesmo período. A Pfizer detentora da patente comercializou menos de um terço das vendas da EMS (ISTOÉ, 2011). Outro dado significativo sobre os genéricos é o desempenho das vendas. Em 2015 as vendas de medicamentos genéricos acumularam mais R\$ 17,5 bilhões (JB ECONOMIA, 2017) e, somente no primeiro trimestre de 2016, as vendas totais movimentaram mais de R\$ 1,5 bilhões, o que justifica o interesse pelas fusões com as indústrias fabricantes de medicamentos genéricos (GUIA DA FARMÁCIA, 2016).

Humira®, Enbrel®, Remicade®, Rituxan®, Avastin®, Herceptin®, Lantus®, são nomes dos medicamentos que estiveram entre os *blockbusters* 2016. Todos eles são fruto da biotecnologia, ou seja, são medicamentos obtidos a partir da tecnologia do DNA recombinante (EXAME, 2012). Essa frente de pesquisa teve início nos anos de 1980 com o desenvolvimento das primeiras insulinas recombinantes, e hoje é uma das principais alternativas terapêuticas para o tratamento de diversas doenças, em especial o câncer. Esses medicamentos também são conhecidos como medicamentos biológicos, e fazem parte da linha mais promissora na terapêutica atual e futura (REID, SINDELAR, 2008).

Os medicamentos biotecnológicos surgiram não apenas como uma alternativa terapêutica, mas também, como uma tentativa de recuperar o tempo e o retorno financeiro perdido com o desenvolvimento de medicamentos químicos. Isto também levou a fusão com indústrias fabricantes de biotecnológicos, como fizeram a Pfizer ao comprar a Wyeth por US\$ 70 bilhões de dólares, e a inglesa AstraZeneca ao comprar por US\$ 1,2 bilhões de dólares a americana Ardea Biosciences. No Brasil, em menor escala também foram investimentos em medicamentos biotecnológicos. Após receber R\$ 50 milhões de reais de vários fundos, a Recepta Biopharma de São Paulo iniciou o desenvolvendo um novo medicamento para combater o câncer de ovário chamado de RebmAb. Em Março de 2012, as empresas Bionovis, formada pelos laboratórios Aché, EMS, Hypermarcas e União Química, e outra empresa dos laboratórios Biolab, Cristália, Eurofarma e Libbs, receberam cada uma R\$ 500 milhões de reais do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) para investirem em biotecnologia e desenvolvimento de novos medicamentos biológicos (EXAME, 2012).

Do mesmo modo que os medicamentos genéricos se tornaram um grande atrativo não só para os consumidores, mas também para as companhias farmacêuticas que buscam novas

moléculas de grande impacto financeiro, já existem os medicamentos chamados biossimilares. A anos comercializados na Europa, acredita-se que os biossimilares podem salvar o sistema de saúde dos Estados Unidos, reduzindo os gastos governamentais em mais de US\$ 40 bilhões de dólares na próxima década. Em 2015 o FDA aprovou o primeiro biossimilar, o Zarxio® (filgrastim-sndz – Sandoz) que é uma alternativa ao Neupogen® (filgrastim – Amgen) ambos utilizados por pacientes em tratamento de câncer para aumentar a produção de glóbulos brancos. Em 2016 foi aprovado o segundo biossimilar, o Inflectra® (infliximabe-dyyb – Celltrion), um bloqueador de fator de necrose tumoral (TNF) biossimilar ao Remicade® (infliximabe – Johnson & Johnson e Merck). Outros dois biossimilares foram aprovados no final de 2016, entre eles o Erelzi® (etanercept-szzs – Sandoz) um biossimilar do Enbrel® (etanercept – Amgen e Pfizer) e, Amjevita® (adalimumabe-atto – Amgen) biossimilar do Humira® (adalimumabe – Abbvie) (DRUGS, 2017). Ainda que os medicamentos biotecnológicos ou biológicos estejam se tornando a esperança e o futuro para a cura de inúmeras doenças, os medicamentos de origem química desenvolvidos a partir das estratégias de planejamento de fármacos continuaram sendo promissores.

1.6 Compostos Nitro-Heterocíclicos

Os compostos nitro-heterocíclicos constituem classe promissora de fármacos. Entre estes compostos destacam-se os nitrofurânicos, os quais apresentam atividade antiparasitária e antimicrobiana de amplo espectro, atuando contra cepas de fungos e de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Alguns destes fármacos utilizados na prática médica possuem uma estrutura em comum, constituída de um grupo 5-nitro-2-furano e uma região azometínica (**Figura 13**). Entre eles podem ser citados o nifurtimox, utilizado no tratamento da Doença de Chagas; nitrofurais como antibacterianos de uso tópico; nitrofurantoína utilizada no tratamento de infecção urinária; furazolidona e nifuroxazida, ambas utilizadas no tratamento de infecções intestinais

(O'NEIL *et al.*, 2006; SWEETMAN, 2011).

Durante a década de 1940, milhares de compostos contendo o grupo nitro foram sintetizados e testados quanto a sua eficácia contra várias doenças. Nas duas décadas seguintes, o reconhecimento de efeitos tóxicos causados pelos nitrocompostos resultou em uma queda no uso e no desenvolvimento de novos fármacos desta classe (CHUNG, BOSQUESI, SANTOS, 2011). Apesar dos efeitos tóxicos relacionados aos compostos contendo o grupo nitro, que

podem variar desde estomatite, anorexia, náuseas, algumas vezes dermatites e alterações sanguíneas (PAULA, SERRANO, TAVARES, 2009; PAULA *et al.*, 2009), diversos fármacos que possuem este grupo químico continuam sendo utilizados na terapêutica humana e medicina veterinária até atualidade. Entre esses fármacos podem ser citados anti-hipertensivos como o nifedipino, nitrendipino e nisoldipino, antianginosos como o dinitrato de isossorbida e nitroglicerila, o acenocumarol como anticoagulante, nitrazepam como hipnótico sedativo, a clonitiazina como analgésico narcótico, nimesulida como anti-inflamatório, ranitidina como anti-histamínico H₂, nitacrina como antineoplásico, metronidazol, secnidazol, tinidazol, benznidazol e nifurtimox como antiparasitários, assim como cloranfenicol, furazolidona, nitrofurais, nitrofurantoína e nifuroxazida como antimicrobianos (O'NEIL *et al.*, 2006; SWEETMAN, 2011). A presença do grupo nitro pode conferir características importantes à molécula do ponto de vista físico-químico e farmacológico, como aumento do volume molar e massa molecular; modificação da solubilidade; e alterações na distribuição eletrônica da molécula (WERMUTH, 2008).

Figura 13. Fármacos nitrofurânicos usados na terapia antiparasitária e antimicrobiana. Em destaque a região comum entre as estruturas dos fármacos.

Em Trabalho de Conclusão de Curso realizado pela aluna Ana Carolina Hahns, ficou comprovado através da avaliação da atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, que os compostos com estrutura análoga a da nifuroxazida, com estrutura

azometínica e oxadiazolínica contendo o grupo nitro são ativos frente a esta cepa, enquanto que, os compostos sem a presença do grupo nitro (**Figura 14**) não apresentam atividade antimicrobiana, o que evidencia a importância deste grupo na atividade biológica.

Figura 14. Atividade antimicrobiana de compostos com estrutura azometínica e oxadiazolínica com e sem a presença do grupo nitro.

O mecanismo de ação dos nitrocompostos não é totalmente conhecido, entretanto, acredita-se que a atividade destes compostos ocorra através da interação entre a molécula e o alvo presente na biofase, assim como pela biorredução enzimática do grupo nitro (BOSQUESI *et al.*, 2008), que leva a geração de radicais livres conhecidos como espécies reativas de oxigênio (CHUNG, BOSQUESI, SANTOS, 2011).

A passagem transmembrana desses radicais livres ocorre por difusão passiva e aumenta à medida que o estresse oxidativo afeta a estabilidade das membranas celulares e, com acúmulo intracelular de radicais livres ocorrem danos oxidativos que afetam membranas, proteínas e até mesmo o DNA, levando a morte do micro-organismo (VIODÉ *et al.*, 1999; BOSQUESI *et al.*, 2008; CHUNG, BOSQUESI, SANTOS, 2011; ANDERSON *et al.*, 2012).

Em 1999, Blumenstiel e colaboradores ao realizarem estudos de cinética enzimática utilizando derivados nitrofurânicos com atividade frente ao parasito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, observaram que entre os fármacos avaliados, a nifuroxazida não causava efeitos tóxicos as células de mamíferos em concentrações menores do que 10 µM. Desde então, novo interesse pelo potencial terapêutico da nifuroxazida foi despertado e novos compostos análogos a este fármaco passaram a ser sintetizados em busca de novas estruturas químicas terapeuticamente promissoras.

Nos últimos anos, o grupo de pesquisa de Tavares e colaboradores dedicou-se ao desenvolvimento de análogos a nifuroxazida (**Figura 15**). Desde então já foram obtidos análogos com atividade frente a *Mycobacterium tuberculosis*, *Trypanosoma cruzi*, bactérias e fungos.

Entre os análogos nitrotiofilidênicos já foram identificadas estruturas com atividade frente *Mycobacterium tuberculosis* (RANDO *et al.*, 2002), também conhecido como bacilo de Koch, como também frente *Staphylococcus aureus* com caráter de multirresistência (MASUNARI, REZENDE, TAVARES, 2002; MASUNARI, TAVARES, 2007).

Durante a avaliação da atividade dos compostos frente a formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, ficou comprovado que para este micro-organismo, os compostos contendo grupo nitrofurânico são mais ativos em relação ao seu bioisóstero nitrotiofilidênico (PAULA *et al.*, 2009). Além dos grupos bioisósteros nitro-heterocíclicos furano e tiofeno, o desenvolvimento de estruturas com a substituição desses grupos nitro-heterocíclicos pelo grupo benzofuroxano apresentou atividade significativa contra cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistente (JORGE *et al.*, 2009, 2011) e de *Trypanosoma cruzi* (JORGE *et al.*, 2012, 2013).

Figura 15. Compostos análogos a nifuroxazida desenvolvidos pelo grupo Tavares e colaboradores. RANDO *et al.*, 2002; MASUNARI, REZENDE, TAVAREZ, 2002; MASUNARI, TAVARES, 2007; PAULA *et al.*, 2009; JORGE *et al.*, 2009, 2011; ISHII *et al.*, 2011; JORGE *et al.*, 2012, 2013; PALACE-BERL *et al.*, 2013; ZORZI *et al.*, 2014.

Assim como a modificação dos grupos nitro-heterocíclicos e benzofuroxano, a ciclização oxidativa da estrutura base dos análogos proporcionou a identificação de análogos oxazodiazolínicos com atividade frente a cepas de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Trypanosoma cruzi* (ISHII *et al.*, 2011).

Recentemente, foram identificados análogos nitrofurânicos promissores com atividade anti-*T. cruzi* superior ao benznidazol, fármaco utilizado na fase aguda da Doença de Chagas (Palace-Berl *et al.*, 2013). Além disso, os derivados nitrofurânicos com estrutura azometínica e oxadiazolidínica tem demonstrado grande potencial no desenvolvimento de novos antimicrobianos com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ZORZI *et al.*, 2014).

1.7 JUSTIFICATIVA

O surgimento de bactérias multirresistentes é uma ameaça global que precisa ser combatida. Essas bactérias têm sido associadas com infecções relacionadas à assistência à saúde, no entanto, diversos casos de infecções causadas por bactérias multirresistentes adquiridas na comunidade vêm sendo relatados, o que acendo um alerta sobre o risco de propagação destes micro-organismos para além do ambiente hospitalar.

Em todo o mundo, o consumo de antibióticos tem aumentado significativamente tanto nos setores diretamente relacionados à saúde, como também nos setores ligados à produção de alimentos como: agricultura, pecuária, suinocultura e avicultura. Sendo o uso destinado aos cuidados veterinários com animais de corte produtores de alimentos, um dos mais preocupantes atualmente. Aliado ao uso indiscriminado de antibióticos há de se considerar a disseminação de genes de resistência no meio ambiente, principalmente através de água de esgoto não tratado. Além disso, é importante observar a contribuição negativa do descarte irregular de lixo hospitalar, assim como a do descarte de resíduos provenientes do processo de fabricação de antibióticos pelas indústrias farmacêuticas. Em conjunto, esses fatores têm contribuído consideravelmente para o surgimento e propagação de novos mecanismos de resistência antimicrobiana. Outro fator preocupante é a velocidade com que estes novos mecanismos de resistência cruzam fronteiras internacionais se disseminando facilmente por todo o mundo. Este fato tem preocupado líderes mundiais, os quais consideram o aparecimento de “superbactérias” um pesadelo, que pode vir a ser em um futuro próximo uma catástrofe mundial.

Figura 16. Linha do tempo da descoberta de novos fármacos antimicrobianos (adaptado de SILVER, 2011).

As infecções causadas por bactérias multirresistentes aos antibióticos disponíveis na terapêutica (**Figura 16**), geram custos consideráveis aos sistemas de saúde. Na maioria dos casos, estas infecções exigem tratamentos prolongados e mais caros, com extensão do período de hospitalização (CDC, 2013).

Os antibióticos estão entre os medicamentos mais prescritos utilizados em medicina humana. Cerca de 50% de todos os antibióticos prescritos não são necessários, ou não são eficazes como esperado. Os antibióticos também são comumente usados em animais destinados ao consumo humano ou produtores de alimentos para: prevenir, controlar e tratar doenças

Os países que compõem o bloco chamado BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul) foram responsáveis pelo aumento global de 66% do consumo mundial de antibióticos entre os anos 2000 e 2010 (CDC, 2013).

Somente a Índia foi responsável por 23% do volume de vendas de antibióticos no varejo, enquanto que 53% do volume de vendas destinadas ao setor hospitalar foi atribuído a China. Em 2010 a Índia foi o maior consumidor de antibióticos do mundo, algo em torno de 13×10^9 unidades (≈ 11 unidades por pessoa) seguida pela China com 10×10^9 unidades (≈ 8 unidades por pessoa) e Estados Unidos com 7×10^9 unidades (≈ 22 unidades por pessoa) (LAXMINARAYAN, CHAUDHURY, 2016).

A situação da Índia é extremamente preocupante, visto que a taxa de mortalidade causada por infecções bacterianas é de aproximadamente 417 a cada 100.000 pessoas. Algo que pode ser explicado pela somatória de fatores como: sistemas de saúde precários, altas taxas de infecções relacionadas à assistência à saúde, infecções neonatais intratáveis e antibióticos baratos vendidos sem medidas de controle (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013).

Relatada pela primeira vez em 2009, a resistência do tipo New Dehli metalo- β -lactamase (NDM) foi identificada em cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Em pouco tempo, bactérias com esta mesma resistência foram isoladas em outras regiões da Índia, Paquistão, no Reino Unido, nos Estados Unidos, Canadá e Japão. No Brasil o primeiro caso de infecção causada por bactéria NDM-1 foi relatado em 2013 (TREVISOL *et al.*, 2016).

Um estudo encomendado pelo governo Britânico liderado pelo economista Jim O'Neill, criador do termo BRIC, sugere que seja colocado em prática o mais rápido possível, um plano de ações que requer bilhões de dólares em investimentos para tentar impedir que futuramente a medicina retroceda a era pré-antibiótico. A luta contra as infecções causadas por bactérias multirresistentes foi descrita pelas autoridades britânicas como “um risco tão grande quanto o terrorismo”. O problema é que os investimentos voltados ao desenvolvimento de novos

antimicrobianos são cada vez menores, enquanto isso os antibióticos já existentes estão sendo utilizados sem o devido controle (O'NEILL, 2014; BBC BRASIL, 2016).

O plano de ações sugeridas pela publicação recomenda:

- Uma campanha de conscientização global de caráter de urgência, já que a maioria das pessoas não sabem sobre os riscos deste problema;
- O estabelecimento de um Fundo de Inovação Global de US\$ 2 bilhões de dólares para pesquisa em estágio inicial;
- Melhorar o acesso a água limpa e, melhorar as condições de saneamento hospitalar para prevenir a propagação de infecções;
- Reduzir o uso desnecessário de antibióticos na agricultura, assim como o uso sem controle em humanos;
- Ampliar a vigilância do surgimento de novos mecanismos de resistência aos antibióticos;
- Fornecer incentivos financeiros voltados ao desenvolvimento de novos testes para impedir que os antibióticos sejam receitados quando eles não funcionarão.

A publicação explica ainda que, o pagamento por esse conjunto de ações poderia ser feito com uma pequena parte do atual orçamento para a saúde dos países, ou através de cobrança de impostos extras de indústrias farmacêuticas que não investirem em pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos (O'NEILL, 2014; BBC BRASIL, 2016).

Se não forem feitos investimentos neste momento, os custos com antibióticos poderão chegar a US\$ 100 trilhões de dólares na metade do século. Além disso, a situação deve piorar, visto que o estudo prevê um aumento gradual de mortes causadas por infecções multirresistentes que chegará, em 2050, ao nível de 10 milhões de pessoas mortas por ano, ou seja, uma pessoa irá morrer a cada 3 segundos em decorrência dessas infecções (O'NEILL, 2014; BBC BRASIL, 2016) (**Figura 17**). Recentemente foi identificado na China em isolados de *Escherichia coli* o gene que confere resistência as polimixinas como a colistina,

designado *mcr-1* (plasmid-mediated colistin resistance). O gene já foi encontrado em países da Europa, da Ásia e da África.

Figura 17. Mortes anuais atribuídas a resistência a antibióticos. Estimativa para 2050 (O'NEILL, 2014).

No Brasil, o gene foi identificado pela primeira vez em cepas de *Escherichia coli* isoladas de animais de produção das regiões Sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e Sul (Paraná e Santa Catarina) do país. Sendo o primeiro caso de infecção humano no Brasil reportado em um hospital de alta complexidade em Natal, Rio Grande do Norte. A cepa da bactéria portadora do gene apresentou resistência a colistina (polimixina E), antibiótico considerado como último recurso no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes (FAPESP, 2016).

Descoberta em 1949, a colistina teve sua produção descontinuada entre os anos de 1970 e 2000, devido a sua toxicidade ficando restrita ao uso veterinário. Entretanto, com a emergência de bactérias produtoras de enzimas responsáveis por provocar resistência a todos os antibióticos β -lactâmicos, a colistina voltou a ser utilizada como última alternativa no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes (LIU *et al.*, 2016).

A grande preocupação quanto ao gene *mcr-1* está relacionada com a facilidade com que este mecanismo de resistência é transferido entre diferentes espécies de bactérias por meio de

plasmídeos, fragmentos de DNA extracromossômicos que podem se replicar de maneira autônoma sendo transferidos para outras espécies de bactérias através de conjugação (FERNANDES *et al.*, 2016^{a, b}; LIU *et al.*, 2016; MARSTON *et al.*, 2016).

Cepas de bactérias que carregam o gene *mcr-1* tem sido encontrada tanto em animais de produção quanto em seres humanos, o que reforça as suspeitas que exista uma cadeia ou ciclo de disseminação de genes de resistência à colistina, que começa pelo uso do antibiótico em animais de corte, e que se propaga para os animais abatidos, alimentos derivados e o ambiente (FERNANDES *et al.*, 2016^{a, b}; LIU *et al.*, 2016; MARSTON *et al.*, 2016). Dada a magnitude do problema, o desenvolvimento de novos antimicrobianos é de grande relevância e, principalmente, uma questão com caráter de urgência para a saúde da população mundial.

2 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo, planejar, sintetizar e avaliar a atividade antimicrobiana de compostos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos buscando identificar novos análogos à nifuroxazida que apresentem potencial aproveitamento como fármaco com atividade antibacteriana frente a micro-organismos multirresistentes.

2.1 Objetivos específicos

- Planejar uma série de compostos com foco na identificação de um novo composto com melhor perfil de atividade antibacteriana em relação ao composto-protótipo, a nifuroxazida.
- Sintetizar e identificar a estrutura química dos compostos.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos obtidos frente a cepas bacterianas com caráter de multirresistentes.

2.2 Plano de Trabalho

O desenvolvimento deste trabalho foi dividido em etapas com intuito de atingir os objetivos especificados. O planejamento da série foi dividido em duas etapas, na qual, foram planejados 22 compostos com base na Regra dos cinco de Lipinski e, em uma segunda etapa, após a identificação de um composto promissor, foram planejados mais 4 compostos com base do Diagrama de Craig.

A etapa de síntese foi realizada no decorrer de todo o trabalho, uma vez que os compostos sintetizados têm um valor agregado, estes foram sintetizados de acordo com a necessidade de uso, seja na realização das etapas de identificação, assim como nas etapas de avaliação da atividade antimicrobiana.

As etapas de identificação dos compostos sintetizados foram realizadas no decorrer do processo de síntese, sendo a primeira etapa a análise de faixa de fusão, seguida pela ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN ^1H e ^{13}C) e análise elementar (CHN).

A última etapa prática foi composta pela avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados frente às cepas de bactérias multirresistentes, seguida pela análise total dos resultados. O fluxograma a seguir apresenta de maneira esquemática as etapas do trabalho de pesquisa.

Figura 18. Fluxograma das principais etapas experimentais do plano de trabalho.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

- 5-nitro-2-carbaldeído (5-nitro-2-furaldehyde, 99% – 170968 – Sigma-Aldrich®);
- 4-hidroxibenzidrazida (4-hydroxybenzhydrazide, 97% – H9882 – Sigma-Aldrich®);
- Aceto-hidrazida (Acethydrazide, 90% – A8309 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido hexanóico (Hexanoic acid, 99% – 153745 – Sigma-Aldrich®);
- Octano-hidrazida (Octanoic hydrazide, 80% – 293342 – Sigma-Aldrich®);
- Carbazato de etila (Ethyl carbazate, 97% – E16503 – Sigma-Aldrich®);
- 4-etoxi-benzidrazida (4-ethoxybenzohydrazide – PH010506 – Sigma-Aldrich®);
- Carbazato de *tert*-butila (tert-Butyl carbazate, 98% – B91005 – Sigma-Aldrich®);
- Cianoaceto-hidrazida (Cyanoacetohydrazide, 98% – C88602 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido 2-furóico (2-furoic acid, 98% – F20505 – Sigma-Aldrich®);
- Tiofeno-2-carbo-hidrazida (2-thiophenecarboxylic acid hydrazide, 98% – T1388 – Sigma-Aldrich®);
- 4-metil-1,2,3-tiadiazol-5-carbo-hidrazida (4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxylic acid hydrazide, 97% – 546399 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido ciclo-pentano carboxílico (Cyclopentanecarboxylic acid, 99% – C112003 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido ciclo-hexano carboxílico (Cyclohexanecarboxylic acid, 98% – 101834 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido benzóico (Benzoic acid, 99.5% – 242381 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido fenilacético – Instituto de Química USP;
- Benzenosulfonil-hidrazida (Benzenosufonyl hydrazide, 98% – B3809 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido 4-bifenil carboxílico (Biphenyl 4-carboxylic acid, 95% – B34729 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido 2-fenoxibenzóico (2-Phenoxybenzoic acid, 98% – 153176 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido 4-pentil-ciclo-hexano carboxílico (4-pentylcyclohexanecarboxylic acid, 97% – 261602 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido 4-pentil benzóico (4-pentylbenzoic acid, 99% – 230650 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido 4-heptil benzóico (4-heptylbenzoic acid, 97% – 230642 – Sigma-Aldrich®);

- Ácido 4-epitloxi benzóico ((4-heptyloxy)benzoic acid, 98% – 361666 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido 2-naftóico (2-naphthoic acid, 98% – 180246 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido 6-hidroxi-2-naftóico (6-hydroxy-2-naphthoic acid, 98% – 469157 – Sigma-Aldrich®).
- Ácido 6-amino-2-naftóico (6-amino-2-naphthoic acid, 90% – 512370 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido 6-metoxi-2-naftóico (6-methoxy-2-naphthoic acid, 97% – 537268 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido 6-flúor-2-naftóico (6-fluoro-2-naphthoic acid, 97% – 638862 – Sigma-Aldrich®);
- Ácido sulfúrico P. A., A. C. S (Labsynth®);
- Ácido acético glacial P. A.; A. C. S (Labsynth®).

3.1.2 Solventes

- Acetato de etila P. A.; A. C. S (Labsynth®);
- Acetonitrila P. A.; A. C. S (Labsynth®);
- Álcool etílico P. A.; A. C. S (Labsynth®);
- Álcool metílico P. A.; A. C. S (Labsynth®);
- Dimetilsulfóxido P. A.; A. C. S (Labsynth®);
- Dimetilsufóxido deuterado 99.5% (DMSO-*d*₆) – Cambridge Isotope Laboratories, Inc;
- Glicerol P. A.; A. C. S (Labsynth®);
- *N, N*-dimetilformamida (DMF) P. A.; A. C. S (Labsynth®);
- Pentóxido de fósforo P. A.; A. C. S (VETEC®).

3.1.3 Meios de Cultivo

Mueller Hinton (Difco™ Mueller Hinton Agar. BD Becton Dickinson & Company)

Composição:

Infusão de carne	300 g/L
Hidrolisado de caseína	17,5 g/L
Amido	1,5 g/L
Ágar	17 g/L

Caldo Mueller Hinton II com ajuste de cátions (BBL™ Mueller Hinton II Cation Adjusted. BD Becton Dickinson & Company)

Composição:

Infusão de carne	300 g/L
Hidrolisado de caseína	17,5 g/L
Amido	1,5 g/L

Caldo Triptona de Soja (TSB, Trypticase Soy Broth) HIMEDIA®

Composição:

Caseína enzimática hidrolisada	17 g/L
Digestão Papaica de Soja	3,0 g/L
Dextrose	2,5 g/L
Cloreto de sódio	5,0 g/L
Fosfato dipotássico	2,5 g/L

Ágar Sangue

Composição:

Meio comercial: Blood Ágar Base, Columbia Agar Base, BHI Ágar, Mueller Hinton Ágar, Sangue desfibrinado de carneiro ou coelho.

5 mL para cada 100 mL de base.

3.1.4 Softwares

- ChemDraw-Ultra 12. Cambridge Soft®. Copyright© 1986-2010 Cambridge Soft;
- Edraw Max 6. Versão 6. 0. Copyright© by Edraw Soft;
- GraphPad Prism® Versão 6.01. Copyright© 1992-2012. GraphPad Software, Inc;
- HyperChem™. Molecular Modeling System. Copyright© 1995-2009. HyperChem, Inc;
- Marvin Beans. Marvin View 16. 3. 7. 0. Copyright© 1998-2016 ChemAxon Ltd;
- MestRe-C versão 5. 0. MestreLab Research, Trial, Inc: 2006, Santiago de Compostela, Spain;
- OriginPro 9 (64-bit) SR2 b87. Copyright© 1991-2013. OriginLab Corporation.

3.2 Bactérias

As bactérias utilizadas neste trabalho foram isoladas de pacientes com infecções hospitalares e cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka coordenadora do Laboratório de Microbiologia Clínica, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e, pelas farmacêuticas microbiologistas Cristiane Myka Fujii e Silvia Regina dos Santos, responsáveis pelo Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Entre as bactérias utilizadas nos ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados estão:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213;
- *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (ORSA, Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus*);
- *Staphylococcus aureus* cepa heterogênea com resistência intermediária à vancomicina (hVISA, heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*) – FCFHV36;
- *Staphylococcus epidermidis* resistente a linezolida com caráter de multirresistência (MDR, Multidrug-Resistant);
- *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina fenótipo *vanA* (VRE, Vancomycin-Resistant Enterococci).

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Síntese dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos

A síntese dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos foi constituída de duas etapas de síntese: 1 – Esterificação seguida de hidrazinólise para obtenção de hidrazidas substituídas e 2 – Reação de condensação para obtenção das bases de Schiff. A síntese dos compostos foi realizada no Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos (LPDF) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) coordenado pelo Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares, orientador deste trabalho. As etapas da rota sintética para obtenção dos compostos planejados estão representadas na figura a seguir.

Condições reacionais: (i) CH₃OH (20 mL), H₂SO₄ (0,5 mL), refluxo/4h. + N₂H₄ 80 % aq. (v/v) (10 mL), refluxo/1h.; (ii) H₂O (8 mL), H₂SO₄ (7 mL), CH₃COOH (8 mL), CH₃OH (20 mL), refluxo/1h. ou C₂H₅OH t. a./12h. **R**: grupos alquil, cicloalquil, heterocíclicos, benzeno e, naftaleno substituídos

Figura 19. Etapas da rota sintética para obtenção dos compostos planejados.

3.3.2 Síntese de hidrazidas substituídas

As hidrazidas substituídas foram sintetizadas através de reação de esterificação seguida de hidrazinólise. Na reação de esterificação 0,001 mol de ácidos carboxílicos com pureza entre 80 e 98% (Sigma-Aldrich®) foram dissolvidos em 20 mL de metanol P. A., (excesso de 1:50) aos quais adicionaram-se 0,5 mL (1 mmol) de ácido sulfúrico P. A. como catalisador. O sistema foi mantido sob refluxo por 4 horas. Em seguida, sem isolar o intermediário éster (**Figura 20**), adicionou-se ao meio reacional 10 mL de hidrato de hidrazina aquosa 80% (v/v) em excesso, mantendo o sistema reacional sob refluxo por mais 1 hora. Após o término da reação, o sistema foi mantido aberto sob aquecimento e agitação por 5 minutos, a fim de evaporar parte do álcool e concentrar o composto de interesse. Concluída esta etapa, o sistema foi resfriado e mantido sob temperatura entre 4 e 8 °C até a cristalização da hidrazida substituída. A hidrazida substituída, **II**, foi filtrada em sistema sob pressão reduzida e seca em presença de pentóxido de fósforo. É importante ressaltar que todas as hidrazidas já estavam disponíveis em nosso laboratório, com exceção das hidrazidas referentes aos compostos **c23**, **c24**, **c25** e **c26**. Embora disponíveis, elas foram sintetizadas novamente ao longo do trabalho de pesquisa.

Condições reacionais: (i) CH₃OH (20 mL), H₂SO₄ (0,5 mL), refluxo/4h.; (ii) N₂H₄ 80% aq. (10 mL), refluxo/1h. **R**: grupos alquil, cicloalquil, heterocíclicos, benzeno e, naftaleno substituídos

Figura 20. Rota de síntese das hidrazidas substituídas

3.3.3 Síntese de bases de Schiff

O processo de síntese de bases de Schiff, **III**, ocorre por meio de reação de condensação entre as hidrazidas substituídas, **II**, e o 5-nitro-2-furaldeído com pureza de 98% (Sigma-Aldrich®) (COSTA *et al.*, 2012).

Condições de reação: (ii) H_2O (8 mL), H_2SO_4 (7 mL), CH_3COOH (8 mL), CH_3OH (20 mL), refluxo/1h ou C_2H_5OH (10 mL) t. a./12h. **R**: grupos alquil, cicloalquil, heterocíclicos, benzeno e, naftaleno substituídos

Figura 21. Rota de síntese das bases de Schiff

Em meio reacional contendo água, ácido sulfúrico, ácido acético e metanol, na proporção 8:7:8:20 (v/v) adicionou-se 0,001 mol de hidrazida substituída. Após total solubilização da hidrazida adicionou-se 0,001 mol de 5-nitro-2-furaldeído previamente solubilizado em pequena quantidade de metanol a temperatura entre 35 e 40 °C. Durante a reação o meio reacional foi mantido sob refluxo e agitação magnética constante. Ao término da reação adicionou-se água destilada gelada no meio reacional, observando-se a formação imediata de sólido amorfo da base de Schiff (5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida substituída), **III**. O sólido obtido na reação foi isolado através de filtração sob pressão reduzida, lavado com água destilada gelada e, seco em presença de pentóxido de fósforo. Após secagem o sólido foi cristalizado de acetonitrila e/ou *N, N*-dimetilformamida (DMF). Uma vez solubilizado em temperatura entre 50 e 60 °C o composto foi filtrado, resfriado e armazenado em temperatura ambiente até a formação de cristais, para posteriormente ser novamente isolado e seco em presença de pentóxido de fósforo.

3.4 Identificação dos compostos sintetizados

Os compostos obtidos foram analisados inicialmente através da determinação da faixa de fusão em capilar utilizando aparelho digital (Büchi, modelo M-560), e a confirmação da estrutura química dos compostos sintetizados foi feita através de análise de ressonância

magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ^1H e ^{13}C) realizada em espectrômetro Bruker, modelo Advance DPX-300 MHz, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da FCF/USP utilizando dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna da análise. Os espectros obtidos foram analisados com auxílio do programa MestRe-C (versão 5.0, MestreLab Research, Trial, Inc: 2006, Santiago de Compostela, Spain).

A análise elementar dos compostos foi realizada em analisador CHN, modelo Elemental Analyser 24013 CHN (Perkin Elmer®), na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP).

3.5 Preparo das soluções dos compostos e fármacos de referência

Massa equivalente a $40.000\ \mu\text{M}$ ($40\ \text{mM}$) considerando o peso molecular de cada composto e fármaco de referência foi pesada utilizando balança analítica de 4 casas decimais (OHAUS®), diluída em 5 mL de DMSO, e homogeneizada em agitador vortéx. As soluções obtidas foram fracionadas em tubos criogênicos contendo volume total de 1 mL. A partir da solução a $40.000\ \mu\text{M}$ ($40\ \text{mM}$) foi preparada solução a $10.000\ \mu\text{M}$ ($10\ \text{mM}$) e a $160\ \mu\text{M}$ ($0.16\ \text{mM}$) sendo está a concentração de partida para a realização dos ensaios.

Figura 22. Esquema representativo das etapas que compõe o processo de síntese e preparo das soluções estoque dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.

3.6 Ensaios microbiológicos de avaliação da atividade antimicrobiana

Os ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos foram realizados com base nos testes quantitativos de sensibilidade a agentes antimicrobianos por método de diluição para bactérias de crescimento aeróbio, norma M07-A9 (2012), e nos métodos de padrões de crescimento para testes de suscetibilidade a antimicrobianos, vigésimo terceiro suplemento informativo, M100-S23 (2013), ambos aprovados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

A atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados foi avaliada frente aos seguintes micro-organismos Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (ORSA, Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), *Staphylococcus aureus* cepa heterogênea com resistência intermediária à vancomicina (hVISA, heterogeneous Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*) – FCFHV36, *Staphylococcus epidermidis* resistente à linezolida com caráter de multirresistência (MDR, Multidrug-Resistant) e *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina fenótipo *vanA* (VRE, Vancomycin-Resistant Enterococci).

As cepas de *Staphylococcus aureus* hVISA–FCFHV36; *Staphylococcus epidermidis* MDR e *Enterococcus faecalis* VRE foram cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka, coordenadora do Laboratório de Microbiologia Clínica, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. As cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina foram obtidas do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP), as quais foram cedidas gentilmente pela Dra. Cristiane Mika Fujii e Dra. Silvia Regina dos Santos, farmacêuticas e microbiologistas do HU/USP.

As cepas recebidas dos laboratórios de microbiologia foram semeadas em meio de cultivo líquido (BBL™ Mueller Hinton II Broth Cation Adjusted. BD Becton Dickinson & Company). Após crescimento de 24 horas a 35 °C em incubadora B.O.D TE-391 TECNAL®. As cepas foram preservadas em tubos criogênicos contendo 20 % de glicerol e armazenadas em freezer a -20 °C (ATCC, 2013).

Figura 23. Esquema representativo das etapas de cultivo e preservação das cepas de bactérias multirresistentes.

3.7 Microdiluição dos compostos e preparo do branco analítico

A microdiluição dos compostos foi realizada em triplicata utilizando microplacas de fundo chato de volume máximo de 200 µL. Os ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos frente as cepas de bactérias multirresistentes, iniciou-se a partir da solução de concentração 160 µM (0.16 mM) em 100% de DMSO.

Inicialmente, foram adicionados na linha **A**, 20 µL de cada composto e fármaco de referência a concentração de 160 µM (0.16 mM) (100% de DMSO) e 80 µL de caldo Mueller Hinton. Assim, obteve-se concentração de 32 µM (20% de DMSO) de cada composto e fármaco de referência, sendo este procedimento repetido na linha **B**.

Da linha **C** até **G** foram adicionados 100 µL de caldo Mueller Hinton contendo 20% de DMSO. Em seguida pipetou-se 100 µL de caldo Mueller Hinton contendo 20% de DMSO e procedeu-se diluição seriada a partir da linha **B** contendo 100 µL de solução a 32 µM (20% DMSO) até a linha **G**. Ao final desta etapa foram obtidas as seguintes concentrações em cada linha: **A – 32 µM; B – 16 µM; C – 8 µM; D – 4 µM; E – 2 µM; F – 1 µM; G – 0.5 µM**. Na linha **H** foram adicionados 200 µL de caldo Mueller Hinton, sendo este controle negativo de crescimento do micro-organismo.

Figura 24. Esquema representativo das etapas de microdiluição dos compostos e preparo do branco analítico em microplacas de fundo chato

3.8 Preparo do inóculo e adição as microplacas com compostos previamente microdiluídos

As cepas de micro-organismos avaliados neste trabalho foram cultivadas em tubos de ensaio com volume de 5 mL contendo caldo Mueller Hinton II com ajuste de cátions por 24 horas a 35 °C em incubadora B.O.D., Após este período, cerca de 400 a 500 μ L da suspensão bacteriana foi pipetada e transferida para outro tubo contendo o mesmo volume do meio de cultivo. Neste repique o micro-organismo permaneceu incubado de 6 a 8 horas, período necessário para atingir crescimento exponencial. Em seguida, volume entre 400 e 500 μ L foram pipetados e transferidos para um tubo contendo 5 mL de meio de cultivo. Este foi homogeneizado e volume de 1 mL foi pipetado e colocado em uma cubeta, a qual foi analisada em espectrofotômetro UV/VIS PG Instrument Ltd em $\lambda = 620$ nm. Para o ajuste da turbidez foi considerado o valor de densidade óptica, D.O., entre 0.08 e 0.10, equivalente a 0.5 na escala McFarland, o que corresponde a cerca de 1 a 2×10^8 UFC/mL (**Figura 25**).

Ajustada a turbidez, 1 mL do tubo correspondente a suspensão bacteriana ajustada foi pipetado e transferido para um frasco contendo 99 mL de solução fisiológica a 0.9%. Este foi mantido sob agitação magnética branda em Agitador Magnético SpeedSafe™ by HANNA por 15 minutos, gerando suspensão bacteriana da ordem de 10^6 UFC/mL em relação à inicial.

Decorrido 15 minutos, 1 mL da suspensão bacteriana contendo 10^6 UFC/mL presente na solução fisiológica foi transferido para um segundo frasco contendo 99 mL de caldo Mueller Hinton. Este foi mantido sob agitação branda por mais 15 minutos, gerando suspensão bacteriana da ordem de 10^4 UFC/mL, sendo está a suspensão bacteriana utilizada para avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos frente as cepas multirresistentes.

É importante salientar que não foram utilizadas pérolas de vidro nos frascos contendo solução fisiológica 0.9% e caldo Mueller Hinton, nas duas últimas etapas de ajuste da suspensão bacteriana. Isto se deve ao fato de que cepas de bactérias utilizadas neste trabalho não apresentam crescimento celular coeso a ponto de necessitar de separação através da colisão mecânica entre as pérolas de vidro. Além disso, a utilização de pérolas de vidro nessa etapa pode causar a destruição das células bacterianas. Com a adição de 100 μ L de inóculo da linha **A** até **G** foram obtidas as concentrações de interesse no processo de avaliação da atividade antimicrobiana (**A** – 16 μ M; **B** – 8 μ M; **C** – 4 μ M; **D** – 2 μ M; **E** – 1 μ M; **F** – 0.5 μ M; **G** – 0.25 μ M). O mesmo procedimento foi realizado para o preparo do **BRANCO** analítico dos compostos e fármacos de referência, sendo utilizado caldo Mueller Hinton ao invés de inóculo nesta etapa.

Figura 25. Esquema geral das etapas realizadas durante o ensaio de avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos frente as cepas multirresistentes.

Figura 26. Esquema representativo das concentrações finais dos compostos e fármacos de referência após adição do inóculo as microplacas

3.9 Determinação da atividade antimicrobiana

A determinação dos valores de atividade antimicrobiana dos compostos foi inicialmente analisada através da concentração inibitória mínima (*MIC*, *Minimum Inhibitory Concentration*), determinada por meio de leitura espectrofotométrica em $\lambda = 620$ nm, realizada em leitor de microplaca EZ Reader 400 – Biochrom®, após período de 16 a 18 horas de incubação das microplacas a 35 °C. Os valores de densidade óptica D.O., obtidos a partir da leitura espectrofotométrica das microplacas, foram convertidos em valores percentuais de inibição do crescimento bacteriano por meio da *Equação 1*.

$$MIC = \frac{(Mcp \times |a - b|)}{Mcp} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

MIC: concentração inibitória mínima

Mcp: média do controle positivo

a: densidade óptica correspondente a amostra

b: densidade óptica correspondente a leitura do branco analítico

Os valores percentuais de inibição do crescimento dos micro-organismos foram analisados com auxílio do software *OriginPro 9.0.0* SR b87 (Copyright© 1991-2013 OriginLab Corporation), por meio da *Equação 2*.

$$y = A1 + \frac{A2 - A1}{1 + 10^{-(\text{Log}x_0 - x)p}}$$

Equação 2

Em que:

y: variáveis independentes

x: variáveis dependentes

A1: assíntota inferior (menor valor de *y*)

A2: assíntota superior (maior valor de *y*)

LOGx0: centro ou ponto médio da curva

p: inclinação da curva

Figura 27. Curva dose-resposta e condições de ajuste (OriginPro 9). $A1 < A2$; assíntota inferior: $A1 = 1$; assíntota superior: $A2 = 2$; centro ou ponto médio da curva: $\text{Log}x_0 = -1$; inclinação da curva: $p = -0.2$.

Leitura espectrofotométrica
 $\lambda = 620 \text{ nm}$

Determinação da MIC no Microsoft Excel

Porcentagem de Inibição de Crescimento
Concentração Inibitória Mínima

$$MIC = \frac{(Mcp \times |a - b|)}{Mcp} \times 100$$

$$y = A1 + \frac{A2 - A1}{1 + 10^{\text{Log}x0 - x} p}$$

$y = A2$
 $y = p \cdot \ln(10) \cdot (A2 - A1)$
 $\text{Log}x0, (A1 + A2)/2$
 $y = A1$

Figura 28. Esquema representativo das etapas de análise estatística dos resultados

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Planejamento da série de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos

Os compostos da série 5-nitro-2-furfurilidênicos deste trabalho foram desenvolvidos com base na estratégia de planejamento com base na estrutura do ligante (LBDD, Ligand-Based Drug Design). Nesta estratégia, uma molécula com atividade já conhecida é utilizada como esqueleto para novas modificações químico-estruturais que permitem a identificação de novos análogos de melhor atividade em relação ao composto-protótipo. Neste sentido foi utilizado como composto-protótipo, a nifuroxazida (**Figura 29**), um fármaco utilizado no tratamento de infecções bacterianas durante os anos de 1970 e 1980.

Figura 29. Estrutura química da nifuroxazida. Em destaque a ligação imina característica de bases de Schiff

A nifuroxazida foi escolhida não apenas por se tratar de uma molécula conhecida, mas também por ser uma molécula simples, de fácil obtenção sintética e que permite a realização de diversas modificações. Para auxiliar o processo de obtenção de novas moléculas aproveitáveis como possíveis candidatos a fármacos antimicrobianos foram considerados os parâmetros estabelecidos pela Regra dos 5 de Lipinski.

Tais parâmetros auxiliam a identificação de compostos com base em características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, o que favorece a obtenção de compostos com melhor biodisponibilidade, com vistas à administração por via oral. Esses parâmetros são: massa molar < 500 Da., logaritmo do coeficiente de partição, ClogP < 5, número de átomos doadores de ligação de hidrogênio < 5 (HBD, Hydrogen Bond Donors), número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio < 10 (HBA, Hydrogen Bond Acceptors). A utilização desses parâmetros como referência na busca por novos compostos ficou conhecida como Regra dos 5, uma vez que, para cada um dos quatro parâmetros analisados, os valores encontrados eram próximos de cinco ou múltiplos de cinco. Tal regra estabelece que uma absorção ou permeabilidade reduzida será mais comum quando houver mais do que 5 doadores de ligação de hidrogênio (expresso pela soma de –OH e –NH na molécula); quando a massa molar for maior do que 500 Da; quando

ClogP for maior do que 5; e quando houver mais do que 10 átomos aceptores de ligação de hidrogênio (expresso pela soma de átomos de N e O) (LIPINSKI, 2000; LIPINSKI *et al.*, 2001, LIPINSKI, 2004).

A chamada Regra dos 5 ficou conhecida após estudos estatísticos realizados pelo professor Christopher Andrew Lipinski nos anos de 1990, período em que supervisionava os laboratórios de química medicinal da Pfizer em Groton, Connecticut, EUA. Nesses estudos, Lipinski estabeleceu algumas das propriedades moleculares utilizadas como filtros para obtenção de novos fármacos.

Nesse mesmo período, em 1998, Ghose, Viswanadhan e Vendolosk complementaram os estudos realizados por Lipinski ao apresentarem modificações nos valores de massa molar para o intervalo de 180 a 500 (Da, u, ou g); intervalo de valores de ClogP entre -0,4 e 5,6. Além de incluírem parâmetros como a refratividade molar (MR, Molar Refractivity) variando entre 40 e 130; número de átomos da molécula entre 20 e 70, assim como a inclusão do parâmetro área de superfície polar (PSA, Polar Surface Area) sendo $< 140 \text{ \AA}^2$ (GHOSE, VISWANADHAN, VENDOLOSKI, 1998).

Anos depois, outra extensão da Regra dos 5 proposta por Lipinski foi apresentada após a realização do estudo de uma série de compostos ensaiados *in vivo* utilizando modelo murino. Neste estudo, compostos com número de ligações rotacionáveis menor do que 10, PSA $< 140 \text{ \AA}^2$ e/ou a soma do número de átomos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio < 12 apresentaram melhor biodisponibilidade oral neste modelo animal. Foi observado ainda que o número de ligações rotacionáveis possui um efeito deletério na velocidade de permeação (VEBER *et al.*, 2002).

Assim, foram considerados no planejamento dos compostos descritores como ClogP, Massa Molar, HBD, HBA, MR, número de átomos da molécula, número de ligações rotacionáveis e PSA, os quais foram calculados utilizando programa *Marvin Beans* (*Marvin Beans*, version 16.3.7.0; ChemAxon Ltd.: 2016, Budapeste, Hungria).

As modificações químico-estruturais foram realizadas a partir da substituição do grupo fenila do composto-protótipo nifuroxazida por grupos: alifáticos, ciclo-alifáticos, heterocíclicos, benzeno e, naftaleno substituídos. A série constituída de 26 compostos foi planejada com o intuito de obter variações estruturais que permitissem avaliar a influência dos grupos substituintes sob a hidrofobicidade, assim como no efeito eletrônico e topológico de cada molécula. Dos 26 compostos apresentados, 4 são inéditos para os estudos realizados com bactérias multirresistente (**c23**, **c24**, **c25**, **c26**), uma vez que, os demais são parte da série

estudada quanto a atividade frente a cepas resistentes de *Trypanosoma cruzi*. Estudo realizado pela doutoranda Fanny Palace-Berl. As estruturas são apresentadas na **Figura 30** e os descritores moleculares na **Tabela 2**.

Figura 30. Estrutura química dos grupos substituintes dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.

Tabela 2. Descritores moleculares considerados no planejamento da série de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos

Compostos	ClogP _{MP}	MM	HBD	HBA	MR	n.º de átomos	Lig. Rotáveis	PSA (Å)	
c1	0.20		1	7	46.53	21	5	100.42	
c2	2.23	222.28	1	7	64.96	33	7	100.42	
c3	3.57	295.33	1	7	78.77	42	10	100.42	
c4	1.33	227.16	1	4	52.91	25	5	109.65	
c5	2.18	303.27	1	5	78.42	35	6	109.65	
c6	2.00	255.33	1	7	60.24	30	5	100.42	
c7	0.15	222.16	1	8	51.86	22	4	124.21	
c8	1.04	249.18	1	4	59.60	25	4	113.56	
c9	1.97	265.00	1	7	64.09	25	4	100.42	
c10	0.91	281.25	1	9	65.88	26	4	126.21	
c11	1.84	251.24	1	7	63.14	31	4	100.42	
c12	2.31	265.27	1	7	67.74	34	5	100.42	
c13	2.05	259.22	1	7	67.20	28	4	100.42	
c14	2.03	273.24	1	7	71.26	31	5	100.42	
c15	1.93	323.28	1	10	75.23	31	5	134.56	
c16	3.70	335.31	1	7	92.34	38	5	100.42	

Continua...

Tabela 2 Descritores moleculares considerados no planejamento da série de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos

Compostos	ClogP _{MP}	MM	HBD	HBA	MR	n.º de átomos	Lig. Rotáveis	PSA (Å ²)	
c17	3.55	351.09	1	8	93.45	39	6	109.65	
c18	4.15	335.40	1	4	90.69	49	8	100.42	
c19	4.14	329.35	1	4	90.65	43	8	100.42	
c20	4.93	357.41	1	4	99.85	49	10	100.42	
c21	4.23	373.40	1	5	101.34	50	11	109.65	
c22	3.04	309.28	1	7	83.65	34	4	100.42	
c23	2.74	325.28	2	7	85.64	35	4	120.65	
c24	2.31	324.29	2	5	88.36	36	4	126.44	
c25	2.84	339.30	1	5	90.12	38	5	109.65	
c26	3.23	327.27	1	4	83.87	34	4	100.42	
c27 nifuroxazida	1.80	275.22	2	5	69.19	29	4	120.65	

Descritores moleculares considerados como requisitos para o planejamento dos compostos. LIPINSKI, 2001, “Regra dos 5”: ClogP < 5, MM < 500, HBD < 5, HBA < 10; GHOSE, VISWANADHAN, WENDOLOSKI, 1998: ClogP entre -0.4 a 5.6, MR de 40 a 130, MM de 180 a 500, n.º de átomos de 20 a 70, PSA < 140 Å²; VEBER *et al.*, 2002: ligações rotacionáveis < 10, PSA < 140 Å². Descritores calculados no programa Marvin Beans, versão MarvinView 16.3.7.0, Copyright® 1998-2016 ChemAxon Ltd. ClogP: logaritmo do coeficiente de partição calculado pelo método ponderado, considerando pesos iguais aos métodos VISWANADHAN *et al.*, 1989; KLOPMAN *et al.*, 1994; e banco de dados PHYSPROP®; MM: massa molar (Dalton, Da; unidade de massa atômica, u. m. a.; ou gramas, g); HBD: número de átomos doadores de ligação de hidrogênio; HBA: número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio; MR: refratividade molar; n.º de átomos: número de átomos que constituem a molécula; ligações rotáveis: número de ligações rotacionáveis presentes na molécula; PSA: área de superfície polar (Å²).

Figura 31. Gráficos de dispersão dos descritores moleculares considerados no planejamento dos compostos 5-nitro-2-furilidênicos. LIPINSKI, 2001, “Regra dos 5”: ClogP < 5, MM < 500, HBD < 5, HBA < 10; GHOSE, VISWANADHAN, WENDOLOSKI, 1998: ClogP entre -0.4 a 5.6, MR de 40 a 130, MM de 180 a 500, n.º de átomos de 20 a 70, PSA < 140 Å²; VEBER *et al.*, 2002: ligações rotacionáveis < 10, PSA < 140 Å².

Inicialmente, o conjunto da série de compostos foi constituído de 15 moléculas (**c1**, **c2**, **c3**, **c6**, **c7**, **c9**, **c10**, **c11**, **c12**, **c13**, **c14**, **c15**, **c16**, **c17** e **c22**), as quais já estavam sendo avaliadas quanto a atividade frente a cepas resistentes de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, em trabalho desenvolvido pela Doutoranda Fanny Palace-Berl. No primeiro momento, estes compostos foram avaliados frente as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* MDR e *Enterococcus faecalis* VRE. Sendo resultados obtidos durante essa primeira etapa de avaliação de atividade antimicrobiana, apresentados no exame de qualificação deste trabalho.

Do conjunto de compostos avaliados o composto **c22** apresentou melhor atividade antimicrobiana do que a nifuroxazida frente as três cepas inicialmente avaliadas (**c22**: *S. aureus* ATCC 29213: $IC_{90} = 0.62 \pm 0.07 \mu M$, $MIC_{90} \leq 0.25 \mu g/mL$, $Log1/IC_{90} = 6.21$; *S. epidermidis*: $IC_{90} = 1.81 \pm 0.09 \mu M$, $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$, $Log1/IC_{90} = 5.74$; *E. faecalis*: $IC_{90} = 2.06 \pm 0.13 \mu M$, $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$, $Log1/IC_{90} = 5.69$), enquanto (**NF**: *S. aureus*: $IC_{90} = 2.39 \pm 0.08 \mu M$, $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$, $Log1/IC_{90} = 5.62$; *S. epidermidis*: $IC_{90} = 4.36 \pm 0.54 \mu M$, $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$, $Log1/IC_{90} = 5.36$; *E. faecalis*: $IC_{90} = 5.09 \pm 0.08 \mu M$, $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$, $Log1/IC_{90} = 5.29$).

Figura 32. Composto **c22** (*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida).
Composto eleito líder da série inicial.

A partir dos dados de atividade antimicrobiana observados em relação ao composto **c22**, este foi eleito como composto líder para realização de novas modificações químico-estruturais. Para realização das modificações foi adotado como estratégia de planejamento o Diagrama de Craig (CRAIG, 1971), que permite correlacionar duas propriedades moleculares, a constante de hidrofobicidade π , determinada por Hansch para sistemas benzênicos *para* ou *meta* substituídos, a qual é estatisticamente independente da constante de efeito eletrônico σ determinada por Hammett. A dispersão gráfica obtida da correlação entre as propriedades de efeito eletrônico e hidrofobicidade, permite a seleção de grupos substituintes presentes nos diferentes quadrantes, evitando selecionar substituintes colineares (TAVARES, 2004).

Utilizando-se o Diagrama de Craig, foram selecionados quatro grupos substituintes na posição 15 do naftaleno. Entre os grupos selecionados estão o F de característica mais eletrônica e mais hidrofóbica ($+\sigma +\pi$), e os grupos OH, NH₂ e OCH₃, os quais se encontram no quadrante caracterizado por grupos menos eletrônicos e mais hidrofílicos ($-\sigma -\pi$) (HANSCH, LEO, 1995; HANSCH, LEO, HOEKMAN 1995). Além dos compostos com variações na posição 15 do grupo naftaleno foram ainda inseridos no conjunto os compostos **c4**, **c5**, **c8**, **c18**, **c19**, **c20**, **c21**, todos de acordo com o planejamento baseado na Regra dos 5 de Lipinski (2001).

Figura 33. Estrutura do composto **c22** (*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida).
R₁₅: posição dos grupos substituintes.

Figura 34. Diagrama de Craig. Em vermelho grupos selecionados para as novas substituições com base no composto **c22** (*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida).

4.2 Síntese dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos

A rota sintética para obtenção dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos é constituída de duas etapas. As etapas de síntese usadas foram direcionadas para obtenção dos reagentes intermediários hidrazídicos, os quais foram obtidos através de reação de esterificação de Fischer seguida de hidrazinólise, obtendo-se o intermediário hidrazídico utilizado na etapa de reação de adição nucleofílica para formação da ligação imina e consequente obtenção dos compostos de interesse.

4.3 Síntese e identificação das hidrazidas substituídas

As hidrazidas substituídas foram obtidas através de rota sintética envolvendo reações de esterificação seguida de hidrazinólise, sem o isolamento dos respectivos ésteres intermediários como descrito na literatura (JORGE *et al.*, 2011; NARANG, NARASIMHAN, SHARMA, 2012; PALACE-BERL *et al.*, 2013; ZORZI *et al.*, 2014). Nesta reação, a hidrazinólise é favorecida pelo álcool proveniente da esterificação, o qual mantém o éster solúvel e, associado ao meio ácido, facilita a protonação do carbono carbonílico do éster, tornando-o mais susceptível ao ataque nucleofílico pela hidrazina, promovendo a hidrazinólise e, consequentemente, a formação de hidrazidas (MORRISON, BOYD, 1994).

A reação de esterificação de Fisher é caracterizada por ser reversível, onde o ácido catalisa tanto a reação direta, ou seja, catalisa tanto a formação de éster, assim como a reação inversa que consiste na hidrólise do éster formado. Assim, quando o equilíbrio é atingido, permanece no meio reacional uma quantidade considerável de reagentes (SOLOMONS, FRYHLE, 2004). Para deslocar o equilíbrio no sentido da formação de produtos, pode-se remover um dos produtos ou utilizar excesso de um dos reagentes. Levando-se em consideração essas condições, optou-se pelo excesso de metanol, por ter baixo custo, além de favorecer a reação subsequente, a hidrazinólise (CAREY, SUNDBERG, 2000; MARCH, 2001).

O mecanismo reacional de esterificação de Fisher, **Figura 35**, inicia-se pela protonação do oxigênio carbonílico do ácido carboxílico (**I**). Este próton é proveniente da transferência do metanol (**A**), o qual se apresenta protonado devido ao meio reacional ácido. Em seguida ocorre ataque nucleofílico do metanol (**B**) no carbono carbonílico do intermediário protonado (**I-a**). Após este ataque, o intermediário formado (**I-b**) perde um próton formando intermediário tetraédrico neutro (**I-c**).

R: grupos alquil, cicloalquila, heterocíclicos, benzeno e, naftaleno substituídos.

Figura 35. Mecanismo de esterificação de Fisher (adaptado de MARCH, 2001).

Posteriormente este intermediário sofre protonação em uma de suas hidroxilas, desencadeando a perda de uma molécula de água (**I-d**). Por fim, ocorre a perda de um próton deste intermediário (**I-e**), obtendo-se assim o éster (**I/II**) (CAREY, SUNDBERG, 2000; MARCH, 2001; SOLOMONS, FRYHLE, 2004).

A reação de hidrazinólise, segunda etapa da rota sintética consiste em reação de substituição nucleofílica por adição-eliminação (**Figura 36**). Esta reação ocorre quando o carbono carbonílico do éster (**I/II**), deficiente de elétrons, sofre ataque nucleofílico da hidrazina (**A**), formando intermediário instável (**I/II-a**), que resulta no intermediário (**I/II-b**). Este por sua vez é dissociado (**I/II-c**) ocorrendo eliminação alcóxica (**B**) em decorrência do prototropismo do hidrogênio ligado ao oxigênio carbonílico (**I/II-c**) obtendo-se assim a hidrazida (**II**) (CAREY, SUNDBERG, 2000; MARCH, 2001; SOLOMONS, FRYHLE, 2004).

As hidrazidas substituídas foram identificadas por meio da faixa de fusão determinada experimentalmente e comparada com dados da literatura, sendo verificado que para todas as hidrazidas o intervalo de faixa de fusão foi estreito e próximo aos valores descritos na literatura, o que indica pureza destes intermediários. O rendimento do intermediário **II-22** foi menor do que 57%, ao contrário do intermediário **II-16** que apresentou rendimento maior do que 98%.

R: grupos alquil, cicloalquila, heterocíclicos, benzeno e, naftaleno substituídos.

Figura 36. Mecanismo de reação de hidrazinólise (adaptado de MARCH, 2001).

Os intermediários hidrazídicos, **1**, **3**, **6**, **7**, **9**, **10** e **15** foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich®) com pureza entre 97 e 99%, exceto a hidrazida correspondente ao composto **3**, que foi adquirida com pureza de 80%, e purificada através de cristalização de acetato de etila P.A. (Labsynth®) a fim de evitar possíveis interferências na etapa subsequente que é a formação de bases de Schiff.

4.4 Síntese e identificação de bases de Schiff

A síntese dos compostos planejados, **III**, consistiu na obtenção de bases de Schiff (MORRYSON, BOYD, 1994; QIN *et al.*, 2013; MURTAZA *et al.*, 2014) a partir de compostos carbonílicos (5-nitro-2-furfurilidênicos) e aminas (hidrazidas substituídas) envolvendo reação de adição nucleofílica (MORRYSON, BOYD, 1994; CAREY, SUNDBERG, 2000; MARCH, 2001).

Nesta etapa ocorre ataque nucleofílico da amina primária (**II**), proveniente da hidrazida ao carbono carbonílico deficiente de elétrons, proveniente do 5-nitro-2-furaldeído (**A**). Em seguida, os intermediários (**II-a** e **II-b**) resultam na liberação de uma molécula de água (**II-c**). A reação se completa com a desprotonação do intermediário imina (**II-d**), obtendo-se sua forma neutra (**III**) correspondente aos compostos de interesse (CAREY, SUNDBERG, 2000; MARCH, 2001).

Neste mecanismo de adição nucleofílica o meio reacional utilizado para a obtenção da maioria dos compostos da série foi constituído de água, ácido sulfúrico, ácido acético, e

metanol, na proporção 8:7:8:20 (v/v), respectivamente, o qual deve estar suficientemente ácido para que ocorra a protonação do composto carbonílico, sem permitir decréscimo de composto nitrogenado livre (EL-BOIED, ELNIMA, AL-BADR, 1985; TAVARES, PENNA, AMARAL, 1996; TAVARES *et al.*, 1998).

R: Amida substituída com grupo alquil, ciclo-alquil, heterocíclicos, benzeno e, naftaleno substituídos.
R': hidrogênio; **R'':** 5-nitro-2-furano.

Figura 37. Mecanismo de obtenção das bases de Schiff (adaptado de MARCH, 2001).

Assim, se o meio reacional apresentar acidez elevada, a amina pode se converter em sua forma protonada, perdendo sua capacidade nucleofílica e consequentemente reduzindo a velocidade de reação (MORRISON, BOYD, 1994).

A síntese dos compostos planejados, **III**, **c1**, **c2**, **c3**, **c6**, **c11** e **c12**, foi realizada por outro método, em que as hidrazidas, **II**, e o 5-nitro-2-furaldeído foram dissolvidos em etanol sob temperatura ambiente e agitação constante até a formação de sólido amorfo, sendo identificado como composto de interesse através de faixa de fusão, análise elementar e RMN de ^1H e ^{13}C (COSTA *et al.*, 2012). Este método de síntese foi adotado, uma vez que os compostos com grupos substituintes, alquila e ciclo-alquila, apresentaram dificuldade no processo de síntese pelo método de rotina, o qual é composto por água, mistura de ácidos e metanol.

Para demonstrar o processo de síntese e identificação serão discutidos os compostos **c7** e **c24**, os quais foram sintetizados através de pequenas modificações no método alternativo descrito para os compostos anteriores.

A síntese do composto com grupo ciano, **c7**: 2-ciano-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida, foi precedida da recristalização da hidrazida obtida comercialmente

(Sigma Aldrich – C88602) com grau de pureza de 98%. Apesar do alto grau de pureza indicado pelo fabricante, o reagente apresentava impureza, as quais eram observadas no espectro de RMN de ^1H da base de Schiff sintetizada.

A recristalização foi realizada através do método de solubilização do reagente em acetato de etila em temperatura próxima do ponto de ebulição. A solução foi filtrada sob pressão reduzida e a solução obtida foi resfriada e mantida em temperatura ambiente até a formação de cristais, os quais apresentaram aspecto semelhante a sal grosso. É importante salientar que o reagente foi utilizado tão logo a sua recristalização. Isto porque o mesmo volta a perder seu aspecto cristalino com o passar do tempo o que evidencia sua alta higroscopicidade e baixa estabilidade mesmo armazenado nas condições recomendadas pelo fabricante.

A síntese deste composto foi realizada utilizando 0.001 mol da hidrazida recristalizada e 0.001 mol do 5-nitro-2-furaldeído em meio reacional contendo 10 mL de Etanol. A hidrazida foi tritura e pulverizada lentamente sobre meio reacional previamente aquecido a temperatura entre 30 e 40 °C. Para auxiliar a total solubilização da hidrazida foram adicionadas cerca de 15 gotas de água destilada previamente aquecida, uma vez que a hidrazida é altamente solúvel em água. O aldeído solubilizado através de fusão a mesma temperatura do meio reacional foi então adicionado ao meio reacional contendo a hidrazida solubilizada. O sistema foi mantido sob aquecimento por 5 minutos e, em seguida, foi mantido apenas sob agitação constante até a formação do sólido amorfo de coloração amarelo claro (faixa de fusão: 201 – 202; η = 78%). A formação do composto levou cerca de 50 minutos e, após sua formação este foi filtrado sob pressão reduzida e seco em presença de pentóxido de fósforo (**Figura 38**).

Figura 38. Esquema reacional da síntese do composto com grupo substituinte ciano.

A confirmação da formação do composto com grau de pureza considerável foi confirmada através de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C . Os espectros demonstrando que a recristalização do reagente de partida foi eficaz na eliminação das impurezas são mostrados a seguir nas **Figuras 39 e 40**.

O espectro de RMN de ^1H mostrado na **Figura 39** apresenta os picos de impurezas destacados. Sabendo do grau de pureza do composto (98%), inicialmente buscou-se a obtenção do composto por meio da modificação no tempo reacional, onde foram realizadas tentativas com tempo variando em 1, 2, 4, 12 e 24 horas a temperatura ambiente. Não sendo observado mudança significativa, investigamos a influência do tamanho do álcool utilizado com meio reacional, nesta etapa foram realizadas tentativas de síntese utilizando metanol, etanol, propanol e butanol, sendo observado que o etanol era o meio reacional mais propício à formação do composto. A partir de então, foram realizadas tentativas de recristalização do composto final em metanol. Sem obter o resultado esperado, foi realizada a recristalização do reagente de partida como descrito anteriormente. Após a recristalização e isolamento do cristal obtido, procedeu-se a síntese como já descrito.

Figura 39. Espectro de RMN ^1H do composto **c7**: 2-ciano-N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida. Em destaque os picos de impureza.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 40**) do composto sintetizado a partir da hidrazida recristalizada comprovou que a recristalização foi eficaz na remoção de impurezas do composto final. No espectro são observados em $\delta = 12.14/12.06$ ppm sinal duplicado referente ao

hidrogênio da amina que compõe a região *N*-acilidrazona na posição 8, próxima a carbonila na posição 9 responsável pela duplicação do sinal devido a seu efeito de campo, bem como da sua liberdade rotacional. Em $\delta = 8.14/7.95$ ppm sinal do hidrogênio na posição 4 do anel furânico duplicado em razão da proximidade com grupo nitro de maior densidade eletrônica. O sinal do hidrogênio na posição 3 do anel furânico surge como singlete em $\delta = 7.78$ ppm. O hidrogênio referente ao carbono da ligação iminina característica de bases de Schiff surge em $\delta = 7.26$ ppm. O sinal dos hidrogênios do grupo metileno (CH_2) surgem duplicados em $\delta = 4.20/3.87$ ppm devido à proximidade com a carbonila.

Figura 40. Espectro de RMN ^1H do composto **c7**: 2-ciano-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida sintetizado com a hidrazida recristalizada.

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 41**) do composto **c7** foi obtido utilizando como solvente $\text{DMSO}-d_6$, e equipamento na frequência de 75 MHz. Os deslocamentos químicos correspondentes aos carbonos surgem em δ (ppm): 170.26/106.34 (C9) referente ao carbono carbonílico, em 159.55/151.79 (C5) sinal do carbono quaternário duplicado próximo ao grupo nitro, em 151.08 (C2) sinal do carbono quaternário do anel furânico oposto ao grupo nitro, em 135.69 (C6) sinal do carbono da ligação iminina característico da base de Schiff, em 132.58

(C11) sinal do carbono componente do grupo ciano, em 115.87/115.18 (C4) e 114.53/114.37 (C3) sinais dos carbonos do anel furânico. Em 25.01/24.30 (C10) sinal referente ao grupo metileno (CH)₂.

Figura 41. Espectro de RMN de ¹³C do composto **c7**: : 2-ciano-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida sintetizado com a hidrazida recristalizada.

A síntese do composto **c24**: 6-amino-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida, com grupo substituinte 6-amino-2-naftaleno foi feita a partir da esterificação do ácido 6-amino-2-naftóico. Nesta reação 0,01 mol do ácido de partida foi esterificado em meio ácido contendo 20 mL de H₂SO₄ e 0,5 mL de MeOH. O sistema foi mantido sob refluxo por 4 horas. Decorrido esse tempo foi adicionado ao meio reacional solução de hidróxido de sódio (NaOH 10% p/v) em quantidade suficiente para alcalinizar o meio reacional até pH = 12. Este foi mantido sob temperatura ambiente até o resfriamento e depois mantido em freezer a -20 °C até a formação do éster 6-amino-2-naftoato de metila, que apresentou amorfo acinzentado (faixa de fusão: 158 – 159 °C; η = 95%), o qual foi filtrado sob pressão reduzida e seco em presença de pentóxido de fósforo (**Figura 42**).

A formação do intermediário éster 6-amino-2-naftoato de metila foi acompanhada através da análise de RMN ^1H e ^{13}C (**Figura 43**). No espectro de RMN ^1H são apresentados os sinais referentes a amina (NH_2) na posição 6 do naftaleno em $\delta = 5.84$ ppm. Os sinais dos hidrogênios presentes do naftaleno surgem em $\delta = 8.35$ ppm hidrogênio na posição 1, em $\delta = 7.80/7.77$ ppm duplete correspondente aos hidrogênios na posição 8 e 3, em $\delta = 7.57/7.54$ ppm duplete correspondente ao hidrogênio na posição 5, em $\delta = 7.05/7.02$ ppm duplete correspondente ao hidrogênio na posição 7 e $\delta = 6.87$ ppm singlete referente ao hidrogênio na posição 4. Os hidrogênios da metila (CH_3) aparecem como singlete em campo mais alto em relação aos hidrogênios do naftaleno com $\delta = 3.86$ ppm. No espectro de RMN ^{13}C o sinal característico do carbono carbonílico (C9) surge em $\delta = 166.66$ ppm, assim como o carbono da metila (CH_3) na posição 11 (C11) em $\delta = 51.65$ ppm. O carbono da posição do grupo (C6) substituinte surge com singlete em $\delta = 149.39$ ppm, enquanto o sinal do carbono quaternário (C2) aparece em $\delta = 121.40$ ppm. Os demais carbonos presentes no naftaleno surgem em $\delta = 137.62$ ppm referente ao carbono quaternário assinalado como C4a, em $\delta = 130.60$ ppm carbono na posição 8 (C8), em $\delta = 130.45$ ppm carbono na posição 1 (C1), em $\delta = 125.04$ ppm carbono quaternário assinalado como C8a, em $\delta = 125.01$ ppm carbono na posição, em $\delta = 125.04$ ppm carbono na posição 4 (C4), em $\delta = 124.87$ ppm carbono na posição 3 (C3), em $\delta = 119.02$ ppm carbono na posição 7 (C7), e em $\delta = 105.13$ ppm carbono na posição 5 (C5).

Figura 43. Espectro de RMN ¹H e ¹³C do intermediário éster 6-amino-2-naftoato de metila.

A síntese da hidrazida substituída foi realizada utilizando 0.003 mols do éster isolado 6-amino-2-naftoato de metila em meio reacional contendo 20 mL de hidrato de hidrazina 80% (v/v) sob refluxo por 1 hora (**Figura 44**).

Figura 44. Esquema reacional da síntese da hidrazida substituída 6-amino-2-naftohidrazida.

Ao término da reação o sistema reacional foi resfriado em temperatura ambiente, com formação imediata dos cristais da hidrazida substituída (faixa de fusão: 218 – 220 °C; η : 63%). Devido a reatividade do meio reacional a água-mãe foi recuperada em bquer e mantida sob refrigeração por 24 horas, onde foi observado formação de nova quantidade e composto, sendo este também filtrado sob pressão reduzida e seco em presença de pentóxido de fósforo. Semelhante à síntese do intermediário éster, a hidrazida substituída 6-amino-2-naftohidrazida, teve a formação da estrutura química de interesse confirmada através da técnica de RMN ^1H e ^{13}C (**Figura 45**).

O espectro de RMN ^1H da hidrazida substituída com grupo substituinte 6-amino-2-naftaleno apresenta os deslocamentos químicos que confirma sua obtenção em $\delta = 9.67$ ppm singlete referente ao grupo NH na posição 10, em $\delta = 5.63$ ppm singlete referente ao grupo NH_2 na posição 11 pertencente a hidrazida, em $\delta = 4.51$ ppm singlete referente ao grupo NH_2 ligado ao naftaleno na posição 6, em $\delta = 8.19$ ppm singlete pertencente ao hidrogênio (CH) na posição próximo a carbonila (C9), em $\delta = 7.74/7.65$ ppm multiplete referente aos hidrogênios (CH) nas posições 3 e 8, em $\delta = 7.53/7.50$ ppm duplete pertencente ao hidrogênio (CH) na posição 7, em $\delta = 7.01/6.98$ ppm duplete pertencente ao hidrogênio (CH) na posição 4 e, em $\delta = 6.84$ ppm singlete referente ao hidrogênio (CH) na posição 5. Quanto ao espectro de RMN ^{13}C , os sinais característicos da estrutura surgem em $\delta = 166.47$ ppm (C9) referente ao carbono carbonílico, em $\delta = 148.27$ ppm e $\delta = 127.33$ ppm, sinais referentes aos carbonos quaternários característicos nas posições C6 e C2 do naftaleno.

Figura 45. Espectros de RMN ¹H e ¹³C da hidrazida substituída 6-amino-2-naftoidrazida.

A síntese da base de Schiff do composto **c24**: 6-amino-N'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftoidrazida, foi feita com 0.001 mol da hidrazida substituída (6-amino-2-naftoidrazida) e 0.001 mol do 5-nitro-2-furaldeído, em meio reacional contendo 2 mL de DMSO e 8 mL de etanol (**Figura 46**).

Figura 46. Esquema reacional da síntese da base de Schiff do composto **c24**.

A hidrazida foi inicialmente triturada e solubilizada em DMSO em temperatura entre 40 e 50 °C. Após a solubilização da hidrazida o sistema reacional foi resfriado a temperatura dada a reatividade da hidrazida, em seguida adicionou-se ao meio o reacional o 5-nitro-2-furaldeído previamente solubilizado em pequena quantidade de etanol. O sistema foi mantido sob agitação constante e, temperatura ambiente por cerca de 45 minutos observando-se a formação de sólido amorfo de coloração marrom. Em seguida adicionou-se água destilada gelada ao meio reacional e, em seguida o a base de Schiff foi filtrada sob pressão reduzida. O composto obtido foi seco em presença de pentóxido e fósforo. A água-mãe recuperada após a filtração foi armazenada em temperatura entre 5 e 10 °C por 24 horas. Decorrido este tempo observou-se a formação de mais composto, sendo este também filtrado sob pressão reduzida e seco em presença de pentóxido de fósforo.

O espectro de RMN ^1H da base de Schiff do composto **c24** apresentou deslocamentos químicos em $\delta = 12.21$ ppm singlete pertencente ao hidrogênio do grupo amina (NH) na posição 8, característico da região *N*-acilidrazona e, em $\delta = 6.88$ ppm singlete pertencente ao hidrogênio do grupo metino (CH) na posição 6, característico da ligação imina. Em $\delta = 5.80$ ppm dois hidrogênios pertencentes ao grupo NH_2 ligado em posição *para* do naftaleno. Os hidrogênios pertencentes ao anel furânico tem sinais em $\delta = 7.31$ ppm singlete pertencente ao hidrogênio na posição 4 (CH), próximo ao grupo nitro, e em $\delta = 7.06/7.03$ ppm duplete referente ao hidrogênio na posição 3 (CH) do anel furânico. Os hidrogênios, pertencente ao naftaleno tem sinais em $\delta = 8.44/8.32$ duplete referente aos hidrogênios (CH) nas posições 19 e 11. Em $\delta =$

7.78/7.74 ppm duplete referente aos hidrogênios (CH) 17, 14 e 12. Em $\delta = 7.26$ ppm duplete referente ao hidrogênio na posição 16 (**Figura 47**).

Figura 47. Espectro de RMN ^1H da base de Schiff do composto **c24**.

Os sinais de RMN de ^{13}C que caracterizam a formação da estrutura do composto são visualizados em $\delta = 163.88$ ppm singlete pertencente a carbonila (C9), em $\delta = 152.11/151.08$ duplete pertencente aos carbonos quaternários (C2 e C5) do anel furânico, assim como em $\delta = 114.73$ ppm singlete pertencente aos carbonos terciários (C3 e C4) do anel furânico. Em $\delta = 137.07$ ppm singlete referente ao carbono (C6) que compõe a ligação imina que caracteriza a formação da base de Schiff. Já os carbonos do grupo naftaleno tem sinais em $\delta = 149.01$ ppm singlete pertencente ao carbono quaternário (C15) onde está localizado o grupo amino *para* substituído. Em $\delta = 134.48$ ppm singlete referente ao carbono quaternário (C13), em $\delta = 130.12$ ppm carbono (C17), em $\delta = 128.64$ ppm carbono quaternário na posição (C10), em $\delta =$

125.03/124.46 ppm tripleto referente ao quaternário (C18) e, aos terciários (C19, C12 e C11). Por fim, em $\delta = 119.14$ ppm carbono em (C16) (**Figura 48**).

Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C da base de Schiff do composto **c24**.

Os compostos sintetizados foram obtidos com rendimentos satisfatório entre 65 e 98%. O grau de pureza dos compostos também foi satisfatório, uma vez que, estes apresentaram valores de faixa de fusão estreitos. Os resultados de rendimento, faixa de fusão e massa molar estão disponíveis na **Tabela 3**, e os resultados obtidos da análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) estão disponíveis na **Tabela 4**.

Tabela 3. Dados experimentais dos compostos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos: rendimento, faixa de fusão e massa molar

Compostos	Rendimento (η %)		Faixa de fusão (° C)		Massa molar (g)
	Exp.	Lit. ^a	Exp.	Lit. ^a	
c1	78	90	251 – 252	249 – 250	197.15
c2	93	–	152 – 154	–	222.28
c3	75	–	140 – 141	–	295.33
c4	87	–	183 – 185	–	228.17
c5	97	91	228 – 230	229 – 230	313.27
c6	65	–	177 – 178	–	255.23
c7	78	80	201 – 202	207 – 208	222.16
c8	92	–	249 – 250	–	249.18
c9	92	82	114 – 115	128 – 129	265.25
c10	98	–	245 – 248	–	281.25
c11	70	–	206 – 207	–	251.24
c12	67	–	202 – 203	–	265.27
c13	91	86 ^b	211 – 212	214 – 215 ^b	259.22
c14	91	–	195 – 196	–	273.24
c15	85	–	163 – 164	–	323.28

Continua...

Tabela 3. Dados experimentais dos derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos: rendimento, faixa de fusão e massa molar (*cont....*)

Compostos	Rendimento (η %)		Faixa de fusão (° C)		Massa molar (g)	
	Exp.	Lit. ^a	Exp.	Lit. ^a		
c16		92	—	239 – 240	—	335.31
c17		87	—	197 – 198	—	351.09
c18		93	—	168 – 171	—	335.40
c19		94	—	200 – 201	—	329.35
c20		95	—	178 – 179	—	357.40
c21		95	—	172 – 173	—	373.40
c22		93	—	249 – 250	—	309.28
c23		84	—	268 – 269	—	325.28
c24		75	—	250 – 251	—	324.29
c25		74	—	232 – 233	—	339.30
c26		97	—	242 – 243	—	327.27
Nifuroxazida	98	83 ^b	293 – 294	298	275.05	

Exp.: dados obtidos experimentalmente; **Lit.:** dados obtidos da literatura; **a:** Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie; **b:** valor obtido comercialmente (Sigma-Aldrich). Valores não encontrados na literatura (—).

Tabela 4. Análise elementar dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos

Comp.	Fórmula molecular	MM (g)	% C			% H			% N		
			Exp.	Calc.	Δ	Exp.	Calc.	Δ	Exp.	Calc.	Δ
c1	C ₇ H ₇ N ₃ O ₄	195.15	42.77	42.65	0.12	3.56	3.58	0.02	21.57	21.31	0.26
c2	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₂	222.28	64.61	64.84	0.23	8.56	8.16	0.40	12.84	12.60	0.24
c3	C ₁₄ H ₂₁ N ₃ O ₄	295.15	56.90	56.94	0.04	6.77	7.17	0.40	14.57	14.23	0.34
c4	C ₈ H ₉ N ₃ O ₅	227.17	42,32	42,30	0,02	3,79	3,99	0,20	18,27	18,50	0,23
c5	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₅	303.27	55,14	55,45	0,31	4,18	4,32	0,14	13,64	13,86	0,22
c6	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₄	239.23	50.76	50.21	0.55	5.52	5.48	0.04	17.94	17.56	0.38
c7	C ₈ H ₆ N ₄ O ₄	222.16	43.64	43.25	0.39	2.37	2.72	0.35	25.04	25.22	0.18
c8	C ₁₀ H ₇ N ₃ O ₅	249.18	48,25	48,20	0,05	2,83	2,83	0,00	16,62	16,86	0,24
c9	C ₁₀ H ₇ N ₃ O ₄ S	265.25	45.16	45.28	0.12	2.74	2.66	0.08	15.72	15.84	0.12
c10	C ₉ H ₇ N ₅ O ₄ S	281.25	38.63	38.43	0.20	2.80	2.51	0.29	24.55	24.90	0.35
c11	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₄	251.24	52.34	52.29	0.05	5.04	5.22	0.18	16.78	16.73	0.05
c12	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₄	265.27	54.51	54.33	0.18	5.68	5.70	0.02	15.96	15.84	0.12
c13	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₄	259.06	55.33	55.60	0.27	3.60	3.50	0.10	16.08	16.21	0.13
c14	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₄	273.24	57.46	57.14	0.32	4.07	4.06	0.01	15.52	15.38	0.14
c15	C ₁₁ H ₉ N ₃ O ₅ S	295.27	44.66	44.31	0.35	3.21	3.41	0.20	12.50	12.92	0.42
c16	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O ₄	335.31	64.24	64.47	0.23	3.88	3.91	0.03	12.60	12.53	0.07
c17	C ₁₈ N ₁₃ N ₃ O ₅	351.31	61.54	61.54	0.00	3.72	3.73	0.01	12.19	11.96	0.23
c18	C ₁₇ H ₂₅ N ₃ O ₄	335.40	60,58	60,88	0,30	7,20	7,51	0,31	12,16	12,53	0,37
c19	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₄	329.35	61,94	62,00	0,06	5,73	5,81	0,08	12,45	12,76	0,31
c20	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₄	357.40	63,58	63,85	0,27	6,39	6,49	0,10	11,38	11,76	0,38
c21	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₅	373.40	60,99	61,11	0,12	5,96	6,21	0,25	10,87	11,25	0,25
c22	C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₄	309.28	62.47	62.14	0.33	3.70	3.58	0.12	13.49	13.59	0.10
c23	C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₅	325.28	52.91	59.08	6.17	4.41	3.41	1	11.56	24.59	13.03
c24	C ₁₆ H ₁₂ N ₄ O ₄	324.29	56.56	59.26	2.70	4.11	3.37	0.74	16.40	17.28	0.88
c25	C ₁₇ H ₁₃ N ₃ O ₅	339.30	56.57	60.18	3.61	4.19	3.86	0.33	12.23	12.38	0.15
c26	C ₁₆ H ₁₀ FN ₃ O ₄	327.27	52.33	58.72	6.39	3.89	3.08	0.81	12.08	12.84	0.76
NF	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₅	275.05	52.66	52.37	0.29	3.37	3.30	0.07	14.87	15.27	0.40

Δ = |experimental – calculado|

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

A atividade dos compostos foi avaliada inicialmente frente a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, que é uma cepa de referência utilizada nos testes de sensibilidade a antimicrobianos, nos testes de confirmação de susceptibilidade a oxacilina e em testes

automatizados de verificação de suscetibilidade de Gram-positivos. É uma cepa produtora de β -lactamase, porém, suscetível a uma grande variedade de antimicrobianos (ANVISA, 2006; SONI, CHAKRAPANI, CHOPRA, 2015). Por este motivo foi usada como ponto de partida para realização dos ensaios de atividade antimicrobiana dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos.

Os dados de sensibilidade da cepa foram obtidos através de análise automatizada em aparelho VITEK® 2 Compact (BioMérieux Industry) do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo e, os dados obtidos quanto à sensibilidade da cepa estão disponíveis na **Tabela 5**.

Tabela 5. Sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Antibiótico	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Interpretação
β -Lactamase	Positivo	+
Teste de triagem de cefoxitina	Negativo	-
Oxacilina	0,5	S
Gentamicina	$\leq 0,5$	S
Ciprofloxacino	$\leq 0,5$	S
Moxifloxacino	$\leq 0,5$	S
Norfloxacino	$\leq 0,5$	S
Resistência induzida a clindamicina	Negativo	-
Eritromicina	$\leq 0,25$	S
Clindamicina	$\leq 0,25$	S
Linezolida	2	S
Teicoplanina	$\leq 0,5$	S
Vancomicina	$\leq 0,5$	S
Rifampicina	$\leq 0,5$	S
Sulfametoxazol – Trimetoprima	≤ 10	S

Nota. MIC: concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$); S: sensível.

Os resultados de atividade antimicrobiana obtidos em relação a esta cepa, demonstraram que a maioria dos compostos testados apresentam atividade antimicrobiana, com exceção dos compostos com grupo substituinte carbazato de *tert*-butila, **c6**; e benzenosulfonil, **c15**.

Com os resultados obtidos observou-se que o aumento da cadeia alquílica melhorou a atividade dos compostos, como observado na comparação entre os compostos **c1** ($\text{IC}_{90} = 3.29 \mu\text{M} \pm 0.38$; $\text{MIC}_{90} \leq 1 \mu\text{g/mL}$; $\text{Log1/IC}_{90} = 5.48$), **c2** ($\text{IC}_{90} = 2.03 \mu\text{M} \pm 0.35$; $\text{MIC}_{90} \leq 1 \mu\text{g/mL}$; $\text{Log1/IC}_{90} = 5.69$) e **c3** ($\text{IC}_{90} = 1.24 \mu\text{M} \pm 0.17$; $\text{MIC}_{90} \leq 0.5 \mu\text{g/mL}$; $\text{Log1/IC}_{90} = 5.91$), **Figura 49**.

Figura 49. Atividade Antimicrobiana dos compostos **c1**, **c2**, **c3** frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Entre os compostos **c4** ($IC_{90} = 4.74 \mu M \pm 2$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.32$) e **c5** ($IC_{90} = 0.84 \mu M \pm 0.08$; $MIC_{90} \leq 0.25 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 6.08$) observou-se que a presença do anel benzênico em **c5**, melhorou consideravelmente a atividade em relação a **c4**, **Figura 50**. Pode-se dizer que a estrutura ressonante do anel, bem como a mudança na distribuição eletrônica da molécula tenha favorecido a atividade, quando comparada com um grupo semelhante não ligado à posição *para* do anel benzênico. Quanto ao composto **c7** ($IC_{90} = 4.92 \mu M \pm 0.04$; $MIC_{90} 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.31$) contendo grupo ciano, este apresentou atividade próxima do composto **c4**.

Figura 50. Atividade antimicrobiana dos compostos **c4** e **c5** frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Entre os compostos com grupos heterocíclicos **c8**, **c9** e **c10**, **Figura 51**, o composto com grupo furano ligado a porção carbonílica, **c8** ($IC_{90} = 1.48 \mu M \pm 0.06$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.83$) foi o que apresentou melhor atividade em relação aos compostos com grupo tiofeno, **c9** ($IC_{90} = 1.87 \mu M \pm 0.04$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.73$), e grupo 4-metil-1,2,3-tiodiazol, **c10** ($IC_{90} = 1.88 \mu M \pm 0.15$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.73$).

Figura 51. Atividade antimicrobiana dos compostos **c8**, **c9** e **c10** frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Entre os compostos com grupo cicloalquil como ciclopentil, **c11** ($IC_{90} = 2.52 \mu M \pm 0.22$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.60$) e ciclohexil, **c12** ($IC_{90} = 2.66 \mu M \pm 0.38$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.58$) observou-se que o aumento no tamanho na estrutura cíclica do grupo substituinte em questão, favorece a atividade do composto, **Figura 52**.

Figura 52. Atividade antimicrobiana dos compostos **c11** e **c12** frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Compostos com grupos benzênicos não substituídos, **c13** ($IC_{90} = 1.23 \mu M \pm 0.07$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.91$) e **c14** ($IC_{90} = 1.95 \mu M \pm 0.37$; $MIC_{90} \leq 1$; $Log 1/IC_{90} = 5.71$) demonstraram que a presença do grupo metileno, CH_2 , que compõe o grupo fenil do composto **c14** foi desfavorável em relação ao grupo benzeno do composto **c13**, **Figura 53**.

Figura 53. Atividade antimicrobiana dos compostos **c13** e **c14** frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

O composto com grupo bifenil, **c16** ($IC_{90} = 0.74 \mu M \pm 0.05$; $MIC_{90} \leq 0.25 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 6.13$) apresentou melhor atividade do que o composto com grupo fenoxibenzênio, **c17** ($IC_{90} = 1.59 \mu M \pm 0.07$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.80$), o que demonstra que a presença do átomo de oxigênio entre os núcleos aromáticos não é favorável a ação do composto, **Figura 54**.

Figura 54. Atividade antimicrobiana dos compostos **c16** e **c17** frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

A comparação dos grupos 4-pentil-ciclo-hexil, **c18** ($IC_{90} = 0.99 \mu M \pm 0.21$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 6$) e grupo 4-pentil, **c19** ($IC_{90} = 0.90 \mu M \pm 0.28$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 6.05$) permite observar que estes diferem quanto a estrutura cíclica dos anéis sob aspecto da ressonância e aromaticidade, no entanto, não foram observadas diferenças significativas na atividade biológica entre as estruturas, **Figura 55**.

Figura 55. Atividade antimicrobiana dos compostos **c18** e **c19** frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

O aumento da cadeia alquílica em posição *para* do anel benzênico foi avaliada através dos compostos 4-epil, **c20** ($IC_{90} = 1.4 \mu M \pm 0.41$; $MIC_{90} = \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.85$) e 4-epilóxi, **c21** ($IC_{90} = 2.28 \mu M \pm 0.92$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.64$). Para estas modificações verificou-se que a presença do átomo de oxigênio reduz a atividade do composto **c21**, porém, se comparados os compostos **c20** e **c21** com o composto **c5** é possível inferir que a presença do oxigênio como heteroátomo em uma cadeia alquílica menor, resulta em aumento da atividade do composto, o que pode ser um indício que o aumento da cadeia carbônica não necessariamente é acompanhado do aumento da atividade biológica nesta posição, **Figura 56**.

Figura 56. Atividade antimicrobiana dos compostos **c5**, **c20** e **c21** frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

O conjunto de variações estruturais do composto eleito líder da série **c22** ($IC_{90} = 0.62 \mu M \pm 0.07$; $MIC_{90} \leq 0.25 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 6.21$) demonstrou atividade antimicrobiana

significativa frente *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, uma vez que, todos os compostos do conjunto apresentaram $IC_{90} < 1 \mu M$ (**Figura 57**). Observou-se ainda que, a introdução do grupo hidroxila, OH, do composto **c23** ($IC_{90} = 0.66 \mu M \pm 0.16$; $MIC_{90} \leq 0.25 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 6.18$) na posição 15 do naftaleno, não melhorou a atividade, no entanto, o valor se manteve próximo ao do composto de origem **c22**.

Por outro lado, a introdução do grupo amino, NH_2 , nesta mesma posição do naftaleno foi favorável ao aumento da atividade do composto **c24** ($IC_{90} = 0.31 \mu M \pm 0.66$; $MIC_{90} \leq 0.25 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 6.51$), sendo este o composto mais ativo entre as variações do conjunto, o que pode ser um indicativo de que a atividade deste composto seja influenciada por grupos mais hidrofílicos nesta posição. É possível ainda que a presença dos dois átomos de hidrogênio do grupo NH_2 tenha aumentado a interação com um possível local receptor, através da formação de ligações de hidrogênio, isto considerando que o grupo OH, também hidrofílico tem apenas um átomo de hidrogênio.

O composto com grupo metóxi, OCH_3 , **c25** ($IC_{90} = 0.42 \mu M \pm 0.05$; $MIC_{90} \leq 0.25$; $Log1/IC_{90} = 6.38$) também apresentou atividade relativamente melhor em relação ao composto **c22**, porém, não sendo mais ativo do que o composto **c24**. Quanto ao composto com grupo flúor, F, **c26** ($IC_{90} = 0.94 \mu M \pm 0.05$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 6.03$), este foi o que demonstrou menor atividade dentro do conjunto. Embora o átomo de flúor tenha forte efeito indutivo e de ressonância, o resultado desse balanço é praticamente zero. Desse modo, suas características de átomo halogênio como forte eletronegatividade e maior raio atômico parecem não ser favoráveis a melhoria da atividade do composto. Ao menos, não nesta posição do composto de origem. É importante ainda, salientar que não se pode excluir a possibilidade de outro átomo halogênio (Cl, Br, I) ser mais ativo em relação ao flúor, uma vez que, essas possibilidades não foram avaliadas.

Comparado com os fármacos de referência, o composto **c24** demonstrou atividade superior ao composto-protótipo, a nifuroxazida ($IC_{90} = 2.39 \mu M \pm 0.08$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.62$), à nitrofurantoína ($IC_{90} = 5.26 \mu M \pm 0.39$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.28$) e à oxacilina ($IC_{90} = 1.14 \mu M \pm 0.28$; $MIC_{90} \leq 0.5$; $Log1/IC_{90} = 5.94$). É importante ressaltar que o composto **c24** apresentou atividade biológica semelhante à vancomicina ($IC_{90} = 0.31 \mu M \pm 0.06$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 6.51$) (**Figura 58**). Todos os valores de resultados obtidos para atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 estão na **Tabela 6**.

Figura 57. Atividade antimicrobiana dos compostos com variação estruturais do grupo naftaleno frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Figura 58. Atividade antimicrobiana dos fármacos de referência frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Tabela 6. Atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Composto (R)	Intervalo de inibição (μM)	IC ₉₀ (μM)	Intervalo de inibição (μg/mL)	IC ₉₀ (μg/mL)	Log1/IC ₉₀
c1	4 – 2	3.29 ± 0.38	1 – 0.5	0.65	5.48
c2	2 – 1	2.03 ± 0.35	1 – 0.5	0.51	5.69
c3	2 – 1	1.24 ± 0.17	0.5 – 0.25	0.37	5.91
c4	8 – 4	4.74 ± 2.00	2 – 1	1.08	5.32
c5	1 – 0.5	0.84 ± 0.08	≤ 0.25	0.25	6.08
c6	s. a.	s. a.	s. a.	s. a.	s. a.
c7	8 – 4	4.92 ± 0.04	2 – 1	1.09	5.31
c8	2 – 1	1.48 ± 0.06	0.5 – 0.25	0.37	5.83
c9	2 – 1	1.87 ± 0.04	0.5 – 0.25	0.5	5.73
c10	2 – 1	1.88 ± 0.15	1 – 0.5	0.53	5.73
c11	4 – 2	2.52 ± 0.22	1 – 0.5	0.63	5.60
c12	4 – 2	2.66 ± 0.38	1 – 0.5	0.71	5.58
c13	2 – 1	1.23 ± 0.07	0.5 – 0.25	0.32	5.91
c14	2 – 1	1.95 ± 0.37	1 – 0.5	0.53	5.71
c15	s. a.	s. a.	s. a.	s. a.	s. a.
c16	1 – 0.5	0.74 ± 0.05	≤ 0.25	0.25	6.13
c17	2 – 1	1.59 ± 0.07	1 – 0.5	0.56	5.80
c18	1 – 0.5	0.99 ± 0.21	0.5 – 0.25	0.33	6.00
c19	1 – 0.5	0.90 ± 0.28	0.5 – 0.25	0.30	6.05
c20	2 – 1	1.40 ± 0.41	0.5 – 0.25	0.50	5.85
c21	4 – 2	2.28 ± 0.92	1 – 0.5	0.85	5.64
c22	1 – 0.5	0.62 ± 0.07	≤ 0.25	0.19	6.21
c23	1 – 0.5	0.66 ± 0.16	≤ 0.25	0.21	6.18
c24	1 – 0.5	0.31 ± 0.06	≤ 0.25	0.1	6.51
c25	1 – 0.5	0.42 ± 0.05	≤ 0.25	0.14	6.38
c26	1 – 0.5	0.94 ± 0.05	0.5 – 0.25	0.31	6.03
nifuroxazida	4 – 2	2.39 ± 0.08	1 – 0.5	0.66	5.62
nitrofurantoína	8 – 4	5.26 ± 0.39	2 – 1	1.25	5.28
oxacilina	2 – 1	1.14 ± 0.28	0.5 – 0.25	0.46	5.94
vancomicina	1 – 0.5	0.31 ± 0.06	0.5 – 0.25	0.45	6.51

Nota. IC₉₀: concentração capaz de inibir 90% do crescimento do micro-organismo; MIC: concentração inibitória mínima; μM: micro-molar; μg/mL: micro-gramas por mili-Litro; Log1/C: logaritmo do inverso da concentração (cálculo da potência do fármaco).

É importante ressaltar que do conjunto de 26 compostos, 18 apresentaram atividade antimicrobiana significativa com MIC ≤ 2 μM. Entre eles estão os compostos: **c2, c3, c5, c8, c9, c10, c13, c14, c16, c17, c18, c19, c20, c22, c23, c24, c25 e c26.**

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos frente à *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina

Considerando que todas as bactérias que têm parede celular contenham proteínas de ligação da penicilina (PBP, penicillin binding protein), os antibióticos β-lactâmicos não são

capazes de inibir o crescimento ou até mesmo matar todas as bactérias, uma vez que, existem outros mecanismos de resistência que podem ser usados pelos micro-organismos para resistir a ação desses agentes. As bactérias podem ser resistentes devido as diferenças estruturais nas PBPs, além disso, podem ainda adquirir resistência através do desenvolvimento de PBPs de alto peso molecular com afinidade diminuída pelos antibióticos β -lactâmicos (PETRI JUNIOR, 2006, 2012).

Os *Staphylococcus* sp. resistentes à metilina, MRSA, desenvolvem resistência por meio da aquisição de PBP2a ou PBP2' adicional de alto peso molecular através de um transposon de outro micro-organismo, o qual apresenta afinidade muito baixa pelos antibióticos β -lactâmicos. O gene *mecA* que codifica essa nova PBP também está presente nos estafilococos coagulase-negativos, nos quais é responsável pela resistência a metilina (SPRATT, 1994) e, sua expressão pode ser constitutiva ou induzida pelos antibióticos β -lactâmicos. Sua inserção no cromossomo estafilocócico ocorre através do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*, Staphylococcal Cassete Chromossome *mec*), o qual é composto por diversos elementos genéticos essenciais, entre os quais estão a ilha de patogenicidade *IS431*, os genes *mecA* e seus reguladores *mecR1* e *mecI*, com atividade repressora e anti-repressora, respectivamente, bem como o complexo de genes do cassete cromossômico que codificam as recombinases *ccrAB* ou *ccrC* (*ccr*, Cassete Chromossome Recombinases). Em todas as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. coagulase negativa a sequência do gene *mecA* é altamente preservada, estando presente em todos os tipos de SCC*mec* (MENDONÇA *et al.*, 2012).

Os elementos SCC*mec* são classificados em tipos e subtipos. Os tipos são definidos pela combinação de genes que compõem o complexo *ccr*, que são representados pelos alótipos do gene *ccr*, e pelas classes dos genes do complexo *mec*. O complexo de genes que codificam as recombinases é composto por genes *ccr* e por fases de leitura aberta (ORFs, Open Reading Frames) várias das quais não função conhecida. Atualmente, três genes filogeneticamente distintos são conhecidos em *Staphylococcus aureus* são conhecidos: *ccrA*, *ccrB* e *ccrC*, apresentando sequências de DNA com similaridade abaixo de 50%. Os genes *ccrA* e *ccrB* foram classificados em quatro alótipos. Em geral, os genes *ccr* com mais de 85% dos nucleotídeos idênticos são colocados no mesmo alótipo. Todas as variações do gene *ccrC* identificadas até o momento apresentaram similaridade estrutural acima de 87%, sendo o gene *ccrC* um alótipo único (IWG-SCC, 2009; MENDONÇA *et al.*, 2012).

Os genes do complexo *mec*, são compostos pelo gene *mecA*, em conjunto com os reguladores *mecR1* e *mecI*, pelas regiões hipervariáveis (HVR, hypervariable region), ou seja, regiões do DNA, nas quais ocorrem repetições dos pares de bases que compõem nucleotídeos (no caso de DNA nuclear) ou substituições (no caso de DNA mitocondrial), o que é característico de regiões polimórficas do DNA; e pela sequência de inserção IS431 (IS431, Insertion Sequence 431) 5'-3' do *mecA*. O gene *mecB* é um complexo composto do gene *mecA*, uma parte do *mecR1* resultante da inserção da sequência de inserção IS1272, 5'-3' do *mecA*. Já o gene *mecC* contém o *mecA* e uma parte do *mecR1* pela inserção 3'-5' da sequência IS431 do *mecA*, região hipervariável e inserção 5'-3' do *mecA*. O gene *mecC* é dividido em duas classes. No complexo do gene *mecC* classe 1, a sequência de inserção IS431, 3'-5', do *mecA* tem a orientação que IS431, 5'-3', do *mecA* próximo a região hipervariável, enquanto que, o gene *mecC* classe 2, a orientação da região de inserção IS431 é 3'-5' do *mecA* é contrária. O complexo do gene *mecD* é composto pelo *mecA* e Δ *mecR1*, porém, este não carrega nenhuma sequência de inserção (IWG-SCC, 2009; MENDONÇA *et al.*, 2012).

Nas infecções relacionadas à assistência à saúde causadas por *Staphylococcus* spp. costumam ser identificados elementos SCCmec I, II, III e VI. Enquanto que nas infecções comunitárias causadas pelos *Staphylococcus* spp. são encontrados com mais frequência os elementos SCCmec IV, V, VII e VIII (IWG-SCC, 2009; DAVID, DAUM, 2010; MENDONÇA *et al.*, 2012).

Os *Staphylococcus* sp., entre outras bactérias podem ainda destruir ou inativar enzimaticamente os antibióticos β -lactâmicos através da ação das β -lactamases (**Figura 59**), que por meio de ataque nucleofílico a carbonila do anel β -lactâmico causa ruptura do anel, inativando assim a atividade das penicilinas e cefalosporinas, ou seja, uma vez destruída a estrutura do grupo farmacofórico, a molécula perde atividade frente a essas bactérias (GENTRY, 2013).

A produção de β -lactamases é codificada pelo gene *blaZ*, alocado em plasmídeos, podendo ser encontrados também em cromossomos. Este mecanismo de resistência pode ser constitutivo ou regulado pela exposição aos antibióticos, através de genes adjacentes como *blaI* e *blaR1*, sendo o primeiro repressor da transcrição de *blaZ* e o segundo, um anti-repressor (MENDONÇA *et al.*, 2012).

Figura 59. Mecanismo de hidrólise catalisado pelas β -lactamases (adaptado de Foye's Medicinal Chemistry, 2013).

As β -lactamases são reunidas em quatro classes: A até D. As β -lactamases da classe A incluem as de espectro ampliado (ESBL), que degradam penicilinas, algumas cefalosporinas e, em alguns casos, os antibióticos carbapenêmicos. As enzimas da classe A e da classe D são inibidas pelos inibidores da β -lactamase como clavulanato e tazobactam, conhecidos como fármacos “suicidas”, uma vez que, sofrem o ataque o enzimático pela enzima β -lactamase no lugar do antibiótico, devido a maior afinidade de ligação pela enzima. As β -lactamases da classe B são enzimas dependentes de Zn^{2+} , que destroem todos os β -lactâmicos, exceto o aztreonam, enquanto que as β -lactamases da classe C são ativas contra as cefalosporinas. As enzimas da classe D incluem ainda as enzimas que degradam a cloxacilina (PETRI JUNIOR, 2006, 2012).

As bactérias Gram-positivas produzem grandes quantidades de β -lactamases e as secretam no meio extracelular. Em sua maioria, as enzimas produzidas são penicilinases.

Figura 60. Comparação das estruturas e das composições das paredes celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativa com destaque para localização das enzimas β -lactamases (Adaptado de BRUNTON, CHABNER, KNOLLMANN. Goodman e Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12. Ed.).

Nas bactérias Gram-negativas, as β -lactamases são produzidas em pequenas quantidades, porém, ficam localizadas de maneira estratégica formando uma espécie de armadilha para os antibióticos β -lactâmicos, isto porque, se encontram na superfície externa da membrana interna do espaço periplasmático (**Figura 60**). Nos estafilococos, a informação necessária para produção das penicilinas é codificada por um plasmídeo que pode ser transferido através de outras bactérias ou por um bacteriófago (PETRI JUNIOR, 2006, 2012).

A metilicina (**Figura 61**), foi o primeiro antibiótico resistente a ação das penicilinas usado na terapêutica, sua resistência a ação das penicilinas se deve a introdução do grupo volumoso dimetoxibenzoil a cadeia lateral do ácido 6-aminopenicilânico, 6-APA, no entanto, ela é instável a ação do ácido gástrico, tendo meia-vida de apenas 5 minutos em pH 2. Por este motivo ela é usada principalmente por via parenteral em casos de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* produtoras de β -lactamase.

Figura 61. Estrutura química da metilicina. Em vermelho grupo dimetoxibenzoil e em preto o 6-APA.

A oxacilina (**Figura 62**) é um antibiótico semissintético pertencente a classe das isoxazolil-penicilinas e, é resistente a ação das penicilinas. Sua estrutura foi obtida a partir da substituição bioisostérica do anel benzênico da benzilpenicilina (penicilina G) por um anel isoxazólico (GENTRY, 2013).

Figura 62. Estruturas químicas da benzilpenicilina e oxacilina.

Assim como a oxacilina, a meticilina é mais ativa do que a benzilpenicilina contra Gram-positivos como os estafilococos e estreptococos sensíveis as penicilinas, mas mantém boa atividade contra aquelas bactérias que produzem essa enzima. Além disso, a oxacilina é mais estável em meio ácido e pode ser administrada por via oral (GENTRY, 2013).

Infelizmente, nos últimos anos tem se notado incidência cada vez maior de isolamento de cepas MRSA. Em sua maioria, essas cepas são adquiridas nos hospitais, como esta que foi utilizada neste trabalho, e representam grande risco, uma vez que apresentam resistência a todos os antibióticos β -lactâmicos, além disso, estas cepas multirresistentes mantêm resistência a ação dos aminoglicosídeos, das tetraciclinas, da eritromicina e clindamicina. Na maioria dos casos a vancomicina é considerada o fármaco de escolha para estas infecções, apesar disso, já existem cepas de *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária (VISA e hVISA) bem como cepas totalmente resistentes (VRSA, Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*) em razão do uso prolongado deste fármaco. Nos casos de infecções causadas por cepas multirresistentes de *Staphylococcus epidermidis* que são resistentes a linezolida, a vancomina e a rifampicina são os fármacos de escolha para estas infecções (PETRI JUNIOR, 2012).

A cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina ($\geq 4 \mu\text{g/mL}$) foi obtida no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Os dados de sensibilidade da cepa foram adquiridos através análise automatizada em aparelho VITEK® 2 Compact (BioMérieux Industry) do HU/USP. Os dados estão disponíveis na **Tabela 7**.

Tabela 7. Sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina

Antibiótico	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Interpretação
Ciprofloxacino	≥ 8	R
Clindamicina	≥ 8	R
Eritromicina	≥ 8	R
Gentamicina	$\leq 0,5$	S
Linezolida	≤ 2	S
Oxacilina	≥ 4	R
Rifampicina	$\leq 0,5$	S
Teicoplanina	$\leq 0,5$	S
Vancomicina	≤ 1	S
Sulfametoxazol – Trimetoprima	≤ 10	S

Nota. MIC: concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$); S: sensível; R: resistente.

É importante notar que esta cepa é resistente a oxacilina ($\geq 4 \mu\text{g/mL}$), sendo sensível em baixas concentrações à vancomicina ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$) e teicoplanina ($\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$), gentamicina ($\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$), e rifampicina ($\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$), o que denota sua importância clínica nas infecções com caráter de multirresistência. Em contrapartida ao que foi observado com os resultados de

atividade antimicrobiana dos compostos frente a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, em que dois compostos não apresentaram atividade antimicrobiana na concentração máxima avaliada. Todos os compostos demonstraram atividade frente a esta cepa, no entanto, a atividade antimicrobiana foi reduzida, algo esperado para uma cepa multirresistente.

Entre os compostos com variação no tamanho da cadeia alquílica, **Figura 63**, a tendência de aumento da atividade em relação ao número de carbonos da cadeia também foi observada, porém, com diminuição da atividade em relação aos resultados obtidos para a cepa sem perfil de resistência. Com isto, os resultados obtidos foram **c1** ($IC_{90} = 5.30 \mu M \pm 0.87$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.28$), **c2** ($IC_{90} = 5.34 \mu M \pm 2.07$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.27$) e **c3** ($IC_{90} = 3.70 \mu M \pm 0.32$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.43$). Entre os compostos **c1** e **c2** não foram observadas diferenças nos valores de atividade antimicrobiana.

Figura 63. Atividade antimicrobiana dos compostos c1, c2 e c3 frente à *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina.

O composto com grupo carbazato de etila, **c4** ($IC_{90} = 4.63 \mu M \pm 3.19$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.33$) manteve atividade semelhante ao obtido frente a cepa *S. aureus* ATCC 29213, por outro lado o composto com grupo 4-etoxi, **c5** ($IC_{90} = 1.14 \mu M \pm 1.16$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.94$) apresentou atividade reduzida em relação ao observado frente a cepa não resistente ($IC_{90} = 0.84 \mu M$), **Figura 64**.

Figura 64. Atividade antimicrobiana dos compostos c4 e c5 frente à *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina.

Os compostos com grupo carbazato de *tert*-butila, **c6** ($IC_{90} = 13.88 \mu M \pm 0.66$; $MIC_{90} \leq 4 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 4.86$), grupo ciano, **c7** ($IC_{90} = 11.62 \mu M \pm 1.42$; $MIC_{90} \leq 4 \mu g/mL$;

$\text{Log1/IC}_{90} = 4.93$), assim como grupo benzenosulfonil, **c15** ($\text{IC}_{90} = 10.81 \mu\text{M} \pm 6.83$; $\text{MIC}_{90} \leq 4 \mu\text{g/mL}$; $\text{Log1/IC}_{90} = 4.97$) apresentaram baixa atividade com valores de inibição do crescimento maior do que $10 \mu\text{M}$. Entre eles o composto **c15** com grupo benzenosulfonil, caracteristicamente retirador de elétrons apresentou melhor atividade, mas ainda baixa, **Figura 65**.

Figura 65. Atividade antimicrobiana dos compostos **c6**, **c7** e **c15** frente à *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina.

Os compostos com grupos substituintes heterocíclicos, **Figura 66**, furano, **c8** ($\text{IC}_{90} = 2.09 \mu\text{M} \pm 0.73$; $\text{MIC}_{90} \leq 1 \mu\text{g/mL}$; $\text{Log1/IC}_{90} = 5.68$) e tiofeno, **c9** ($\text{IC}_{90} = 2.85 \mu\text{M} \pm 0.46$; $\text{MIC}_{90} \leq 1 \mu\text{g/mL}$; $\text{Log1/IC}_{90} = 5.55$) foram menos ativos do que o composto com grupo 4-metil-1,2,3-tiodiazol, **c10** ($\text{IC}_{90} = 1.51 \mu\text{M} \pm 0.17$; $\text{MIC}_{90} \leq 0.5 \mu\text{g/mL}$; $\text{Log1/IC}_{90} = 5.82$).

Figura 66. Atividade antimicrobiana dos compostos **c8**, **c9** e **c10** frente à *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina.

Os compostos com grupos cicloalquil, **Figura 67**, ciclopentil, **c11** ($\text{IC}_{90} = 5.01 \mu\text{M} \pm 1.09$; $\text{MIC}_{90} \leq 2 \mu\text{g/mL}$; $\text{Log1/IC}_{90} = 5.30$) e ciclohexil, **c12** ($\text{IC}_{90} = 4.18 \mu\text{M} \pm 1.20$; $\text{MIC}_{90} \leq 2 \mu\text{g/mL}$; $\text{Log1/IC}_{90} = 5.38$) demonstraram que o aumento da estrutura cíclica foi favorável a atividade antimicrobiana.

Figura 67. Atividade antimicrobiana dos compostos **c11** e **c12** frente à *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina.

Os compostos com anel benzênico não substituído, **Figura 68**, grupo benzeno, **c13**, ($IC_{90} = 3.02 \mu M \pm 0.33$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.52$) e o grupo fenil, **c14** ($IC_{90} = 4.48 \mu M \pm 0.34$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.35$) mantiveram a tendência apresentada de atividade observada frente a *S. aureus* ATCC 29213. Uma vez que o grupo metileno, CH_2 , do composto **c14** entre o benzeno e a carbonila não favorece a atividade antimicrobiana.

Figura 68. Atividade antimicrobiana dos compostos **c13** e **c14** frente à *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina.

A atividade do composto com grupo bifenil, **c16** ($IC_{90} = 1.81 \mu M \pm 0.43$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.74$) se manteve melhor do que a atividade do grupo fenoxibenzeno, **c17** ($IC_{90} = 2.05 \mu M \pm 0.47$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.69$), pode ser atribuído ao oxigênio como heteroátomo entre os grupos aromáticos, **Figura 69**.

Figura 69. Atividade antimicrobiana dos compostos **c16** e **c17** frente à *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina.

Entre os compostos com grupo 4-pentilciclohexil, **c18**, e 4-pentil, **c19**, notou-se que para esta cepa de *S. aureus* resistente a oxacilina, o composto **c19**, ($IC_{90} = 1.54 \mu M \pm 0.23$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.81$) apresentou melhor atividade em relação ao composto **c18** ($IC_{90} = 2.08 \mu M \pm 0.40$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.68$), o que permite inferir que a aromaticidade do composto **c19**, apresentou pequena influencia, isto porque os valores de atividade estão próximos, **Figura 70**.

Figura 70. Atividade antimicrobiana dos compostos c18 e c19 frente à *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina.

O composto com grupo eptiloxi, **c21** (IC₉₀ = 0.54 μM ± 0.17; MIC₉₀ ≤ 0.25 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 6.27) foi mais ativo em comparação com o composto com grupo 4-eptil, **c20** (IC₉₀ = 1 μM ± 0.21; MIC₉₀ ≤ 0.5 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 6) que também teve atividade consideravelmente boa, **Figura 71**. Além disso, é importante salientar que o **c21** foi o segundo mais ativo da série para esta cepa, com valor bem próximo do apresentado pelo composto **c24** discutido a seguir.

Figura 71. Atividade antimicrobiana dos compostos c20 e c21 frente à *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina.

A observação das relações estrutura-atividade para as variações do composto com grupo naftaleno, **c22** (IC₉₀ = 0.77 μM ± 0.10; MIC₉₀ ≤ 0.25 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 6.11), demonstraram que o composto com grupo amino, **c24** (IC₉₀ = 0.52 μM ± 0.26; MIC₉₀ ≤ 0.25 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 6.28) foi o mais ativo entre as demais variações, como grupo o hidroxila, **c23** (IC₉₀ = 1.27 μM ± 1.48; MIC₉₀ ≤ 0.5 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.90), o grupo metóxi, **c25** (IC₉₀ = 1.09 μM ± 1.16; MIC₉₀ ≤ 0.5 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.96), e flúor, **c26** (IC₉₀ = 1.68 μM ± 0.37; MIC₉₀ ≤ 1 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.77) (**Figura 72**).

Dentro do conjunto de variações do grupo naftaleno, observou-se que a propriedade molecular que mais influenciou na otimização da atividade antimicrobiana foi o coeficiente de partição (ClogP). Foi observado para esta propriedade molecular uma redução do valor de ClogP do composto de origem **c22** (ClogP = 3.04) para o composto com grupo amino, NH₂, o mais ativo deste conjunto **c24** (ClogP = 2.31).

Figura 72. Atividade antimicrobiana dos compostos com variação estruturais do grupo naftaleno frente à *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina.

Foram observadas também outras variações moleculares como o aumento da massa molar (MM) de 309.28 para 324.29; aumento no número de átomos doadores de ligação de hidrogênio (HBD) de 1 para 2; e diminuição no número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) de 7 para 5. Verificou-se ainda aumento considerável da refratividade molar (MR) de 83.65 para 88.36. O número de átomos das moléculas aumentou de 34 para 36, e o número de ligações rotacionáveis (LR) se manteve igual a 4 para ambos os compostos, sendo observado aumento significativo no valor área de superfície polar (PSA) de 100.42 para 126.44, como observado na **Tabela 8**.

Tabela 8. Comparação dos valores das propriedades moleculares dos compostos c22 e c24

Composto	c22	c24
ClogP	3.04	2.31
MM	309.28	324.29
HBD	1	2
HBA	7	5
MR	83.65	88.36
Nº de Átomos	34	36
Ligações rotacionáveis	4	4
PSA	100.42	126.44

Figura 73. Gráficos de dispersão das propriedades moleculares mais relevantes na atividade do composto **c24**.

Além do composto **c24** ($IC_{90} = 0.52 \mu M$), o composto com grupo 4-epitoxi **c21** ($IC_{90} = 0.54 \mu M$) também apresentou atividade antimicrobiana significativa. Por se tratar de uma molécula maior em relação as demais, consequentemente seus valores de propriedades moleculares, em sua maioria, são maiores em relação aos valores obtidos para os demais compostos. Como observado na **Tabela 9**, os valores de ClogP (4.23), MM (373.40), MR (101.34), n° de átomos (50) e ligações rotacionáveis (11) foram maiores do que os obtidos para a nifuroxazida e para o composto mais ativo **c24**.

nifuroxazida
IC₉₀ = 5.37 μM

nitrofurantoína
IC₉₀ = 8.20 μM

oxacilina
IC₉₀ = s. a.

vancomicina
IC₉₀ = 0.50 μM

Figura 74. Atividade antimicrobiana dos fármacos de referência frente à *Staphylococcus aureus* resistente oxacilina.

Os valores de atividade antimicrobiana dos fármacos de referência (**Figura 74**) comprovam que as modificações estruturais dos compostos **c21** e **c24** foram significativas em relação a esta cepa de *S. aureus* resistente à oxacilina, uma vez que, estes compostos foram mais ativos em relação a nifuroxazida, nitrofurantoína e oxacilina, inclusive à vancomicina (IC₉₀ = 0.50 μM). Vale salientar que do conjunto de 26 compostos 14 (53%) demonstraram atividade antimicrobiana significativa (≤ 2 μM) frente a esta cepa MRSA de grande importância clínica nas infecções relacionadas à assistência à saúde. Entre os compostos estão: **c5**, **c8**, **c10**, **c16**, **c17**, **c18**, **c19**, **c20**, **c21**, **c22**, **c23**, **c24**, **c25** e **c26**, **Tabela 10**.

Tabela 9. Comparação dos valores das propriedades moleculares da nifuroxazida e dos compostos c24 e c21

Composto	nifuroxazida (IC ₉₀ = 5.37 μM)	c24 (IC ₉₀ = 0.52 μM)	c21 (IC ₉₀ = 0.54 μM)
ClogP	3.04	2.31	4.23
MM	309.28	324.29	373.40
HBD	1	2	1
HBA	7	5	5
MR	83.65	88.36	101.34
Nº de Átomos	34	36	50
Ligações rotacionáveis	4	4	11
PSA	100.42	126.44	109.65

Tabela 10. Atividade antimicrobiana dos compostos frente a *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina

Composto (R)	Intervalo de inibição (μM)	IC ₉₀ (μM)	Intervalo de inibição (μg/mL)	IC ₉₀ (μg/mL)	Log1/IC ₉₀
c1	8 – 4	5.30 ± 0.87	2 – 1	1.04	5.28
c2	8 – 4	5.34 ± 2.07	2 – 1	1.35	5.27
c3	4 – 2	3.70 ± 0.32	2 – 1	1.09	5.43
c4	8 – 4	4.63 ± 3.19	2 – 1	1.05	5.33
c5	2 – 1	1.14 ± 1.16	0.5 – 0.25	0.35	5.94
c6	16 – 8	13.88 ± 0.66	4 – 2	3.54	4.86
c7	16 – 8	11.62 ± 1.42	4 – 2	2.58	4.93
c8	4 – 2	2.09 ± 0.73	1 – 0.5	0.52	5.68
c9	4 – 2	2.85 ± 0.46	1 – 0.5	0.76	5.55
c10	2 – 1	1.51 ± 0.17	0.5 – 0.25	0.42	5.82
c11	8 – 4	5.01 ± 1.09	2 – 1	1.26	5.30
c12	8 – 2	4.18 ± 1.20	2 – 1	1.11	5.38
c13	4 – 2	3.02 ± 0.33	1 – 0.5	0.78	5.52
c14	8 – 4	4.48 ± 0.34	2 – 1	1.22	5.35
c15	16 – 8	10.81 ± 6.83	4 – 2	3.19	4.97
c16	2 – 1	1.81 ± 0.43	1 – 0.5	0.61	5.74
c17	4 – 2	2.05 ± 0.47	1 – 0.5	0.72	5.69
c18	4 – 2	2.08 ± 0.40	1 – 0.5	0.70	5.68
c19	2 – 1	1.54 ± 0.23	0.5 – 0.25	0.51	5.81
c20	2 – 1	1.00 ± 0.21	0.5 – 0.25	0.36	6.00
c21	1 – 0.5	0.54 ± 0.17	≤ 0.25	0.20	6.27
c22	1 – 0.5	0.77 ± 0.10	≤ 0.25	0.24	6.11
c23	2 – 1	1.27 ± 1.48	0.5 – 0.25	0.41	5.90
c24	1 – 0.5	0.52 ± 0.26	≤ 0.25	0.17	6.28
c25	2 – 1	1.09 ± 1.16	0.5 – 0.25	0.37	5.96
c26	2 – 1	1.68 ± 0.37	1 – 0.5	0.55	5.77
nifuroxazida	8 – 4	5.37 ± 0.67	2 – 1	1.48	5.27
nitrofurantoína	16 – 8	8.20 ± 1.66	2 – 1	1.95	5.09
oxacilina	s. a.	s. a.	s. a.	s. a.	s. a.
vancomicina	0.5 – 0.25	0.50 ± 0.20	1 – 0.5	0.72	6.30

Nota. IC₉₀: concentração capaz de inibir 90% do crescimento do micro-organismo; MIC: concentração inibitória mínima; μM: micro-molar; μg/mL: micro-gramas por mili-Litro; Log1/C: logaritmo do inverso da concentração (cálculo da potência do fármaco).

4.7 Avaliação dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos frente à *Staphylococcus aureus* heterogênea com resistência intermediária à vancomicina hVISA–FCFHV36

A cepa de *Staphylococcus aureus* hVISA-FCFHV36 é uma cepa resistente à metilicina (MRSA) e também é uma cepa heterogênea com resistência intermediária à vancomicina (hVISA). Ela foi isolada através de biopsia realizada em um paciente internado em um Hospital de Santa Catarina, diagnosticado com osteomielite adquirida na comunidade. Esta cepa apresenta concentração inibitória mínima de 2 μg/mL de vancomicina, o que classifica esta cepa como suscetível a ação da vancomicina, porém, o paciente hospitalizado não respondeu

ao tratamento com vancomicina (MCCULLOCH *et al.*, 2015). A partir desta constatação, McCulloch e colaboradores (2015) sequenciaram o genoma da cepa hVISA-FCFHV36 e identificaram a presença de 2.619 sequências de proteínas, 7 pseudogenes, 58 genes de tRNA, 16 genes de rRNA. Além disso, foi constatado que o gene *mecA* que confere resistência aos antibióticos β -lactâmicos, e que é carregado pelo SCCmec tipo II (SCCmec, staphylococcal cassette chromosome *mec*) cassette cromossômico estafilocócico ou elemento cromossomal tipo II, o qual tem importante relação com o aumento da resistência aos antibióticos.

A cepa hVISA-FCFHV36 teve seu perfil de sensibilidade (**Tabela 11**) confirmado através de análise automatizada realizada em VITEK[®] 2 Compact (BioMérieux Industry) do HU/USP.

Tabela 11. Sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* heterogênea com resistência intermediária à vancomicina (FCFHV36)

Antibiótico	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Interpretação
B-Lactamase	Positivo	+
Teste de triagem de cefoxitina	Positivo	+
Oxacilina	≥ 4	R
Gentamicina	$\leq 0,5$	S
Ciprofloxacino	≥ 8	R
Moxifloxacino	≥ 8	R
Norfloxacino	≥ 8	R
Eritromicina	≥ 8	R
Clindamicina	≥ 8	R
Linezolida	2	S
Teicoplanina	$\leq 0,5$	S
Vancomicina	3	I
Rifampicina	$\leq 0,5$	S
Sulfametoxazol – Trimetoprima	≤ 10	S

Nota. MIC: concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$); S: sensível; I: intermediário; R: resistente.

Os dados obtidos confirmam a ampla resistência desta bactéria a vários antibióticos, e acende uma alerta, uma vez que está mostrou ser sensível apenas a quatro antibióticos como linezolida (MIC = 2 $\mu\text{g/mL}$) gentamicina (MIC ≤ 0.5 $\mu\text{g/mL}$), rifampicina (MIC ≤ 0.5 $\mu\text{g/mL}$) e teicoplanina (MIC ≤ 0.5 $\mu\text{g/mL}$). Quanto à vancomicina a resistência intermediária foi de MIC = 3 $\mu\text{g/mL}$.

Partindo do conjunto de compostos com variações no tamanho da cadeia alquílica, observa-se que a atividade diminuiu consideravelmente se compararmos os resultados que foram encontrados nos estudos realizados com *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina. Apesar da diminuição da atividade antimicrobiana desse conjunto de compostos frente à cepa hVISA-FCFHV36, o aumento no tamanho da cadeia alquílica permaneceu como a modificação estrutural mais eficiente para o

conjunto, **Figura 75**. Com isto, obtivemos para o composto **c1** ($IC_{90} = 9.44 \mu M \pm 2.48$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.03$), **c2** ($IC_{90} = 11.08 \mu M \pm 1.82$; $MIC_{90} \leq 4 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 4.96$) e **c3** ($IC_{90} = 6.05 \mu M \pm 0.10$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.22$). A observação dos resultados permite inferir que existe uma variação que não obedece a tendência de atividade, isto porque, teoricamente o valor de IC_{90} do composto **c2** deveria ser menor do que **c1**.

Figura 75. Atividade antimicrobiana dos compostos **c1**, **c2**, e **c3** frente à *Staphylococcus aureus* hVISA-FCFHV36.

Entre os compostos com grupo carbazato de etila, **c4** ($IC_{90} = 14.20 \mu M \pm 0.64$; $MIC_{90} \leq 4 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 4.85$) e 4-etoxi, **c5** ($IC_{90} = 2.20 \mu M \pm 0.38$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.66$), verificou-se que a presença do anel aromático aumentou significativamente a atividade do composto **c5** em relação ao **c4**, **Figura 76**.

Figura 76. Atividade antimicrobiana dos compostos **c4** e **c5** frente à *Staphylococcus aureus* hVISA-FCFHV36.

Entre os compostos com grupo carbazato de *tert*-butila (**c6**), ciano (**c7**) e benzenosulfonil (**c15**). Apenas o composto **c7** ($IC_{90} = 13.84 \mu M \pm 0.08$; $MIC_{90} \leq 4 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 4.86$) apresentou atividade nas concentrações avaliadas, **Figura 77**.

Figura 77. Atividade antimicrobiana dos compostos **c6**, **c7** e **c15** frente à *Staphylococcus aureus* hVISA-FCFHV36.

Quanto aos compostos com grupos substituintes heterocíclicos, **Figura 78**, o composto de melhor atividade frente a esta cepa foi o com grupo furano, **c8** ($IC_{90} = 4.46 \mu M \pm 0.38$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.35$), enquanto o composto com grupo tiofeno, **c9** ($IC_{90} = 5.62 \mu M \pm 0.08$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.25$), e composto com grupo 4-metil-1,2,3-tiadiazol, **c10** ($IC_{90} = 6.52 \mu M \pm 0.18$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.19$). Possivelmente o átomo de oxigênio seja favorável a formação de ligação de hidrogênio com um possível local receptor.

Figura 78. Atividade antimicrobiana dos compostos c8, c9 e c10 frente à *Staphylococcus aureus* hVISA-FCFHV36.

Na estrutura dos grupos cicloalquil, **Figura 79**, o ciclopentil **c11** ($IC_{90} = 5.75 \mu M \pm 0.05$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.24$) se mostrou mais ativo do que o ciclohexil, **c12** ($IC_{90} = 6.36 \mu M \pm 0.06$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.20$).

Figura 79. Atividade antimicrobiana dos compostos c11 e c2 frente à *Staphylococcus aureus* hVISA-FCFHV36.

Para os compostos com grupo benzeno, **c13** ($IC_{90} = 6.10 \mu M \pm 0.34$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.21$), e com grupo fenil, **c14** ($IC_{90} = 6.34 \mu M \pm 0.18$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.20$) não foi observada diferença significativa para essas modificações químicas sobre a atividade antimicrobiana. Ainda assim, observa-se que a presença do grupo metileno, CH_2 , entre o anel aromático e a porção *N*-acilidrazona é desfavorável a atividade do composto **c14**, **Figura 80**.

Figura 80. Atividade antimicrobiana dos compostos c13 e c13 frente à *Staphylococcus aureus* hVISA-FCFHV36.

Como já constatado com as cepas anteriormente avaliadas o composto com grupo bifenil, **c16** ($IC_{90} = 2.66 \mu M \pm 0.56$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.58$) apresentou melhor atividade do que o composto com grupo fenoxibenzeno, **c17** ($IC_{90} = 12.50 \mu M \pm 1.69$; $MIC_{90} \leq 8 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 4.90$). Sob os aspecto químico-estrutural a melhor atividade do composto **c16** comparada ao composto **c17**, **Figura 81**, pode estar ligada a adição da fenila em posição *para* do anel aromático, enquanto que a introdução do grupo fenoxi em posição *orto* do mesmo anel aromático diminui significativamente a atividade deste composto. Essa diferença pode ser explicada pela diferença causada no aspecto estérico de cada molécula, que pode influenciar diretamente no ajuste ou encaixe entre a molécula e o seu receptor.

Figura 81. Atividade antimicrobiana dos compostos **c16** e **c17** frente à *Staphylococcus aureus* hVISA-FCFHV36.

A presença do anel aromático no composto com grupo 4-pentil, **c19** ($IC_{90} = 1.72 \mu M \pm 1.07$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.76$) novamente se apresenta como fator que favorece a atividade comparada ao composto com grupo 4-pentilciclohexil, **c18** ($IC_{90} = 3.67 \mu M \pm 0.08$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.44$). A presença do sistema aromático parece modificar não só a afinidade entre a molécula e seu receptor, mas também o volume e a hidrofobicidade que participam desta interação, **Figura 82**.

Figura 82. Atividade antimicrobiana dos compostos **c18** e **c19** frente à *Staphylococcus aureus* hVISA-FCFHV36.

Em relação aos compostos com grupo 4-epil, **c20** ($IC_{90} = 3.64 \mu M \pm 0.45$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.44$) e **c21** ($IC_{90} = 3.56 \mu M \pm 0.76$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.45$)

não houve diferença de atividade resultante das modificações estruturais, além disso, a atividade dos compostos foi reduzida em comparação ao resultado obtido com a cepa de *S. aureus* resistente a oxacilina (**c20** = 1 μ M; **c21** = 0.54 μ M).

Figura 83. Atividade antimicrobiana dos compostos c20 e c21 frente à *Staphylococcus aureus* hVISA–FCFHV36

Os compostos com variações do grupo naftaleno se mantiveram entre os compostos mais ativos. É importante destacar o composto com grupo amino, **c24** ($IC_{90} = 0.82 \mu M \pm 0.07$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $\log_2 IC_{90} = 6.09$) como o composto mais ativo, inclusive em relação à vancomicina ($IC_{90} = 0.88 \mu M \pm 0.05$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $\log_2 IC_{90} = 6.06$). Vale salientar que apesar da proximidade do valor de atividade entre **c24** e vancomicina, este composto apresentou atividade superior a todos os demais compostos avaliados frente a cepa de *Staphylococcus aureus* hVISA–FCFHV36.

Os demais compostos do conjunto de variações estruturais do grupo naftaleno **c22** ($IC_{90} = 3.22 \mu M \pm 0.06$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $\log_2 IC_{90} = 5.49$) apresentaram os seguintes valores de inibição do crescimento: **c23** ($IC_{90} = 1.35 \mu M \pm 0.07$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $\log_2 IC_{90} = 5.87$), **c25** ($IC_{90} = 1.68 \mu M \pm 0.09$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $\log_2 IC_{90} = 5.77$), **c26** ($IC_{90} = 2.80 \mu M \pm 0.54$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $\log_2 IC_{90} = 5.55$) (**Figura 84**).

Os fármacos de referência nifuroxazida ($IC_{90} = 7.22 \mu M \pm 0.29$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $\log_2 IC_{90} = 5.14$) e nitrofurantoína ($IC_{90} = 13.14 \mu M \pm 0.94$; $MIC_{90} \leq 4 \mu g/mL$; $\log_2 IC_{90} = 4.88$) não apresentaram atividade antimicrobiana significativa e, a oxacilina não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações avaliadas (**Figura 85**).

A análise dos resultados de atividade antimicrobiana dos compostos obtidos para as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina e *Staphylococcus aureus* heterogênea com resistência intermediária à vancomicina hVISA (FCFHV36) permitiu fazer uma triagem dos compostos mais ativos frente a esta espécie, adotando como referência os compostos que apresentaram atividade $\leq 2 \mu M$.

Inicialmente os resultados de atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 demonstraram que 20 dos compostos do conjunto ficaram dentro da faixa de

atividade adotada como significativa. Um dado importante a ser considerado, sabendo que esta cepa não apresenta perfil de resistência. Por outro lado, os resultados obtidos a partir da avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos frente a cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina, permitiu verificar que 15 compostos dos 26 compostos demonstraram atividade significativa. Já a cepa de *Staphylococcus aureus* hVISA (FCFHV36) reduziu o conjunto de composto para apenas 5 capazes de inibir 90% do crescimento da cepa em concentrações $\leq 2 \mu\text{M}$. Entre os 5 compostos que mantiveram atividade antimicrobiana dentro da concentração estabelecida como significativa estão, o composto com grupo 4-etoxi, **c5** ($2.20 \mu\text{M}$), com grupo 4-pentil, **c19** ($1.72 \mu\text{M}$), e os compostos com variações estruturais do grupo naftaleno, grupo hidroxila, OH, **c23** ($1.35 \mu\text{M}$), grupo metóxi, **c25** ($1.68 \mu\text{M}$) e o mais ativo dentro das variações do naftaleno, o grupo amino, **c24** ($0.82 \mu\text{M}$). Todos os resultados de atividade antimicrobiana estão na **Tabela 12**.

Figura 84. Atividade antimicrobiana dos compostos com variações estruturais do grupo naftaleno frente *Staphylococcus aureus* hVISA–FCFHV36.

nifuroxazida
IC₉₀ = 7.22 μM

nitrofurantoína
IC₉₀ = 13.14 μM

oxacilina
IC₉₀ = s. a.

Vancomicina
IC₉₀ = 0.88 μM

Figura 85. Atividade antimicrobiana dos fármacos de referência frente à *Staphylococcus aureus* hVISA–FCFHV36.

Tabela 12. Atividade antimicrobiana frente a cepa de *Staphylococcus aureus* heterogênea com resistência intermediária à vancomicina hVISA–FCFHV36

Composto (R)	Intervalo de inibição (μM)	IC ₉₀ (μM)	Intervalo de inibição (μg/mL)	IC ₉₀ (μg/mL)	Log1/IC ₉₀
c1	16 – 8	9.44 ± 2.48	2 – 1	1.86	5.03
c2	16 – 8	11.08 ± 1.82	4 – 2	2.81	4.96
c3	8 – 4	6.05 ± 0.10	2 – 1	1.79	5.22
c4	16 – 8	14.20 ± 0.64	4 – 2	3.23	4.85
c5	4 – 2	2.20 ± 0.38	1 – 0.5	0.67	5.66
c6	s. a.	s. a.	s. a.	s. a.	s. a.
c7	16 – 8	13.84 ± 0.08	4 – 2	3.07	4.86
c8	8 – 4	4.46 ± 0.38	2 – 1	1.11	5.35
c9	8 – 4	5.62 ± 0.08	2 – 1	1.49	5.25
c10	8 – 4	6.52 ± 0.18	2 – 1	1.83	5.19
c11	8 – 4	5.75 ± 0.05	2 – 1	1.44	5.24
c12	8 – 4	6.36 ± 0.06	2 – 1	1.69	5.20
c13	8 – 4	6.10 ± 0.34	2 – 1	1.58	5.21
c14	8 – 4	6.34 ± 0.18	2 – 1	1.73	5.20
c15	s. a.	s. a.	s. a.	s. a.	s. a.
c16	4 – 2	2.66 ± 0.56	1 – 0.5	0.89	5.58
c17	16 – 8	12.50 ± 1.69	8 – 4	4.39	4.90
c18	4 – 2	3.67 ± 0.08	2 – 1	1.23	5.44
c19	2 – 1	1.72 ± 1.07	1 – 0.5	0.57	5.76
c20	4 – 2	3.64 ± 0.45	2 – 1	1.30	5.44
c21	4 – 2	3.56 ± 0.76	2 – 1	1.33	5.45
c22	4 – 2	3.22 ± 0.06	2 – 1	1.00	5.49
c23	2 – 1	1.35 ± 0.07	1 – 0.5	0.44	5.87
c24	1 – 0.5	0.82 ± 0.07	0.5 – 0.25	0.27	6.09
c25	2 – 1	1.68 ± 0.09	1 – 0.5	0.57	5.77

Tabela 12. Atividade antimicrobiana frente a cepa de *Staphylococcus aureus* heterogênea com resistência intermediária à vancomicina hVISA-FCFHV36 (cont...)

Composto (R)	Intervalo de inibição (μM)	IC ₉₀ (μM)	Intervalo de inibição (μg/mL)	IC ₉₀ (μg/mL)	Log1/IC ₉₀
c26	4 – 2	2.80 ± 0.54	1 – 0.5	0.92	5.55
nifuroxazida	8 – 4	7.22 ± 0.29	2 – 1	1.99	5.14
nitrofurantoína	16 – 8	13.14 ± 0.94	4 – 2	3.13	4.88
oxacilina	s. a.	s. a.	s. a.	s. a.	s. a.
vancomicina	1 – 0.5	0.88 ± 0.05	2 – 1	1.28	6.06

Nota. IC₉₀: concentração capaz de inibir 90% do crescimento do micro-organismo; MIC: concentração inibitória mínima; μM: micro-molar; μg/mL: micro-gramas por mili-Litro; Log1/C: logaritmo do inverso da concentração (cálculo da potência do fármaco).

4.8 Atividade antimicrobiana dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos frente à *Staphylococcus epidermidis* multirresistente

A cepa de *Staphylococcus epidermidis* multirresistente foi isolada de uma paciente de 75 anos de idade, com acidente vascular cerebral isquêmico, internada na unidade de terapia intensiva do Hospital Beneficência Portuguesa em São Paulo, sudeste do Brasil (ALMEIDA *et al.*, 2012). A paciente foi tratada com terapia de linezolida durante 21 dias em decorrência de infecção do trato urinário causada por *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE), neste período foi isolada a cepa de *Staphylococcus epidermidis* (BF 734/08) associada ao uso prolongado de cateter vesical Foley. A infecção progrediu com febre persistente e, pouco tempo depois a paciente veio a óbito (ALMEIDA *et al.*, 2012).

A linezolida (**Figura 86**) é um fármaco antimicrobiano sintético da classe das oxazolidinonas de grande importância na prática clínica. É efetiva no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA), sendo utilizada no tratamento de pneumonia adquirida no ambiente hospitalar, pneumonia adquirida na comunidade, infecções de pele (GENTRY, 2013), assim como infecções causadas por *Streptococcus* spp. e enterococos resistentes à vancomicina (VRE) (ALMEIDA *et al.*, 2012).

A linezolida tem baixa atividade contra a maioria das bactérias Gram-negativas aeróbias e anaeróbias. Apresenta atividade bacteriostática contra estafilococos e enterococos e bactericida contra estreptococos. Para os estafilococos o ponto divisório para sensibilidade é de ≤ 4 μg/mL e ≤ 2 μg/mL para enterococos e estreptococos. *Mycobacterium tuberculosis* é moderadamente sensível, com MIC de 2 μg/mL.

Figura 86. Estrutura química da linezolida.

A linezolida inibe a síntese de proteínas através de sua ligação ao local P da subunidade 50S do ribossomo, impedindo a formação do maior complexo fMet-tRNA-ribossômico (*N*-formilmetionina-RNA transportador-ribossômico), que dá início a síntese de proteínas. Em razão do seu mecanismo de ação, a linezolida é ativa contra cepas que são resistentes a vários fármacos antimicrobianos, incluindo cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina, cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* heterogênea com resistência intermediária à vancomicina (hVISA), e cepas de *Enterococcus* sp. resistentes à vancomicina (VRE) (ALMEIDA *et al.*, 2014).

Embora a resistência a linezolida seja mediada pelo gene que codifica resistência ao cloranfenicol e florfenicol, **Figura 87** (cfr: chloramphenicol, florfenicol resistance) ou ainda por proteínas ribossomais (L3, L4 e L22), os mecanismos mais comuns de resistência estão relacionados ao domínio central V do gene que codifica a subunidade ribossomal 23S do rRNA (ALMEIDA *et al.*, 2012). A resistência nos estafilococos e enterococos é decorrente de mutações no gene de rRNA subunidade 23S (MACDOUGALL, CHAMBERS, 2012). É importante ressaltar que a resistência exige mutações de múltiplas cópias do gene do rRNA de 23S.

Figura 87. Estrutura química do cloranfenicol e flofenicol.

Em estudo realizado por Almeida e colaboradores (2012) foi identificado o clone ST2 que exibe mutação do tipo G2576T, sendo este o responsável pela disseminação de resistência a linezolida entre os estafilococos. Ainda segundo o estudo a cepa de *Staphylococcus epidermidis* é suscetível à vancomicina e teicoplanina, dados estes que foram confirmados

através da análise do perfil de sensibilidade utilizando equipamento VITEK do HU/USP. Além disso, confirmou-se também a resistência a linezolida ($MIC \geq 8 \mu\text{g/mL}$), e a multirresistência a outros agentes antimicrobianos de importância na prática clínica (**Tabela 13**).

Os estudos realizados com a cepa de *Staphylococcus epidermidis* multirresistente com perfil de resistência a linezolida demonstraram a mesma tendência para as modificações iniciais variando a cadeia alquílica, **Figura 88**.

Tabela 13. Sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus epidermidis* multirresistente

Antibiótico	MIC	Interpretação
B-Lactamase	Positivo	+
Teste de triagem de cefoxitina	Positivo	+
Oxacilina	≥ 4	R
Gentamicina	≥ 16	R
Ciprofloxacino	4	R
Moxifloxacino	1	I
Norfloxacino	≥ 16	R
Resistência induzida a clindamicina	Negativo	-
Eritromicina	0,5	S
Clindamicina	≥ 8	R
Linezolida	≥ 8	R
Teicoplanina	8	S
Vancomicina	1	S
Rifampicina	$\leq 0,5$	S
Sulfametoxazol – Trimetoprima	160	R

Nota. MIC: concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$); S: sensível; I: intermediário; R: resistente.

Verificou-se que o aumento da atividade é acompanhado do aumento da cadeia. Desse modo, **c1** ($IC_{90} = 6.02 \mu\text{M} \pm 0.04$; $MIC_{90} \leq 2 \mu\text{g/mL}$; $\text{Log1}/IC_{90} = 5.22$), **c2** ($IC_{90} = 6.22 \mu\text{M} \pm 0.18$; $MIC_{90} \leq 2 \mu\text{g/mL}$; $\text{Log1}/IC_{90} = 5.21$), e **c3** ($IC_{90} = 4.90 \mu\text{M} \pm 0.38$; $MIC_{90} \leq 2 \mu\text{g/mL}$; $\text{Log1}/IC_{90} = 5.31$).

Figura 88. Atividade antimicrobiana dos compostos c1, c2 e c3 frente à *Staphylococcus epidermidis* multirresistente.

Os compostos com grupo carbazato de etila, **c4** ($IC_{90} = 9.38 \mu\text{M} \pm 0.15$; $MIC_{90} \leq 4 \mu\text{g/mL}$; $\text{Log1}/IC_{90} = 5.03$) e 4-etoxi, **c5** ($IC_{90} = 1 \mu\text{M} \pm 0.06$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu\text{g/mL}$; $\text{Log1}/IC_{90} = 6$), **Figura 89**, mantiveram a tendência de atividade antimicrobiana dos compostos, apresentada

frente as bactérias anteriores, em que, a presença do anel benzênico que antecede o grupo etoxi favorece a atividade do composto. Neste caso, vale salientar que presença do anel benzênico melhorou significativamente a atividade do composto **c5**.

Figura 89. Atividade antimicrobiana dos compostos **c4** e **c5** frente à *Staphylococcus epidermidis* multirresistente.

Entre os compostos com grupo carbazato de *tert*-butila, **c6** (IC₉₀ = 11.50 µM ± 0.74; MIC₉₀ ≤ 4 µg/mL; Log1/IC₉₀ = 4.94), grupo ciano, **c7** (IC₉₀ = 6.04 µM ± 0.09; MIC₉₀ ≤ 2 µg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.22) e grupo benzenosulfonil, **c15** (IC₉₀ = 12.26 µM ± 0.88; MIC₉₀ ≤ 4 µg/mL; Log1/IC₉₀ = 4.91) notou-se que o composto **c7** foi o mais ativo, **Figura 90**.

Figura 90. Atividade antimicrobiana dos compostos **c6**, **c7** e **c15** frente à *Staphylococcus epidermidis* multirresistente.

A modificações realizadas com grupos heterocíclicos demonstraram que o composto com grupo tiofeno, **c9** (IC₉₀ = 3.15 µM ± 0.16; MIC₉₀ ≤ 1 µg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.50) apresentou melhor atividade em relação ao composto com grupo furano, **c8** (IC₉₀ = 3.30 µM ± 0.10; MIC₉₀ ≤ 1 µg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.48) e grupo 4-metil-1,2,3-tiodiazol, **c10** (IC₉₀ = 5.74 µM ± 0.22; MIC₉₀ ≤ 2 µg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.24). Entretanto, é importante observar que a diferença de atividade antimicrobiana entre os bioisósteros **c8** e **c9** não foi significativa, **Figura 91**.

Figura 91. Atividade antimicrobiana dos compostos **c8**, **c9** e **c10** frente à *Staphylococcus epidermidis* multirresistente.

Os compostos com grupos cicloalqui, **Figura 92**, apresentaram pouca diferença na atividade antimicrobiana, sendo observado que o composto com grupo ciclopentil, **c11** ($IC_{90} = 5.54 \mu M \pm 0.18$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.26$) foi mais ativo em relação ao composto com grupo ciclohexil, **c12** ($IC_{90} = 5.62 \mu M \pm 0.16$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.25$). O que denota que o tamanho do anel alifático neste caso, teve pouca influência na atividade dos compostos.

Figura 92. Atividade antimicrobiana dos compostos c11 e c12 frente à *Staphylococcus epidermidis* multirresistente.

Como observado anteriormente a presença do grupo metileno, CH_2 , no composto com grupo fenil, **c14** ($IC_{90} = 5.66 \mu M \pm 0.58$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.25$) reduz a atividade do composto e, na ausência do grupo metileno, a atividade é melhorada com a substituição direta pelo anel benzênico do composto **c13** ($IC_{90} = 4.80 \mu M \pm 0.08$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.32$), **Figura 93**.

Figura 93. Atividade antimicrobiana dos compostos c13 e c14 frente à *Staphylococcus epidermidis* multirresistente.

Os compostos com núcleos aromáticos isolados, bifenil (**c16**) e fenoxibenzêno (**c17**) exibiram o mesmo perfil de atividade antimicrobiana em relação as cepas anteriormente testadas, assim o composto com grupo bifenil, **c16** ($IC_{90} = 1.29 \mu M \pm 0.06$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.89$) se manteve mais ativo em relação ao composto com grupo fenoxibenzêno, **c17** ($IC_{90} = 5.20 \mu M \pm 1.11$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.28$), **Figura 94**.

Figura 94. Atividade antimicrobiana dos compostos c16 e c17 frente à *Staphylococcus epidermidis* multirresistente.

Entre os compostos com grupo 4-pentilciclohexil (**c18**) e 4-pentil (**c19**) verificou-se que a presença do núcleo aromático do composto **c19** (IC₉₀ = 1.12 μM ± 0.04; MIC₉₀ ≤ 0.5 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.95) favorece a atividade, comparado com o anel alifático do composto **c18** (IC₉₀ = 2.88 μM ± 0.08; MIC₉₀ ≤ 1 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.54), **Figura 95**.

Figura 95. Atividade antimicrobiana dos compostos c18 e c19 frente à *Staphylococcus epidermidis* multirresistente.

A introdução do oxigênio como heteroátomo no grupo 4-epitilo, **c21** (IC₉₀ = 1.10 μM ± 0.09; MIC₉₀ ≤ 0.5 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.96) se mostrou efetiva em relação ao grupo 4-epil, **c20** (IC₉₀ = 2.60 μM ± 0.15; MIC₉₀ ≤ 1 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.59) o qual possui cadeia alquílica diretamente ligada ao anel benzênico na posição *para*, **Figura 96**.

Figura 96. Atividade antimicrobiana dos compostos c20 e c21 frente à *Staphylococcus epidermidis* multirresistente.

As modificações estruturais realizadas no grupo naftaleno, **c22** (IC₉₀ = 1.81 μM ± 0.09; MIC₉₀ ≤ 1 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.74) demonstraram que o composto mais ativo desta vez foi o

com grupo hidroxila, OH, **c23** ($IC_{90} = 0.62 \mu M \pm 0.03$; $MIC_{90} \leq 0.25 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 6.21$). Apesar de ser um resultado diferente do que vinha sendo observado, no qual o composto com grupo amino, NH_2 , **c24** ($IC_{90} = 0.74 \mu M \pm 0.02$; $MIC_{90} \leq 0.25 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 6.13$) foi o mais ativo frente as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina e *Staphylococcus aureus* hVISA (FCFHV36), deve se considerar que os valores de atividade entre os compostos **c23**, **c24** e **c25** ($IC_{90} = 0.77 \mu M \pm 0.02$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 6.11$) foram bem próximos, **Figura 97**.

Quanto a variação com grupo flúor, **c26** ($IC_{90} = 1.30 \mu M \pm 0.16$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.89$), está se manteve como o de menor atividade dentro das variações deste grupo (**Figura 47**). Outro dado importante a ser observado é que todas as variações do grupo naftaleno foram mais ativas do que todos os fármacos de referência, inclusive à vancomicina ($IC_{90} = 1.40 \mu M$), (**Figura 98**). Os valores de atividade antimicrobiana estão disponíveis na **Tabela 14**.

Figura 97. Atividade antimicrobiana dos compostos com variações estruturais do grupo naftaleno frente à *Staphylococcus epidermidis* multirresistente.

nifuroxazida
IC₉₀ = 4.36 μM

nitrofurantoína
IC₉₀ = 8.46 μM

oxacilina
IC₉₀ = 12.66

vancomicina
IC₉₀ = 1.40 μM

Figura 98. Atividade antimicrobiana dos fármacos de referência frente à *Staphylococcus epidermidis* multirresistente

Entre os 26 compostos avaliados, 9 apresentaram atividade antimicrobiana ≤ 2 μM, entre eles os compostos: **c5**, **c16**, **c19**, **c21**, **c22**, **c23**, **c24**, **c25** e **c26**. Como apresentado na tabela a seguir.

Tabela 14. Atividade antimicrobiana dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos frente à *Staphylococcus epidermidis* multirresistente

Composto (R)	Intervalo de inibição (μM)	IC ₉₀ (μM)	Intervalo de inibição (μg/mL)	IC ₉₀ (μg/mL)	Log1/IC ₉₀
c1	8 – 4	6.02 ± 0.04	2 – 1	1.19	5.22
c2	8 – 4	6.22 ± 0.18	2 – 1	1.58	5.21
c3	8 – 4	4.90 ± 0.38	2 – 1	1.45	5.31
c4	16 – 8	9.38 ± 0.15	4 – 2	2.13	5.03
c5	2 – 1	1.00 ± 0.06	0.5 – 0.25	0.30	6.00
c6	16 – 8	11.50 ± 0.74	4 – 2	2.94	4.94
c7	8 – 4	6.04 ± 0.09	2 – 1	1.34	5.22
c8	4 – 2	3.30 ± 0.10	1 – 0.5	0.82	5.48
c9	4 – 2	3.15 ± 0.16	1 – 0.5	0.84	5.50
c10	8 – 4	5.74 ± 0.22	2 – 1	1.61	5.24
c11	8 – 4	5.54 ± 0.18	2 – 1	1.39	5.26
c12	8 – 4	5.62 ± 0.16	2 – 1	1.49	5.25
c13	8 – 4	4.80 ± 0.08	2 – 1	1.24	5.32
c14	8 – 4	5.66 ± 0.58	2 – 1	1.55	5.25
c15	16 – 8	12.26 ± 0.88	4 – 2	3.62	4.91
c16	2 – 1	1.29 ± 0.06	0.5 – 0.25	0.43	5.89
c17	8 – 4	5.20 ± 1.11	2 – 1	1.83	5.28
c18	4 – 2	2.88 ± 0.08	1 – 0.5	0.97	5.54

Tabela 14. Atividade antimicrobiana dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos frente à *Staphylococcus epidermidis* multirresistente (cont...)

Composto (R)	Intervalo de inibição (μM)	IC ₉₀ (μM)	Intervalo de inibição (μg/mL)	IC ₉₀ (μg/mL)	Log1/IC ₉₀
c19	2 – 1	1.12 ± 0.04	0.5 – 0.25	0.37	5.95
c20	4 – 2	2.60 ± 0.15	1 – 0.5	0.93	5.59
c21	2 – 1	1.10 ± 0.09	0.5 – 0.25	0.41	5.96
c22	2 – 1	1.81 ± 0.09	1 – 0.5	0.56	5.74
c23	1 – 0.5	0.62 ± 0.03	≤ 0.25	0.20	6.21
c24	1 – 0.5	0.74 ± 0.02	≤ 0.25	0.24	6.13
c25	1 – 0.5	0.77 ± 0.02	0.5 – 0.25	0.26	6.11
c26	2 – 1	1.30 ± 0.16	0.5 – 0.25	0.43	5.89
nifuroxazida	8 – 4	4.36 ± 0.54	2 – 1	1.20	5.36
nitrofurantoína	16 – 8	8.46 ± 0.60	4 – 2	2.01	5.07
oxacilina	16 – 8	12.66 ± 0.36	8 – 4	5.08	4.90
vancomicina	2 – 1	1.40 ± 0.28	4 – 2	2.03	5.85

Nota. IC₉₀: concentração capaz de inibir 90% do crescimento do micro-organismo; MIC: concentração inibitória mínima; μM: micro-molar; μg/mL: micro-gramas por mili-Litro; Log1/C: logaritmo do inverso da concentração (cálculo da potência do fármaco).

4.9 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos frente à *Enterococcus faecalis* fenótipo *vanA*

A cepa de *Enterococcus faecalis* foi isolada a partir de cultura de urina, de paciente internado na unidade de terapia intensiva do Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo. A presença do gene do tipo *vanA* que confere resistência a vancomicina, foi identificada a partir da amplificação do gene, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, polimerase chain reaction), seguida de caracterização em eletroforese de campo pulsado (PFGE, pulsed field gel electrophoresis) e, análise de sequência multilocus (MLST, multilocus sequence typing) (ALMEIDA *et al.*, 2014).

A vancomicina (**Figura 99**) é um antibiótico da classe dos glicopeptídeos produzido pelo *Streptococcus orientalis*. É ativa contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas, que incluem o *Staphylococcus aureus* (MIC ≤ 2 μg/mL), *Staphylococcus epidermidis* (MIC ≤ 4 μg/mL), estreptococos, *Bacillus* spp., incluindo *B. anthracis* (MIC ≤ 2 μg/mL). Espécies de *Corynebacterium* (difteroides) são inibidas em concentrações menores que 3 μg/mL.

Figura 99. Estrutura química da vancomicina

A maioria das espécies de *Clostridium* são inibidos em concentração menores 6 µg/mL. Praticamente todas espécies de bacilos Gram-negativos e micobactérias são resistentes à vancomicina (MACDOUGALL, CHAMBERS, 2012).

Quanto ao mecanismo de ação, a vancomicina inibe a síntese de parede celular de bactérias sensíveis através de sua ligação de alta afinidade à extremidade terminal D-alanil-D-alanina das unidades precursoras da parede celular. Em razão do seu tamanho e peso molecular, a vancomicina é incapaz de penetrar na membrana externa de bactérias Gram-negativas (MACDOUGALL, CHAMBERS, 2012).

Anos atrás, as cepas de enterococos eram sensíveis a ação da vancomicina, assim como da teicoplanina. Atualmente, cepas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* resistentes a ação da vancomicina vem sendo isoladas de infecções hospitalares, bem como de infecções adquiridas na comunidade (ALMEIDA *et al.*, 2014; SACRAMENTO *et al.*, 2016).

A resistência dos enterococos à vancomicina ocorre através de um transposon que faz parte de um plasmídeo conjugativo, que permite a transferência dos genes de resistência para outras bactérias Gram-positivas. Em geral, as cepas de *E. faecium* e *E. faecalis* são multirresistentes e, sua resistência aos glicopeptídeos é resultado de uma alteração do alvo D-alanil-D-alanina em D-alanil-D-lactato ou D-alanil-D-serina. Com a alteração do alvo a interação entre o antibiótico e o receptor ocorre parcialmente, uma vez que, a alteração gera ausência de um local para formação de ligação de hidrogênio. Dentro do grupo gênico *van* são necessárias várias enzimas para causar alteração desse alvo (MACDOUGALL, CHAMBERS, 2012).

Vários fenótipos de resistência aos glicopeptídeos já foram descritos na literatura, entre eles, o fenótipo *vanA* que confere resistência induzível à vancomicina e teicoplanina em *E. faecalis* e *E. faecium*. O fenótipo *vanB* produz níveis mais baixos de resistência, porém, também já foi identificado em *E. faecium* e *E. faecalis*. Esse fenótipo é induzível pela vancomicina, mas não pela teicoplanina, sendo esta usada como fármaco de escolha para tratar cepas sensíveis. O fenótipo *vanC* tem menor importância clínica e está menos caracterizado, é constitutivo e confere resistência apenas à vancomicina, não sendo encontrado em outras espécies de enterococos, a não ser em *E. faecium* e *E. faecalis*. Ainda que pouco descritos, outros grupos de genes *vanD* e *vanE* foram identificados (MACDOUGALL, CHAMBERS, 2012).

A cepa de *Enterococcus faecalis* teve seu perfil de sensibilidade confirmado através análise automatizada feita utilizando aparelho VITEK do HU/USP. Esta cepa apresentou resistência à vancomicina (MIC ≥ 32 µg/mL) e teicoplanina (MIC ≥ 32 µg/mL), sendo sensível apenas a linezolida (MIC ≤ 2 µg/mL) (**Tabela 15**).

Tabela 15. Sensibilidade antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina fenótipo *vanA*

Antibiótico	MIC	Interpretação
β-Lactamase	Negativa	-
Benzilpenicilina	16	R
Gentamicina Alto Nível (Sinergia)	SIN-R	R
Estreptomicina Alto Nível (Sinergia)	SIN-S	S
Ciprofloxacino	≥ 8	R
Norfloxacino	≥ 16	R
Eritromicina	4	I
Linezolida	2	S
Teicoplanina	≥ 32	R
Vancomicina	≥ 32	R

Nota. MIC: concentração inibitória mínima (µg/mL); S: sensível; I: intermediário; R: resistente; SIN-R: sinergismo resistente; SIN-S: sinergismo suscetível.

Os estudos realizados com a cepa de *Enterococcus faecalis* fenótipo *vanA* demonstraram a mesma tendência para as modificações iniciais variando a cadeia alquílica. Notou-se que o aumento da cadeia alquílica contribuiu para o aumento da atividade antimicrobiana dos compostos de conjunto. Desse modo, **c1** (IC₉₀ = 6.65 µM ± 0.29; MIC₉₀ ≤ 2 µg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.18), **c2** (IC₉₀ = 7.04 µM ± 0.13; MIC₉₀ ≤ 2 µg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.15), e **c3** (IC₉₀ = 5.10 µM ± 0.48; MIC₉₀ ≤ 2 µg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.29), **Figura 100**.

Figura 100. Atividade antimicrobiana dos compostos c1, c2 e c3 frente à *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina.

Os compostos com grupo carbazato de etila, **c4** ($IC_{90} = 9.96 \mu M \pm 0.30$; $MIC_{90} \leq 4 \mu g/mL$; $\text{Log1}/IC_{90} = 5$) e 4-etoxi, **c5** ($IC_{90} = 1.04 \mu M \pm 0.04$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $\text{Log1}/IC_{90} = 5.98$), **Figura 101**, mantiveram a tendência de atividade antimicrobiana dos compostos, em que, a presença do anel benzênico que antecede o grupo etoxi favorece a atividade do composto. Neste caso, vale salientar que presença do anel benzênico melhorou significativamente a atividade do composto **c5**. Além disso, observou-se que os valores de IC_{90} foram bem próximos dos obtidos quando a avaliação da atividade antimicrobiana frente a cepa de *Staphylococcus epidermidis* multirresistente, no qual foram obtidos **c4** ($IC_{90} = 9.38 \mu M$) e **c5** ($IC_{90} = 1 \mu M$).

Figura 101. Atividade antimicrobiana dos compostos c4 e c5 frente à *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina.

Entre os compostos com grupo carbazato de *tert*-butila, **c6** ($IC_{90} = 10.04 \mu M \pm 0.02$; $MIC_{90} \leq 4 \mu g/mL$; $\text{Log1}/IC_{90} = 5$), grupo ciano, **c7** ($IC_{90} = 7.18 \mu M \pm 0.58$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $\text{Log1}/IC_{90} = 5.14$) e grupo benzenosulfonil, **c15** ($IC_{90} = 12.07 \mu M \pm 0.58$; $MIC_{90} \leq 4 \mu g/mL$; $\text{Log1}/IC_{90} = 4.90$) notou-se que o composto **c7** foi o mais ativo, **Figura 102**.

Figura 102. Atividade antimicrobiana dos compostos c6, c7 e c15 frente à *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina.

A modificações realizadas com grupos heterocíclicos, **Figura 103**, demonstraram que o composto com grupo tiofeno, **c9** ($IC_{90} = 3.23 \mu M \pm 0.19$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.49$) apresentou melhor atividade em relação ao composto com grupo furano, **c8** ($IC_{90} = 3.45 \mu M \pm 0.44$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.46$) e grupo 4-metil-1,2,3-tiodiazol, **c10** ($IC_{90} = 6.44 \mu M \pm 0.75$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.19$). Entretanto, é importante observar que a diferença de atividade antimicrobiana entre os bioisósteros **c8** e **c9** não foi significativa.

Figura 103. Atividade antimicrobiana dos compostos **c8**, **c9** e **c10** frente à *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina.

Os compostos com grupos cicloalquil, **Figura 104**, apresentaram pouca diferença na atividade antimicrobiana, sendo observado que o composto com grupo ciclohexil, **c12** ($IC_{90} = 5.72 \mu M \pm 0.19$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.24$) foi mais ativo em relação ao composto com grupo ciclopentil, **c11** ($IC_{90} = 6.38 \mu M \pm 0.43$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.20$). Neste caso observou-se que o aumento do tamanho do anel alifático promoveu consequente aumento da atividade antimicrobiana do composto **c12**.

Figura 104. Atividade antimicrobiana dos compostos **c11** e **c12** frente à *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina.

Como observado anteriormente em relação aos grupos benzênicos, a presença do grupo metileno, CH_2 , no composto com grupo fenil, **c14** ($IC_{90} = 6.27 \mu M \pm 0.84$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.20$) reduz a atividade do composto e, na ausência do grupo metileno, CH_2 , a atividade é melhorada com a substituição direta pelo anel benzênico do composto **c13** ($IC_{90} = 5.62 \mu M \pm 0.12$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.25$), **Figura 105**.

c13IC₉₀ = 5.62 μM **c14**IC₉₀ = 6.27 μM

Figura 105. Atividade antimicrobiana dos compostos c13 e c14 frente à *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina.

Os compostos com núcleos aromáticos isolados, bifenil (**c16**) e fenoxibenzêno (**c17**), **Figura 106**, exibiram o mesmo perfil de atividade antimicrobiana em relação as cepas anteriormente testadas, assim o composto com grupo bifenil, **c16** (IC₉₀ = 1.44 μM ± 0.07; MIC₉₀ ≤ 0.5 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.84) se manteve mais ativo em relação ao composto com grupo fenoxibenzêno, **c17** (IC₉₀ = 5.79 μM ± 0.38; MIC₉₀ ≤ 4 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.24).

c16IC₉₀ = 1.44 μM **c17**IC₉₀ = 5.79 μM

Figura 106. Atividade antimicrobiana dos compostos c16 e c17 frente à *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina.

Entre os compostos com grupo 4-pentilciclohexil (**c18**) e 4-pentil (**c19**) verificou-se que a presença do núcleo aromático do composto **c19** (IC₉₀ = 1.72 μM ± 0.01; MIC₉₀ ≤ 1 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.76) contribui com a atividade, comparado com o anel alifático do composto **c18** (IC₉₀ = 4.24 μM ± 0.34; MIC₉₀ ≤ 2 μg/mL; Log1/IC₉₀ = 5.37), **Figura 107**.

c18IC₉₀ = 4.24 μM **c19**IC₉₀ = 1.72 μM

Figura 107. Atividade antimicrobiana dos compostos c18 e c19 frente à *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina.

A introdução do oxigênio como heteroátomo no grupo 4-epitiloxi, **c21** ($IC_{90} = 1.46 \mu M \pm 0.38$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.84$) se mostrou efetiva em relação ao grupo 4-epitil, **c20** ($IC_{90} = 4.28 \mu M \pm 0.44$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.37$) o qual possui cadeia alquílica diretamente ligada ao anel benzênico na posição *para*, **Figura 108**.

Figura 108. Atividade antimicrobiana dos compostos **c20** e **c21** frente à *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina.

As modificações estruturais realizadas no grupo naftaleno, **c22** ($IC_{90} = 2.06 \mu M \pm 0.13$; $MIC_{90} \leq 1 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.69$), indicam que o composto com grupo amino, NH_2 , **c24** ($IC_{90} = 0.72 \mu M \pm 0.02$; $MIC_{90} \leq 0.25 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 6.14$) foi o mais ativo, seguido pelo composto com grupo hidroxila, OH , **c23** ($IC_{90} = 0.74 \mu M \pm 0.01$; $MIC_{90} \leq 0.25 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 6.13$), com grupo metóxi, **c25** ($IC_{90} = 1.16 \mu M \pm 0.18$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.94$) e grupo flúor, **c26** ($IC_{90} = 1.51 \mu M \pm 0.06$; $MIC_{90} \leq 0.5 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.82$). O composto **c24** demonstrou atividade superior a todos os compostos e fármacos de referência, como a nifuroxazida ($IC_{90} = 5.09 \mu M \pm 0.08$; $MIC_{90} \leq 2 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.29$), nitrofurantoína ($IC_{90} = 9.28 \mu M \pm 0.32$; $MIC_{90} \leq 4 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 5.03$) e oxacilina ($IC_{90} = 12.26 \mu M \pm 0.72$; $MIC_{90} \leq 8 \mu g/mL$; $Log1/IC_{90} = 4.91$).

Em resumo, as modificações realizadas na estrutura química do composto-protótipo, a nifuroxazida, se mostraram promissoras no processo de identificação de compostos com melhor perfil de atividade antimicrobiana frente as cepas de bactérias multirresistentes. Dos 26 compostos avaliados frente a cepa de *Enterococcus faecalis* foram identificados 9 compostos com atividade antimicrobiana significativa, considerando como promissores aqueles que apresentaram atividade antimicrobiana frente a todas as cepas de bactérias testadas em *média* $\leq 2 \mu M$ (**Tabela 16**). Entre os quais estão: **c5**, **c16**, **c19**, **c21**, **c22**, **c23**, **c24**, **c25** e **c26**. Este valor foi adotado como referência para seleção dos compostos mais ativos com vistas a identificação de compostos com valores de atividade semelhante e/ou melhor em relação à vancomicina, a qual apresenta melhor espectro de atividade frente a cepas com caráter de multirresistência.

Tabela 16. Atividade antimicrobiana dos compostos frente à *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina fenótipo *vanA*

Composto (R)	Intervalo de inibição (μM)	IC ₉₀ (μM)	Intervalo de inibição (μg/mL)	IC ₉₀ (μg/mL)	Log1/IC ₉₀
c1	8 – 4	6.65 ± 0.29	2 – 1	1.31	5.18
c2	8 – 4	7.04 ± 0.13	2 – 1	1.78	5.15
c3	8 – 4	5.10 ± 0.48	2 – 1	1.51	5.29
c4	16 – 8	9.96 ± 0.30	4 – 2	2.26	5.00
c5	2 – 1	1.04 ± 0.04	0.5 – 0.25	0.32	5.98
c6	16 – 8	10.04 ± 0.02	4 – 2	2.56	5.00
c7	8 – 4	7.18 ± 0.58	2 – 1	1.60	5.14
c8	4 – 2	3.45 ± 0.44	1 – 0.5	0.86	5.46
c9	4 – 2	3.23 ± 0.19	1 – 0.5	0.86	5.49
c10	8 – 4	6.44 ± 0.75	2 – 1	1.81	5.19
c11	8 – 4	6.38 ± 0.43	2 – 1	1.60	5.20
c12	8 – 4	5.72 ± 0.19	2 – 1	1.52	5.24
c13	8 – 4	5.62 ± 0.12	2 – 1	1.46	5.25
c14	8 – 4	6.27 ± 0.84	2 – 1	1.71	5.20
c15	16 – 8	12.70 ± 0.58	4 – 2	3.75	4.90
c16	2 – 1	1.44 ± 0.07	0.5 – 0.25	0.48	5.84
c17	8 – 4	5.79 ± 0.38	4 – 2	2.03	5.24
c18	8 – 4	4.24 ± 0.34	2 – 1	1.42	5.37
c19	2 – 1	1.72 ± 0.01	1 – 0.5	0.57	5.76
c20	8 – 4	4.28 ± 0.44	2 – 1	1.53	5.37
c21	2 – 1	1.46 ± 0.38	1 – 0.5	0.55	5.84
c22	4 – 2	2.06 ± 0.13	1 – 0.5	0.64	5.69
c23	1 – 0.5	0.74 ± 0.01	≤ 0.25	0.24	6.13
c24	1 – 0.5	0.72 ± 0.02	≤ 0.25	0.23	6.14
c25	2 – 1	1.16 ± 0.18	0.5 – 0.25	0.39	5.94
c26	2 – 1	1.51 ± 0.06	0.5 – 0.25	0.49	5.82
nifuroxazida	8 – 4	5.09 ± 0.08	2 – 1	1.40	5.29
nitrofurantoína	16 – 8	9.28 ± 0.32	4 – 2	2.21	5.03
oxacilina	16 – 8	12.26 ± 0.72	8 – 4	4.92	4.91
vancomicina	s. a.	s. a.	s. a.	s. a.	s. a.

Nota. IC₉₀: concentração capaz de inibir 90% do crescimento do micro-organismo; MIC: concentração inibitória mínima; μM: micro-molar; μg/mL: micro-gramas por mili-Litro; Log1/C: logaritmo do inverso da concentração (cálculo da potência do fármaco).

Figura 109. Atividade antimicrobiana dos compostos com variações estruturais do grupo naftaleno frente *Enterococcus faecalis* fenótipo Van A

Figura 110. Atividade antimicrobiana dos fármacos de referência frente *Enterococcus faecalis* fenótipo Van A.

Considerando o parâmetro anteriormente citado, foram considerados com melhor atividade antimicrobiana os com grupos substituintes 4-etóxi, **c5** (1.24 μ M), bifenil, **c16** (1,24 μ M), 4-epitilóxi, **c21** (1.78 μ M) e os compostos com estrutura química análoga a do composto elegido líder da série com grupo naftaleno **c22** (1.69 μ M), hidroxila, OH, **c23** (0.92 μ M), amino, NH₂, **c24** (0.62 μ M), metóxi, OCH₃, **c25** (1.02 μ M) e flúor, **c26** (1.64 μ M). A partir dos

resultados obtidos dentro desse conjunto, identificamos como composto mais ativo da série o composto **c24**, visto que este manteve atividade antimicrobiana promissora frente a todas as cepas de bactérias analisadas nos ensaios de atividade antimicrobiana.

O composto **c24** demonstrou ainda atividade semelhante à da vancomicina frente as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (**c24**: 0.31 μ M; vancomicina: 0.31 μ M) e *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (**c24**: 0.52 μ M; vancomicina: 0.50 μ M). Além desses resultados, a constatação de maior relevância foi a de que este composto foi mais ativo do que à vancomicina frente as cepas de *Staphylococcus aureus* hVISA–FCFHV36 (**c24**: 0.82 μ M; vancomicina: 0.88 μ M) e *Staphylococcus epidermidis* multirresistente (**c24**: 0.74 μ M; vancomicina: 1.40 μ M), com destaque para a atividade antimicrobiana frente cepa de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina, **c24**, 0.72 μ M.

A frequência e distribuição dos compostos em relação a todas as cepas de bactérias estudadas, reafirma a importância da busca por novas alternativas terapêuticas para combater as infecções de caráter de multirresistência.

Figura 111. Frequência e distribuição dos compostos mais ativos frente a cepas de bactérias multirresistentes
 ● *S. aureus* ATCC 29213; ■ *S. aureus* resistente à oxacilina; ▲ *S. aureus* hVISA (FCFHV36);
 ● *S. epidermidis* multirresistente; ◆ *Enterococcus faecalis* VRE vanA.

A leitura do gráfico permite observar que do conjunto de 26 compostos avaliados, 18 (69%) foram ativos frente *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; 14 (54%) frente

Staphylococcus aureus resistente à oxacilina; 5 (19%) frente *Staphylococcus aureus* cepa heterogênea com resistência intermediária à vancomicina, hVISA–FCFHV36; 9 (34%) frente a cepa de *Staphylococcus epidermidis* com perfil de resistência à linezolida; e 9 (34%) frente a *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina, fenótipo *vanA*.

Vale salientar que apesar do composto **c24** ter se destacado nos ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana frente as cepas testadas, outros compostos apresentaram atividade considerável, sendo também possíveis candidatos a novos fármacos antimicrobianos. Entre eles destacam-se na **Tabela 17** os seguintes compostos: **c5** (grupo 4-etoxi), **c16** (grupo bifenil), **c19** (grupo 4-pentano), **c21** (grupo 4-epitoxi), **c22** (grupo naftaleno), **c23** (grupo 15-hidroxi-naftaleno), **c25** (15-metoxi-naftaleno) e **c26** (15-flúor-naftaleno).

Tabela 17. Resumo dos valores médios de atividade antimicrobiana dos compostos (IC₉₀ µM) frente as cepas de bactérias multirresistentes

Comp.	<i>S. aureus</i> ATCC	<i>S. aureus</i> OXA-R	<i>S. aureus</i> hVISA	<i>S. epidermidis</i> MDR	<i>E. faecalis</i> VRE	Média	Desvio Padrão
c1	3.29	5.30	9.44	6.02	6.65	6.14	2.23
c2	2.03	5.34	11.08	6.22	7.04	6.34	3.26
c3	1.24	3.70	6.05	4.90	5.10	4.19	1.85
c4	4.74	4.63	14.2	9.38	9.96	8.58	4.01
c5	0.84	1.14	2.20	1	1.04	1.24	0.54
c6	0	13.88	0	11.5	10.04	7.08	6.61
c7	4.92	11.62	13.84	6.04	7.18	8.72	3.82
c8	1.48	2.09	4.46	3.30	3.45	2.95	1.17
c9	1.87	2.85	5.62	3.15	3.23	3.34	1.38
c10	1.88	1.51	6.52	5.74	6.44	4.41	2.50
c11	2.52	5.01	5.75	5.54	6.38	5.04	1.49
c12	2.66	4.18	6.36	5.62	5.72	4.90	1.48
c13	1.23	3.02	6.10	4.80	5.62	4.15	2.01
c14	1.95	4.48	6.34	5.66	6.27	4.94	1.83
c15	0	10.81	0	12.26	12.7	7.15	6.56
c16	0.74	1.81	2.66	1.29	1.44	1.58	0.71
c17	1.59	2.05	12.5	5.20	5.79	5.42	4.36
c18	0.99	2.08	3.67	2.88	4.24	2.77	1.28
c19	0.90	1.54	1.72	1.12	1.72	1.40	0.37
c20	1.40	1	3.64	2.60	4.28	2.58	1.40
c21	2.28	0.54	3.56	1.10	1.46	1.78	1.17
c22	0.62	0.77	3.22	1.81	2.06	1.69	1.05
c23	0.66	1.27	1.35	0.62	0.74	0.92	0.35
c24	0.31	0.52	0.82	0.74	0.72	0.62	0.20
c25	0.42	1.09	1.68	0.77	1.16	1.02	0.46
c26	0.94	1.68	2.80	1.3	1.51	1.64	0.70
NF	2.39	5.37	7.22	4.36	5.09	4.88	1.74
NTF	5.26	8.2	13.14	8.46	9.28	8.86	2.83
OXA	1.14	0	0	12.66	12.26	5.21	6.63
VANC	0.31	0.50	0.88	1.40	0	0.61	0.54

Nota. NF: nifuroxazida; NTF: nitrofurantoína; OXA: oxacilina; OXA-R: oxacilina resistente; hVISA: *Staphylococcus aureus* heterogênea com resistência intermediária à vancomicina; MDR: multirresistente; VRE: enterococos resistentes à vancomicina.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho teve por objetivo estudar a atividade antimicrobiana de compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos frente a cepas multirresistentes de grande importância nas infecções relacionadas à assistência à saúde, e também naquelas adquiridas na comunidade. Para isto, foi feito planejamento da série de compostos com base na Regra dos 5 de Lipinski e através do Diagrama de Craig.

Os compostos planejados foram sintetizados e identificados quanto ao grau de pureza, ficando evidenciado que todos foram obtidos com grau de pureza satisfatório. Quanto ao rendimento, os resultados também se mostraram satisfatórios, uma vez que, a síntese possibilitou a obtenção dos compostos com rendimento entre 65 e 98%.

A avaliação da atividade antimicrobiana frente as cepas de bactérias multirresistentes de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina, *Staphylococcus aureus* cepa heterogênea com resistência intermediária à vancomicina, hVISA-FCFHV36, *Staphylococcus epidermidis* com perfil de resistência a linezolida e, *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina fenótipo *vanA*, demonstraram que a modificação química da nifuroxazida foi extremamente promissora, visto que, do conjunto de vinte e seis compostos sintetizados e avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana, foi possível identificar um composto (**c24**) com atividade superior a todos os demais compostos, além de apresentar melhor atividade em relação ao composto-protótipo nifuroxazida, e aos fármacos de referência: nitrofurantoína, oxacilina e vancomicina. Ressalta-se novamente que outros compostos da série são importantes e aproveitáveis por terem apresentado atividade antimicrobiana significativa, tais como os compostos: **c5** (grupo 4-etoxi), **c16** (grupo bifenil), **c19** (grupo 4-pentano), **c21** (grupo 4-epitloxi), **c22** (grupo naftaleno), **c23** (grupo 15-hidroxi-naftaleno), **c25** (15-metoxi-naftaleno) e **c26** (15-flúor-naftaleno).

Considerando os resultados obtidos, os estudos de relação estrutura-atividade dos compostos indicam que a atividade antimicrobiana, tem importante relação com o coeficiente de partição (ClogP), que significa que a atividade é influenciada pelo equilíbrio hidrófilo/lipofílico, sendo observado para a modificação do composto **c24**, no qual a introdução do grupo amino, NH₂, (caracteristicamente hidrofílico) na estrutura naftalênica foi favorável em relação ao composto de origem **c22** apenas com grupo naftaleno, ou seja, a atividade do composto **c24** foi melhorada em relação ao composto **c22** em razão do aumento da sua hidrofiliidade, como demonstrado através do mapa de potencial lipofílico apresentado na **Figura 112**.

Figura 112. Mapas de potencial lipofílico da nifuroxazida, e dos compostos **c22** e **c24**. (SYBYL-X[®] Drug Design and Discovery Software Suite)

Os resultados indicam ainda que a atividade do composto **c24** foi melhorada em razão do aumento da área de superfície polar (PSA) em relação a do composto **c22**, sendo este um descritor que permite estimar ou correlacionar a passagem da molécula através membranas por meio de transporte passivo através de sistemas biológicos. Desse modo fica evidenciado que a combinação entre o CloP e PSA foram determinantes na atividade do composto mais ativo.

Assim, conclui-se que a modificação química da nifuroxazida, um dos fármacos da classe dos nitrofuranos, os quais foram inseridos na terapêutica entre os anos de 1940 e 1950, se mostra promissora na descoberta de novas alternativas para o combate de infecções multirresistentes.

Como perspectivas futuras para a continuidade deste trabalho citam-se:

- Realizar estudos de toxicidade;
- Avaliar os compostos sob os aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos;
- Promover novas modificações com objetivo de ampliar o espectro de atividade com relação aos micro-organismos Gram-negativos;
- Realizar estudos de ancoramento molecular (*Molecular Docking*) com base no citocromo-*c*, com vistas a elucidação das possíveis vias que compõe o mecanismo de ação dos nitrocompostos, haja visto que, existem evidências na literatura de que os nitrocompostos causam “perturbação” na cadeia de transporte de elétrons pelo citocromo-*c*. Sendo possível que a translocação do citocromo-*c* para o citoplasma e consequente ativação das vias de apoptose esteja relacionado com o mecanismo de ação.
- Produzir os compostos mais ativo na forma de sal com intuito de possivelmente avaliar sua atividade tópica, assim como utilizar a forma para realizar estudos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. M.; ARAÚJO, M. R. E.; IWASAKI, M. F.; SACRAMENTO, A. G.; ROCHA, D.; SILVA, L. P.; PAVEZ, M.; BRITO, A. C.; ITO, L. C. S.; GALES, A. C.; LINCOPAN, N.; SAMPAIO, J. L. M.; MAMIZUKA, E. M. Linezolid resistance in vancomycin-resistance *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates in a brazilian hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2993-2994, 2014.
- ALMEIDA, L. M.; LINCOPAN, N. ARAÚJO, M. R. E.; MAMIZUKA, E. M. Dissemination of the linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone ST2 exhibiting the G2576T mutations in the 23S rRNA gene in a tertiary-care hospital, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 3, p. 768-784, 2012.
- ANDERSON, R. J.; GROUNDWATER, P. W.; TODD, A.; WORSLEY, A. J. **Antibacterial agents: chemistry, mode of action, mechanisms of resistance, and clinical applications**. 1st. Ed. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, 2012. 363 p.
- ANWAR, K. P.; MALIK, A.; SUBHAN, K. H. Profile of candidiasis in HIV infected patients. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 204-209, 2012.
- BARBEDO, L. S.; & SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.
- BBC BRASIL. Merck é condenada a pagar indenização de R\$ 600 milhões (2005). Disponível em: http://www.bbc.com/portuguese/ciencia/story/2005/08/050820_vioxxro1.shtml. Acesso em: 13 de Setembro de 2017.
- BBC BRASIL. Superbactérias matarão 1 pessoa a cada 3 segundos em 2050. Disponível em: <http://www.bbc.com/portuguese/geral-36330413>. Acesso em 31 de Outubro de 2016.
- BEILSTEIN'S Handbuch der Organischen Chemie. 5. Ed. Berlin: Springer-Verlag, 1979.
- BLUMENSTIEL, K.; SCHÖNECK, R.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Nitrofurán drugs as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 11, p. 1791-1799, 1999.
- BOSQUESI, P. L.; ALMEIDA, A. E.; BLAU, L.; MENEGON, R. F.; SANTOS, J. L.; CHUNG, M. C. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 3, 231-238, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 2.616, de 12 de Maio de 1998. Expede na forma de anexos I, II, III, IV, V, diretrizes e normas para a prevenção e o controle das infecções hospitalares. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 maio. 1998. Seção I.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Assunto: Detecção de metalobetalactamases do tipo NDM em dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* na Guatemala. Alerta n. 1, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Circulação de micro-organismos com mecanismo de resistência denominado “New Dehli Metalobetalactamases” ou NDM no Brasil. Comunicado de risco n. 001, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos. Termo de Cooperação n° 37, OPAS/ANVISA/SVS, 2006.

BrightFocus® Fundation. Cure in Mind. Cure in Sight. BrightFocus and Clinical Trials, 2013. Disponível em: <https://www.brightfocus.org/clinical-trials/brightfocus-clinical-trials>. Acesso em: 13 de Setembro de 2017.

BRITO, D. V. D.; BRITO, C. S.; RESENDE, D. S.; Ó, J. M.; ABDALLAH, V. O. S.; and FILHO, P. P. G. Nosocomial infections in a Brazilian neonatal intensive care unit: a 4-year surveillance study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 633-637, 2010.

CAREY, F.A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry**. 4th. Ed. New York: Plenum Press, 2000. 1275 p.

CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C.; SANTOS, J. M.; SANTANA, W. J.; SOUZA, L. B. S. Mecanismos resistência da Candida sp. WWA antifúngicos. **Infarma**, v. 8, n. 9, p. 30-35, 2006.

CENTER DISEASE FOR CONTROL AND PREVENTION. U.S. Department of Health and Human Services. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.

CHOPRA, I. The 2012 Garrod Lecture: discovery of antibacterial drugs in the 21st century. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 3, p. 496-505, 2013.

CHUNG, M. C.; BOSQUESI, P. L.; SANTOS, J. L. A produg approach to improve the physico-chemical properties and decrease the genotoxicity of nitro compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 32, p. 3515-3526, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE®. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard – Ninth Edition. M07-A9, v. 32, n. 2, January. 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE®. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23, January. 2013.

CONCEIÇÃO, N.; DARINI, A. L. C.; PALAZZO, I. C. V.; OLIVEIRA, C. C. H. B.; OLIVEIRA, A. C. First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Uberaba, Minas Gerais State. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 34-36, 2010.

COSTA, F. C.; PINHEIRO, A. C.; DE ALMEIDA, M. V.; LOURENÇO, M. C. S.; DE SOUZA, M. V. N. Synthesis and antitubercular activity of novel amino acid derivatives. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 79, p. 216-222, 2012.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 287-292, 2013.

DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 616-687, 2010.

DODDS, T. J.; HAWKET, C. I. Linezolid versus vancomycin for MRSA skin and soft tissue infections (systematic review and meta-analysis). **ANZ Journal of Surgery**, v. 79, n. 9, p. 629-635, 2009.

DRUGS. KNOW MORE. BE SURE. Looking ahead: pharma projections for 2016 and beyond. March 30, 2017. Disponível em: <https://www.drugs.com/slideshow/looking-ahead-pharma-projections-for-2016-and-beyond-1230>. Acesso em: 05 de Setembro de 2017.

EL-BOIED, H. A.; ELNIMA, E. I.; AL-BADR, A. A. Synthesis and antimicrobial activity of new furan derivatives. **Pharmaceutical Research**, v. 2, n.1 p. 42-43, 1985.

ÉPOCA NEGÓCIOS. Pfizer vende fatia no Teuto a sócios nacionais. REVISTA ÉPOCA. 4 de Junho de 2017. Disponível em: <http://epocanegocios.globo.com/Empresa/noticia/2017/07/epoca-negocios-pfizer-vende-fatia-no-teuto-a-socios-nacionais.html>. Acesso em: 10 de Setembro de 2017.

EXAME. A Sanofi começou mal com a Medley e a situação só piorou. REVISTA EXAME. 21 de Fevereiro de 2014. Disponível em: <http://exame.abril.com.br/revista-exame/comecou-mal-e-so-piorou/>. Acesso em: 10 de Setembro de 2017.

EXAME. Biotecnologia, a nova arma contra o câncer. 17 de Julho de 2012. Disponível em: <http://exame.abril.com.br/revista-exame/biotecnologia-a-nova-arma-contr-o-cancer/>. Acesso em: 16 de Setembro de 2017.

EXAME. Hypermarchas compra laboratório Neo Química por cerca de R\$ 1,3 bi. REVISTA EXAME. 10 de Outubro de 2010. Disponível em: <http://exame.abril.com.br/negocios/hypermarchas-compra-laboratorio-neo-quimica-cerca-r-1-3-bi-517623/>. Acesso em 10 de Setembro de 2017.

FERNANDES, M. R.; MCCULLOCH, J. A.; VIANELLO, M. A.; MOURA, Q.; CHAPARRO, P. J. P.; ESPOSITO, F.; SARTORI, L.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; LIRA, D. P. A.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. First report of the globally disseminated incX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a human infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6415-6427, 2016^a.

FERNANDES, M. R.; MOURA, Q.; SATORI, L.; SILVA, K. C.; CUNHA, M. P.; ESPOSITO, F.; LOPES, R.; OTUTUMI, L. K.; GONÇALVES, D. D.; DROPA, M. MATTÉ, M. H.; MONTE, D. F.; LANDGRAF, M.; FRANCISCO, G. R.; BUENO, M. F.; GRACIA, D. O.; KNÖBL, T.; MORENO, A. M.; LINCOPAN, N. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contributed to the global spread of the *mcr-1* gene. **Eurosurveillance - Rapid Communications**. 2016^b.

FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Agência FAPESP. Encontrada no Brasil bactéria resistente a um dos mais poderosos antibióticos (12 de Agosto de 2016). Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/encontrada-no-brasil-bacteria-resistente-a-um-dos-mais-poderosos-antibioticos/23749/>. Acesso em 20 de Setembro de 2016.

GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; AZEVEDO, P. A. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 501-506, 2009.

GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY NEWS. The top 15 best-selling drugs of 2016. Disponível em: <http://www.genengnews.com/the-lists/the-top-15-best-selling-drugs-of-2016/77900868>. Acesso em: 05 de Setembro de 2017.

GENTRY, E. J. **Chapter 33. Antibiotics and Antimicrobial Agents**. In: LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; ROCHE, V. F.; ZITO, S. W. Foye's principles of medicinal chemistry. 7. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2013. p. 1073-1124.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. Prediction of hydrophobic (lipophilic) properties of small organic molecules using fragmental methods: an analysis of ALOGP and CLOGP methods. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 102, n. 21, p. 3762-3772, 1998.

GOULD, I. M. Antibiotic resistance: the perfect storm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 53, p. 52-55, 2009.

GUIA DA FARMÁCIA. Medicamentos genéricos no Brasil. 8 de Agosto de 2016. Disponível em: <http://guiadafarmacia.com.br/285-agosto-2016-proporcoes-pandemicas/10945-mercado-de-genericos-no-brasil>. Acesso em: 10 de Setembro de 2017.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HANSCH, C.; LEO, A. **Exploring QSAR. Fundamentals and applications in chemistry and biology**. United States of America: American Chemical Society, v. 1, 1995. p. 557.

HANSCH, C.; LEO, A.; HOEKMAN, D. **Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic and Steric Constants**. United States of America: American Chemical Society, v. 2, 1995. p. 348.

HOLMES, A. H.; MOORE, L. S. P.; SUNDSFJORD, A.; STEINBAKK, M.; REGMI, S.; KARKEY, A.; GUERIN, P.; PIDDOCK, L. J. V. Understanding the mechanism and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, p. 176-187, 2016.

IGEAHUB. Top 10 pharmaceutical companies 2016. Disponível em: <https://igeahub.com/2017/03/14/top-10-pharmaceutical-companies-2017/>. Acesso em: 05 de Setembro de 2017.

INTERNATIONAL TRADE ADMINISTRATION. Department of Commerce. United States of America. Top Markets Reports Pharmaceuticals, 2016. Disponível em: http://trade.gov/topmarkets/pdf/Pharmaceuticals_Executive_Summary.pdf. Acesso em: 05 de Setembro de 2017.

ISHII, M.; JORGE, S. D.; OLIVEIRA, A. A.; PALACE-BERL, F.; SONEHARA, I. Y.; PASQUALOTO, K. F. M.; TAVARES, L. C. Synthesis, molecular modeling and preliminary biological evaluation of a set of 3-acetyl-2,5-disubstituted-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazole as potential antibacterial, anti-*Trypanosoma cruzi* and antifungal agentes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 6292-6301, 2011.

ISTO É DINHEIRO. O bilionário dos genéricos. REVISTA ISTO É. 18 de Fevereiro de 2011. Disponível em: <http://www.istoedinheiro.com.br/noticias/negocios/20110218/bilionario-dos-genericos/59290>. Acesso em: 10 de Setembro de 2017.

IWG-SCC. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements. Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 4961-4967, 2009.

IZAIAS, É. M.; DELLAROZA, M. S. G.; ROSSANEIS, M. A.; BELEI, R. A. Custo e caracterização de infecção hospitalar em idosos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 8, p. 3395-3402, 2014.

JB ECONOMIA. Vendas de genéricos crescem 11,75% em 2015 e registram pior resultado nos últimos 3 anos. JORNAL DO BRASIL ECONOMIA. 14 de Setembro de 2017. Disponível em: <http://www.jb.com.br/economia/noticias/2016/02/07/vendas-de-genericos-crescem-1175-em-2015-e-registram-pior-resultado-nos-ultimos-3-anos/>. Acesso em: 10 de Setembro de 2017.

JORGE, S. D.; ISHII, M.; PALACE-BERL, F.; FERREIRA, A. K.; JÚNIOR, P. L. S.; OLIVEIRA, A. A.; SONEHARA, I. Y.; PASQUALOTO, K. F. M.; TAVARES, L. C. Preliminary in vitro evaluation of *N'*-(benzofuroxan-5-yl)methylenebenzohydrazide derivatives as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agentes. **Medicinal Chemical Communications**, v. 3, n. 7, p. 824-828, 2012.

JORGE, S. D.; MASUNARI, A.; RANGEL-YAGUI, C. O.; PASQUALOTO K. F.; TAVARES, L. C. Design synthesis and molecular modeling studies of novel benzofuroxan derivatives against *Staphylococcus aureus*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 3028-3036, 2009.

JORGE, S. D.; PALACE-BERL, F.; MASUNARI, A.; CECHINEL, C. A.; ISHII, M.; PASQUALOTO, K. F. M.; TAVARES, L. C. Novel benzofuroxan derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains: design using Topliss' decision tree, synthesis and biological assay. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 5031-5038, 2011.

JORGE, S. D.; PALACE-BERL, F.; MESQUITA PASQUALOTO, K. F.; ISHII, M.; FERREIRA, A. K.; BERRA, C. M.; BOSCH, R. V.; MARIA, D. A.; TAVARES, L. C. Ligand-based design, synthesis, and experimental evaluation of novel benzofuroxan derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 200-214, 2013.

KATZUNG, B. G. **Capítulo 5: Desenvolvimento e regulação de fármacos**. Em: KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. *Farmacologia Básica e Clínica*. 12. Ed. Porto Alegre: ARTMED, 2014. 1228 p.

KLOPMAN, G.; LI, J.-Y.; WANG, S.; DIMAYUGA, M. Computer automated log P calculations based on extended group contribution approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 34, n. 4, p. 752-781, 1994.

KONEMAN, E.; WINN, W. J.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Koneman. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. Ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2008. 1565 p.

LARANJEIRA, V. S.; MARCHETTI, D. P.; STEYER, J. R.; CORÇÃO, G.; e PICOLE, S. U. Pesquisa de *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de metalo- β -lactamase em hospital de emergência de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 462-464, 2010.

LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A. K.; WERTHEIM, H. F.; SUMPRADIT, N.; VLIEGHE, E.; HARA, G. L.; GLOUD, I. M.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.; SO, A. D.; BIGDELI, M.; TOMSON, G.; WOONHOUSE, W.; OMBAKA, E.; PERALTA, A. Q.; QAMAR, F. N.; MIR, F.; KARIUKI, S.; BHUTTA, Z. A.; COATES, A.; BERGSTROM, R.; WRIGHT, G. D.; BROWN, E. D.; CARs, O. Antibiotic resistance the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.

LAXMINARAYAN, R.; CHAUDHURY, R. R. Antibiotic Resistance in India: Drivers and Opportunities for Action. **PLoS Medicine**, v. 13, n. 3, p. 1-7, 2016.

LEITÃO, A.; MONTANARI, M. L. C.; MONTANARI, C. A. Capítulo 3: Desenvolvimento de fármacos. Em: MONTANARI, C. A. **Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos**. 1. Ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2011. 732 p.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Foye's principles of medicinal chemistry**, 6. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 1377p.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 7. Ed. Porto Alegre: ARTMED, 2007. 632 p.

LIMA, A. L. L. M.; OLIVEIRA, P. R. D.; PAULA, A. P.; and ZUMIOTTI, A. V. Influence of ertapenem administration on the incidence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, Salvador, v. 12, n. 2, p. 105-106, 2008.

LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 235-249, 2000.

LIPINSKI, C. A. Lead and drug-like compounds: the rule-of-life revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337-341, 2004.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

LIU, Y. Y.; WANG, Y. WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L. F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J. H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human being in China: a microbiological and molecular biology study. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

LUTZ, L.; BARTH, A. L. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates to vancomycin at a university hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 244-246, 2006.

MACDOUGALL, C.; CHAMBERS, H. F. **Capítulo 55. Inibidores da síntese de proteínas e agentes antimicrobianos diversos**. Em: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman. 12. Ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. p. 1521-1547.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structures**. 4. Ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. 1512p.

MARLUCHE, M. E.; SANTOS, J. I. *Candida* sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 1, p. 65-67, 2008.

MARQUES, L. E. C.; OLIVEIRA, D. F.; MARQUES, M. M. M.; SILVA, A. R. A.; ALVES, C. R.; GUEDES, M. I. F. Resistance of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates: linkage of outer membrane proteins (OMPS) with production ESBLs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 467-468, 2011.

MARSTONS, H. D.; DIXON, D. M.; KNISELY, J. M.; PALMORE, T. N.; FAUCI, A. S. Antimicrobial Resistance. **The JAMA Network**, v. 316, n. 11, p. 1193-1204, 2016.

MASUNARI, A.; REZENDE, P.; TAVARES, L. C. Multi-resistência em cepas de *Staphylococcus aureus*: aspectos epidemiológicos e desenvolvimento de novos fármacos. **Anais de Farmácia e Química**, v. 35, n. 1, p. 29-36, 2002.

MASUNARI, A.; TAVARES, L. C. A new class of nifuroxazide analogues: synthesis of 5-nitrothiophene derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 12, p. 4229-4236, 2007.

MCCULLOCH, J. A.; SILVEIRA, A. C. O.; MORAES, A. C. L.; PÉREZ-CHAPARRO, P. J.; SILVA, M. F.; ALMEIDA, L. M.; D'AZEVEDO, P. A.; MAMIZUKA, E. M. Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus* FCFHV36, a methicillin-resistant heterogeneously resistance to vancomycin. **Genome**, v. 3, n. 4, 1-2, 2015.

MENDONÇA, E. C. L.; MARQUES, V. F.; MELO, D. A.; ALENCAR, T. A.; COELHO, I. S.; COELHO, S. M. O.; SOUZA, M. M. S. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 859-864, 2012.

MOELLERING JR, R. C. Discovering new antimicrobial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 1, p. 2-9, 2011.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. 11. Ed. Lisboa: Fundação Caloust Gulbenkian, 1994, 1360 p.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 874 p.

MURTAZA, G.; MUMTAZ, A.; KHAN, F. A.; AHMAD, A.; AZHAR, S.; NAJAM-UL-HAQ, M.; ATIF, M.; KHAN, S. A.; MAALIK, A.; ALAM, F.; HUSSAIN, I. Recent pharmacological advancements in Schiff bases: a review. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, v. 71, n. 4, p. 531-535, 2014.

NARANG, R.; NARASIMHAN, B.; SHARMA, S. A review on biological activities and chemical synthesis of hydrazide derivatives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 569-612, 2012.

O'NEIL, M. J. (Ed.) *et al.* **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**, 14th Ed. New Jersey: Merck & Co, 2006, 2108 p.

O'NEILL, J. **Antimicrobial Resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations**. The review on antimicrobial resistance chaired by Jim O'Neill, 2014.

OLIVEIRA, C. B. S.; DANTAS, V. C. R.; NETO, R. M.; AZEVEDO, P. R. M.; MELO, M. C. N. Frequência e perfil de resistência de *Klebsiella* spp. em um hospital universitário de Natal/RN durante 10 anos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n.6, p. 589-594, 2011.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Infecções relacionadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 48, n. 6, p. 995-1001, 2014.

PALAE-BERL, F.; JORGE, S. D.; PASQUALOTO, K. F.; FERREIRA, A. K.; MARIA, D. A.; ZORZI, R. R.; SÁ BORTOLOZZO, L.; LINDOSO, J. Â.; TAVARES, L. C. 5-nitro-2-furfuriliden derivatives as potencial anti-*Trypanosoma cruzi* agentes: design, synthesis, bioactivity evaluation, cytotoxicity and exploratory data analysis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 17, p. 5395-5406, 2013.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. 4th. Ed. New York: Oxford University Press Inc. 2009. 752 p.

PAULA, F. R.; JORGE, S. D.; ALMEIDA, L. V.; PASQUALOTO, K. F.; TAVARES, L. C. Molecular modeling studies and in vitro bioactivity evaluation of a set of novel 5-nitro-heterocyclic derivatives as anti-*T. cruzi* agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n.7, p. 2673-2679, 2009.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013-1020, 2009.

PETRI JUNIOR, W. A. **Capítulo 44. Penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos betalactâmicos**. Em: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman. 11. Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 1013-1038.

PETRI JUNIOR, W. A. **Capítulo 53. Penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos β -lactâmicos**. Em: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman. 12. Ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. p. 1477-1503.

PHARMA COMPASS. Top drugs by sale in 2016: Who sold the blockbuster drugs? Disponível em: <https://www.pharmacompass.com/radio-compass-blog/top-drugs-by-sales-in-2016-who-sold-the-blockbuster-drugs>. Acesso em: 05 de Setembro de 2017.

PhRMA. RESEARCH. PROGRESS. HOPE. Biopharmaceutical Research Industry Profile, 2016.

PLETZ, M. W.; BURKHARDT, O.; WELTE, T. Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Pneumonia: linezolid or vancomycin? – Comparison of pharmacology and clinical efficacy. **European Journal of Medical Research**, v. 15, n. 12, p. 507-513, 2010.

PORTO, J. P.; MANTESE, O. C.; ARANTES, A.; FREITAS, C.; GONTIJO FILHO, P. P.; RIBAS, R. M. Nosocomial infections in a pediatric intensive care unit of a developing country: NHSN surveillance. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 475-479, 2012.

PROJAN, S. J. Why is big pharma getting out of antibacterial drug discovery? **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 427-430, 2003.

QIN, W.; LONG, S.; PANUNZIO, M.; BIONDI, S. Schiif bases: A short survey on an evergreen chemistry tool. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 12264-12289, 2013.

RANDO, D. G.; SATO, D. N.; SIQUEIRA, L.; MALVEZZI, A.; LEITE, C. Q. F.; AMARAL, A. T.; FERREIRA, E. I.; TAVARES, L. C. Potencial tuberculostatic agentes. Topliss application on benzoic acid [(5-nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide series. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 557-560, 2002.

REID, R. E.; SINDELAR, R. D. Chapter 6: Pharmaceutical Biotechnology – From Nucleic Acids to Personalized Medicine. Em: **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 6th. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 1377 p.

ROSSOLINI, G. M.; ARENA, F.; PECILE, P.; POLLINI, F. Update on the antibiotic crisis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 18, p. 56-60, 2014.

SACRAMENTO, A. G.; CERDEIRA, L. T.; ALMEIDA, L. M.; ZANELLA, R. C.; PIRES, C.; SATO, M. I. Z.; COSTA, E. A. S.; ROBERTO, N. P.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Environmental dissemination of vanA-containing *Enterococcus faecium* strains belonging to hospital-associated clonal lineages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, p. 264-282, 2016.

SANTOS, A. M. R.; CABRAL, L. A. F.; BRITO, D. S.; MADEIRA, M. Z. A.; COSTA e SILVA, M. E. D.; CARVALHO e MARTINS, M. C. As representações sociais da infecção hospitalar elaboradas por profissionais de enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 4, p. 441-446, 2008.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M.; TERENCEZI, H. Estratégias usadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SILVER, L. L. Challenges of antimicrobial discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 71-109, 2011.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Organic Chemistry**. 8th. Ed. New York: John Wiley & Sons, 2004. 1344p.

SONI, I.; CHAKRAPANI, H.; CHOPRA, S. Draft genome sequence of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. **Genome Announcements**, v.3, n. 5, p. 1, 2015.

SOUSA, C. M. M.; ALVES, M. S. C. F.; MOURA, M. E. B.; SILVA, A. O. Os direitos dos usuários da saúde em casos de infecção hospitalar. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 4, 2008.

SPRATT, B. G. Resistance to antibiotics mediated by target alterations, **Science**, v. 264, n. 5157, p. 388-389, 1994.

SWEETMAN, S. C. (Ed.) *et al.* **Martindale: the complete drug reference**. 37. Ed. London: Pharmaceutical Press, 2011.

TAKAGI, E. H.; LINCOPAN, N.; CASSETTARI, V. C.; PASSADORE, L. F.; MAMIZUKA, E. M.; MARTINEZ, E. M. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak at university hospital. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 339-341, 2009.

TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

TAVARES, L. C.; CHISTÉ, J. J.; SANTOS, M. G. B.; PENNA, T. C. V. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v. 138, pt. 2, p. 432-436, 1998.

TAVARES, L. C.; PENNA, T. C. V.; AMARAL, A. T. Synthesis and biological activity of nifuroxazide analogs. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v. 136, pt. 1, p. 244-249, 1996.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, sup. 1, p. s3-s10, 2006.

THOMAS, G. **Química medicinal: uma introdução**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, 413 p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. Ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

TREVISOL, F. S.; SCHIMITT, G. J.; ARAÚJO, J. M.; SOUZA, L. B.; NAZÁRIO, J. G.; JANUÁRIO, R. L.; MELLO, R. S.; TREVISOL, D. J. New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing *Acinetobacter* spp. infection: report of a survivor. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 130-134, 2016.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

VEJA ECONOMIA. Merck faz aliança com Cristália e Eurofarma no Brasil. REVISTA VEJA. 15 de Fevereiro de 2012. Disponível em: <http://veja.abril.com.br/economia/merck-faz-alianca-com-cristalia-e-eurofarma-no-brasil/>. Acesso em: 10 de Setembro de 2017.

VEJA ECONOMIA. Pfizer fecha compra da Teuto. REVISTA VEJA. 20 de Outubro de 2010. Disponível em: <http://veja.abril.com.br/economia/pfizer-fecha-compra-da-teuto/>. Acesso em: 10 de Setembro de 2017.

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

VILLAS BÔAS, P. J. F.; RUIZ, T. Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados em hospital universitário. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 3, p. 372-378, 2004.

VIODÉ, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; CHAUVIÈRE, G.; BAKALARA, N.; PÉRIÉ, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 5, p. 549-557, 1999.

VISWANADHAN, V. N.; GHOSE, A. K.; REVANKAR, G. R.; ROBINS, R. K. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 29, n. 3, p. 163-172, 1989.

WATKINS, R. R.; LEMONOVICH, T. L.; FILE, T. M. J. An evidence-based review of linezolid for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): place in therapy. **Core Evidence**, v. 7, p. 131-143, 2012.

WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**, 3rd. Ed. Boston: Elsevier, 2008, 942 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: global report on surveillance, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>>. Acesso em: 2 de Setembro de 2014.

WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 589-594, 2010^b.

WRIGHT, G. D. Question & Answer: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? **BioMed Central Biology**, v. 8, n. 123, 1-6, 2010^a.

WRIGHT, G. D.; SUTHERLAND, A. D. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 6, p. 260-267, 2007.

ZORZI, R. R.; JORGE, S. D.; PALACE-BERL, F.; PASQUALOTO, K. F. M.; BORTOLOZZO, L. S.; SIQUEIRA, A. M. C.; TAVARES, L. C. Exploring 5-nitrofurán derivatives against nosocomial pathogens: synthesis, antimicrobial activity and chemometric analysis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 2844-2854, 2014.

ANEXO 1**Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN ^1H e ^{13}C)****dos compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos**

Parâmetros: RMN ^1H – 300 MHz / RMN ^{13}C – 75 MHz

Solvente: **DMSO- d_6** / Referência interna: **TMS**

Composto 1: *N'*-((5-nitrofurano-2il-)metileno)acetohidrazida

Sólido amarelo claro (78%); ff 251.0 – 252.0 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11.73/11.62 (s, 1H, H8), 8.13/7.92 (s, 1H, H6), 7.75 (d, 1H, $J_{(4,3)} = 3.9$ Hz, H4), 7.20 (d, 1H, $J_{(3,4)} = 3.7$ Hz, H3), 2.20 (s, 3H, H10); ^{13}C NMR {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 172.27/166.16 (C9), 151.87 (C2), 151.61 (C5), 133.57/130.63 (C6), 114.80/114.62 (C4), 114.53/114.25 (C3), 21.65/19.97 (C10); Anal. Elem. Calc.: (C₇H₇N₃O₄): C, 42.65%; H, 3.58%; N, 21.46%. Exp.: C, 42.77%; H, 3.56%; N, 21.57%.

Composto 2: *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)hexanohidrazida

Sólido amarelo claro (93%); ff 152.0 –154.0 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11.69/11.58 (s, 1H, H8), 8.15/7.92 (s, 1H, H6), 7.76/7.75 (d, 1H, $J_{(4,3)} = 3.9$ Hz, H4), 7.19/7.18 (d, 1H, $J_{(3,4)} = 4.18$ Hz, H3), 2.60/2.24 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, H10), 1.58 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, H11), 1.30 (s, 2H, H12, H13), 0.87 (t, 3H, $J = 6.6$ Hz, H14); ^{13}C NMR {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 174.70/169.22 (C9), 151.80 (C2), 151.61 (C5), 133.67/130.50 (C6), 114.76/114.67 (C4), 114.58/114.20 (C3), 34.19/31.47 (C10), 30.85 (C11), 24.44/23.62 (C12), 21.81 (C13), 13.75 (C14); Anal. Elem. Calc.: ($\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$): C, 64.84%; H, 8.16%; N, 12.60%. Exp.: C, 64.61%; H, 8.56%; N, 12.84%.

Composto 3: *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)octanohidrazida

Sólido amarelo (75%); ff 140.0 – 141.0 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 11.69/11.58 (s, 1H, H8), 8.15/7.92 (s, 1H, H6), 7.76/7.75 (d, 1H, *J*_(4,3) = 3.9 Hz, H4), 7.19/7.16 (d, 1H, *J*_(3,4) = 4.0 Hz, H3), 2.60/2.24 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, H10), 1.57 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz, H11), 1.27/1.26 (d, 8H, *J* = 3.7 Hz, H12/H13/H14/H15), 0.86/0.83 (d, 3H, H16); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 174.68/169.21 (C9), 151.83 (C2), 151.58 (C5), 133.65/130.45 (C6), 114.70 (C4), 114.12 (C3), 34.21 (C10), 31.50/31.11 (C11), 28.41 (C12), 24.76 (C13), 23.97 (C14), 21.99 (C15), 13.82 (C16); Anal. Elem. Calc.: (C₁₄H₂₁N₃O₄): C, 56.94%; H, 7.17%; N, 14.23%. Exp.: C, 56.90%; H, 6.77%; N, 14.57%.

Composto 4: *N'*-etil-2-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carboxilato-hidrazina

Sólido amarelo (87%); ff 183-185 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 11.53 (s, 1H, H8), 7.97 (s, 1H, H6), 7.75/7.74 (d, 1H, H4), 7.15/7.14 (d, 1H, H3), 4.20/4.18 (d, 2H, H11), 1.26 (s, 3H, H12); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 153.06 (C9), 151.83 (C2), 151, 62 (C5), 131.82 (C6), 114.61 (C4), 114.28 (C3), 61.03 (C11), 14.37 (C12); Anal. Elem. Calc.: (C₈H₉N₃O₅): C, 42.32%; H, 3.99%; N, 18.50%; Exp.: C, 42.30%; H, 3.79%; N, 18.27%.

Composto 5: *N'*-4-etoxi-*N*'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida

Sólido amarelo (97%); ff 228 – 230 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12.08 (s, 1H, H8), 8.39 (s, 1H, H6), 7.91/7.89 (d, 2H, H15/H11), 7.79/7.78 (d, 1H, H4), 7.25/7.23 (d, 1H, H3), 7.07/7.04 (d, 2H, H14/H12), 4.15/4.09 (dd, 2H, H17), 1.38/1.33 (t, 3H, H18); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 161.63 (C9), 151.97 (C2), 151.82 (C5), 134.84/134.70 (C6), 129.85 (C15/C11), 124.60 (C10), 114.88/114.20 (C14/C12 – C4/C3), 63.46 (C17), 14.46 (C18); Anal. Elem. Calc.: (C₁₄H₁₃N₃O₅): C, 55.45%; H, 4.32%; N, 13.86%; Exp.: C, 55.14%; H, 4.18%; N, 13.64%.

Composto 6: *tert*-butil-2-((5nitrofurano-2-il)metileno)carboxilatohidrazina

Sólido amarelo (65%); ff 177.0 – 178.0 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 11.39 (s, 1H, H8), 7.96 (s, 1H, H6), 7.75/7.74 (d, 1H, *J*_(4,3) = 3.9 Hz, H4), 7.12/7.10 (d, 1H, *J*_(3,4) = 3.9 Hz, H3), 1.48 (s, 9H, H12, H13, H14); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 167.44 (C9), 152.15 (C2), 151.86 (C5), 131.16 (C6), 114.67 (C4), 113.74 (C3); 80.32 (C10), 27.90 (C12, C13, C14); Anal. Elem. Calc.: (C₁₀H₁₃N₃O₄): C, 50.21%; H, 5.48%; N, 17.56%. Exp.: C, 50.76%; H, 5.52%; N, 17.90%.

Composto 7: 2-ciano-*N*'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida

Composto 8: 2-furano-*N'*-(5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida

Sólido amarelo (92%); ff 249 – 250 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12.23 (s, 1H, H8), 8.39 (s, 1H, H6), 7.99 (s, 1H, H12), 7.79/7.78 (d, 1H, H4), 7.38 (s, 1H, H14), 7.27/7.26 (d, 1H, H3), 6.75/6.73 (m, 1H, H13); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 154.21 (C9), 151.85 (C2), 151.68 (C5), 146.32 (C10), 146.03 (C12), 135.50 (C6), 116.00 (C14), 115.12 (C4), 114.57 (C3), 112.24 (C13); Anal. Elem. Calc.: (C₁₀H₇N₃O₅): C, 48.20%; H, 2.83%; N, 16.86%. Exp.: C, 48.25%; H, 2.83%; N, 16.62%.

Composto 9: 2-tiofeno-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida

Sólido amarelo claro (92%); ff 114 – 115°C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12.02 (s, 1H, H8), 8.27 (s, 1H, H6), 8.00/7.99 (d, 1H, *J* = 2.8, H14), 7.91/7.89 (m, 1H, *J* = 4.8, H12), 7.23/7.20 (m, 2H, H13/H3); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 158.62 (C9), 152.30 (C2), 151.17 (C5), 135.82 (C10), 135.71 (C6), 133.33 (C14), 128.62 (C12), 128.34 (C13), 115.20 (C4), 115.09 (C3); Anal. Elem. Calc.: (C₁₀H₇N₃O₄S): C, 45.28%; H, 2.66%; N, 15.84%. Exp.: C, 45.16%; H, 2.74%; N, 15.72%.

Composto 10: 4-metil-*N*'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-1,2,3-tiadiazol-5-carbohidrazida

Sólido amarelo (98%); ff 245 – 248°C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12.74 (s, 1H, H8), 8.09 (s, 1H, H6), 7.81/7.79 (d, 1H, *J*_(4/3) = 3.8, H4), 7.37/7.35 (d, 1H, *J*_(3/4) = 3.8, H3); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 163.46 (C9), 160.50 (C2), 152.01 (C5), 150.62 (C10), 135.02 (C14), 132.29 (C6), 116.35 (C4), 114.44 (C3), 14.99 (C15); Anal. Elem. Calc.: (C₉H₇N₅O₄S): C, 38.43%; H, 2.51%; N, 24.90%. Exp.: C, 38.63%; H, 2.80%; N, 24.55%.

Composto 11: *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)ciclopentanocarbohidrazida

Sólido amarelo claro (70%); ff 206.0 – 207.0 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 11.70/11.56 (s, 1H, H8), 8.18/7.93 (s, 1H, H6), 7.76/7.75 (d, 1H, *J*_(4,3) = 3.8 Hz, H4), 7.19/7.18 (d, 1H, *J*_(3,4) = 3.8 Hz, H3), 3.45/2.68 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz H10), 1.88-1.59 (m, 8H, H11-14); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 177.55/172.44 (C9), 152.0 (C2), 151.94 (C5), 133.73/130.46 (C6), 114.64 (C4), 114.01 (C3), 43.21 (C10), 29.85 (C11), 29.29 (C14), 25.72 (C12), 25.63 (C13); Anal. Elem. Calc.: (C₁₁H₁₃N₃O₄): C, 52.29%; H, 5.22%; N, 16.73%. Exp.: C, 52.34%; H, 5.04%; N, 16.78%.

Composto 12: *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)ciclohexanocarbohidrazida

Sólido amarelo (67%); ff 202.0 – 203.0 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 11.66/11.498 (s, 1H, H8), 8.18/7.93 (s, 1H, H6), 7.76/7.75 (d, 1H, *J*_(4,3) = 3.9 Hz, H4), 7.19/7.18 (d, 1H, *J*_(3,4) = 3.7 Hz, H3), 3.09/2.20 (s, 1H/t, 1H *J* = 11.1 Hz, H10), 1.75-1.24 (m, H_{ax}, 5H, H_{eq}, 5H, H11, H12, H13, H14, H15); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 177.23/172.15 (C9), 152.0 (C2), 151.78 (C5), 133.81/130.45 (C6), 114.61 (C4), 114.01 (C3), 42.96 (C10), 28.82 (C11), 28.29 (C15), 25.49 (C12), 25.26 (C13), 25.07 (C14); Anal. Elem. Calc.: (C₁₂H₁₅N₃O₄): C, 54.33%; H, 5.70%; N, 15.84%. Exp.: C, 54.52%; H, 5.67%; N, 15.96%.

Composto 13: *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida

Sólido amarelo (91%); ff 211.0 – 212.0 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12.22 (s, 1H, H8), 8.42 (s, 1H, H6), 7.93/7.91 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz, H11, H15), 7.79/7.78 (d, 1H, *J*_(4,3) = 3.9 Hz, H4), 7.61/7.55 (m, 3H, H12, H13, H14), 7.27/7.26 (d, 1H, *J*_(3,4) = 3.6 Hz, H3); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 163.42 (C9), 151.78 (C2), 150.11 (C5), 135.45 (C6), 132.75 (C10), 132.07 (C13), 128.48 (C12, C14), 127.73 (C11, C15), 115.07 (C4), 114.54 (C3); Anal. Elem. Calc.: (C₁₂H₉N₃O₄): C, 55.60%; H, 3.50%; N, 16.21%. Exp.: C, 55.33%; H, 3.60%; N, 16.08%.

Composto 14: 2-fenil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida

Sólido amarelo (91%); mp 195.0 – 196.0 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 11.97/11.77 (s, 1H, H8), 8.21/7.78 (s, 1H, H6), 7.78/7.76 (d, 1H, *J*_{4,3} = 3.9 Hz, H4), 7.32/7.21 (m, 6H, H3, H11, H12, H13, H14, H15), 3.23/3.21 (s, 2H, H16); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 172.63/167.14 (C9), 151.76 (C2, C5), 135.14 (C6), 130.88 (C11), 129.53 (C16), 129.05 (C12), 128.33 (C14), 128.17 (C14), 126.66/126.44 (C15/C13), 115.05/114.67 (C4), 114.52/114.24 (C3), 41.15 (C10); Anal. Elem. Calc.: (C₁₂H₉N₃O₄): C, 57.14%; H, 4.06%; N, 15.38%. Exp.: C, 57.52%; H, 4.07%; N, 15.51%.

Composto 15: *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzenosulfonilhidrazida

Sólido amarelo (85%); ff 163 – 164 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12.21 (s, 1H, H8), 7.90/7.87 (m, 3H, H6, H15/H11), 7.72/7.61 (m, 4H, H13, H14/H12, H3); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 174.17 (C9), 151.79 (C2), 150.67 (C5), 138.80 (C10), 134.82/133.31 (C13, C14/C12), 129.48 (C15), 127.03 (C11), 115.25 (C4), 114.31 (C3); Anal. Elem. Calc.: (C₁₁H₉N₃O₅S): C, 44.31%; H, 3.41%; N, 12.92%. Exp.: C, 44.66%; H, 3.21%; N, 12.50%.

Composto 16: 4-bifenil-*N*'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida

Sólido amarelo (92%); ff 239.0 – 240.0 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12.08 (s, 1H, H8), 8.47 (s, 1H, H6), 8.03/8.01 (d, 2H, *J*=8.4 Hz, H11, H15), 7.83/7.80 (d, 2H, *J*=8.3 Hz, H12, H14), 7.75/7.71 (m, 3H, H4, H17, H21), 7.53-7.39 (m, 3H, H18, H19, H20), 7.21 (d, 1H, *J*_(3,4)=3.9 Hz, H3); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 170.5 (C9), 151.9 (C2), 151.8 (C5), 143.2 (C13), 138.9 (C16), 135.5 (C6), 131.5 (C10), 129.0 (C11, C15), 128.5 (C18, C20), 128.2 (C12, C14), 126.9 (C17, C21), 126.7 (C19), 115.2 (C4), 114.6 (C3); Anal. Elem. Calc.: (C₁₈H₁₃N₃O₄): C, 64.47%; H, 3.91%; N, 12.53%. Exp.: C, 64.24%; H, 3.88%; N, 12.60%.

Composto 17:2-fenoxi-*N*'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida

Composto 18: 4-pentilciclohexano-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida

Composto 19: 4-pentil-*N*'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida

Composto 20: 4-eptil-*N*'-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida

Sólido amarelo (95%); ff 178 – 179 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ(ppm): 12.15 (s, 1H, H8), 8.41 (s, 1H, H6), 7.85/7.83 (d, 2H, H11, H15), 7.79/7.78 (d, 1H, H4), 7.37/7.34 (d, 2H, H12, H14), 7.26 (s, 1H, H3), 2.67, 2.62 (t, 2H, H16), 1.59 (s, 2H, H17), 1.27 (s, 8H, H18, H19, H20, H21), 0.85 (s, 3H, H22); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 163.33 (C9), 151.87 (C2), 151.83 (C5), 147.03 (C13), 135.17 (C6), 130.17 (C10), 128.46 (C12, C14), 127.97 (C11), 127.82 (C15), 114.99 (C4), 114.60 (C3), 33.99 (C16), 31.19 (C17), 30.61 (C20), 28.54 (C18), 28.45 (C19), 22.02 (C21), 13.85 (C22); Anal. Elem. Calc.: (C₁₉H₂₃N₃O₄): C, 63.85%; H, 6.49%; N, 11.76%. Exp.: C, 63.58%; H, 6.39%; N, 11.38%.

Composto 21: 4-epoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida

Sólido amarelo (95%); ff 172 – 173 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ(ppm): 12.08 (s, 1H, H8), 8.40 (s, 1H, H6), 7.92/7.89 (d, 2H, H11, H15), 7.79/7.78 (d, 1H, H4), 7.25/7.23 (d, 1H, H3), 7.07/7.04 (d, 2H, H12, H14), 4.07/4.02 (t, 2H, H17), 1.77/1.68 (m, 2H, H18), 1.42/1.28 (m, 8H, H19, H20, H21, H22), 0.89/0.84 (t, 3H, H23); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 161.80 (C9), 151.99 (C2), 151.80 (C5), 129.85 (C11), 129.82 (C15), 124.55 (C10), 114.84 (C12), 114.65 (C14), 114.21 (C4), 67.80 (C17), 31.20 (C21), 28.54 (C18), 28.39 (C20), 25.39 (C19), 22.01 (C22), 13.88 (C23); Anal. Elem. Calc.: (C₁₉H₂₃N₃O₅): C, 61.11%; H, 6.21%; N, 11.25%. Exp.: C, 60.99%; H, 5.96%; N, 10.87%.

Composto 22: *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida

Sólido amarelo (93%); ff 249 – 250 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ(ppm): 12.20 (s, 1H, H8), 8.54/8.49 (d, 2H, H6, H19), 8.08/7.98 (m, 4H, H11, H12, H14, H17), 7.72/7.21 (d, 1H, H3); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 1.63.48 (C9), 151.89 (C2), 151.79 (C5), 135.50 (C18), 135.33 (C6), 134.47 (C10), 131.99 (C13), 130.09 (C17), 128.94 (C19), 128.21 (C15), 128.09 (C14), 127.68 (C16), 126.96 (C11), 115.17 (C4/C3); Anal. Elem. Calc.: (C₁₆H₁₁N₃O₄): C, 62.14%; H, 3.58%; N, 13.59%. Exp.: C, 62.47%; H, 3.70%; N, 13.49%.

Composto 23: 6-hidroxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida

Sólido amarelo (84%); ff 268 – 269 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ(ppm): 12.29 (s, 1H, H8), 10.15 (s, 1H, H6), 7.27 (s, 1H, OH), 8.45/7.20 (m, 8H, H3/H4, H11/H12/H14, H16/H17/H19); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 163.67 (C9), 162.28 (C15), 157.36 (C2), 151.94 (C5), 114.93 (C4), 114.63 (C3), 136.51/119.66 (C11, C12, C13, C116, C17, C18, C19); Anal. Elem. Calc.: (C₁₆H₁₁N₃O₅): C, 59.08%; H, 3.41%; N, 24.59%. Exp.: C, 52.91%; H, 4.41%; N, 11.56%.

Composto 24: 6-amino-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida

Sólido marrom (75%); ff 250 – 251 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12.21 (s, 1H, H8), 8.44/8.32 (d, 2H, H11, H19), 7.78/7.74 (d, 3H, H12, H14, H17), 7.61/7.59 (d, 1H, H4), 7.31, (s, 1H, H16), 7.06/7.03 (d, 1H, H3), 6.88 (s, 1H, H6), 5.80 (s, 2H, NH₂); ^{13}C NMR {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 163.88 (C9), 152.11/152.08 (C2, C5), 149.01 (C15), 137.07 (C6), 134.48 (C13), 130.12 (C17), 128.64 (C10), 125.03/124.66 (C11, C12, C18, C19), 119.14 (C16), 114.73 (C4, C3), 105.26 (C14); Anal. Elem. Calc.: (C₁₆H₁₂N₄O₄): C, 59.26%; H, 3.37%; N, 17.28%. Exp.: C, 52.56%; H, 4.11%; N, 16.40%.

Composto 25: 6-metoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida

Composto 26: 6-fluór-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida

Nifuroxazida: 4-hidroxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida

ANEXO 2**Espectros de Correlação Heteronuclear de Carbono e Hidrogênio-HETCOR**

Espectro de HETCOR do composto **c1**: $N'-((5\text{-nitrofurano-2il-})\text{metileno})\text{acetohidrazida}$
 Nota. Eixo vertical (espectro de ^1H), eixo horizontal (espectro de ^{13}C)

Espectro de HETCOR do composto **c2**: *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)hexanohidrazida
 Nota. Eixo vertical (espectro de ^1H), eixo horizontal (espectro de ^{13}C)

Espectro de HETCOR do composto **c3**: *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)nonanohidrazida
 Nota. Eixo vertical (espectro de ^1H), eixo horizontal (espectro de ^{13}C).

Espectro de HETCOR do composto **c7**: *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida
 Nota. Eixo vertical (espectro de ^1H), eixo horizontal (espectro de ^{13}C).

Espectro de HETCOR do composto **c11**: *N'*-((5-nitrofurano-2-yl)methylene)ciclopentanocarbohidrazida. Nota: Eixo vertical (espectro de ^1H), eixo horizontal (espectro de ^{13}C).

Espectro de HETCOR do composto **c12**: *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)ciclohexanocarbohidrazida. Nota. Eixo vertical (espectro de ^1H), eixo horizontal (espectro de ^{13}C).

Espectro de HETCOR do composto **c16**: 4-bifenil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida
 Nota. Eixo vertical (espectro de ^1H), eixo horizontal (espectro de ^{13}C).

Espectro de HETCOR do composto **c17**: 2-fenoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida
 Nota. Eixo vertical (espectro de ^1H), eixo horizontal (espectro de ^{13}C).

Espectro de HETCOR do composto **c22**: *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida
 Nota. Eixo vertical (espectro de ^1H), eixo horizontal (espectro de ^{13}C).

ANEXO 3**Gráficos de Dispersão dos Parâmetros de Lipinski
Descritores Moleculares x Compostos**

LIPINSKI, 2000, “Regra dos 5”: $\text{ClogP} < 5$, $\text{MM} < 500$, $\text{HBD} < 5$, $\text{HBA} < 10$; GHOSE, VISWANADHAN, WENDOLOSKI, 1999: ClogP entre -0.4 a 5.6, MR de 40 a 130, MM de 180 a 500, n.º de átomos de 20 a 70, $\text{PSA} < 140 \text{ \AA}^2$; VEBER et al., 2002: ligações rotacionáveis < 10 , $\text{PSA} < 140 \text{ \AA}^2$.

ANEXO 4**Gráficos de Dispersão dos Parâmetros de Lipinski
Inibição do Crescimento (IC₉₀) x Descritor Molecular*****Staphylococcus aureus* ATCC 29213**

LIPINSKI, 2000, “Regra dos 5”: ClogP < 5, MM < 500, HBD < 5, HBA < 10; GHOSE, VISWANADHAN, WENDOLOSKI, 1999: ClogP entre -0.4 a 5.6, MR de 40 a 130, MM de 180 a 500, n.º de átomos de 20 a 70, PSA < 140 Å²; VEBER et al., 2002: ligações rotacionáveis < 10, PSA < 140 Å².

ANEXO 5

**Gráficos de Dispersão dos Parâmetros de Lipinski
Inibição do Crescimento (IC₉₀) x Descritor Molecular
Staphylococcus aureus resistente à oxacilina**

LIPINSKI, 2000, “Regra dos 5”: ClogP < 5, MM < 500, HBD < 5, HBA < 10; GHOSE, VISWANADHAN, WENDOLOSKI, 1999: ClogP entre -0.4 a 5.6, MR de 40 a 130, MM de 180 a 500, n.º de átomos de 20 a 70, PSA < 140 Å²; VEBER et al., 2002: ligações rotacionáveis < 10, PSA < 140 Å².

ANEXO 6**Gráficos de Dispersão dos Parâmetros de Lipinski****Inibição do Crescimento (IC₉₀) x Descritor Molecular*****Staphylococcus aureus* cepa heterogênea com resistência intermediária à vancomicina****hVISA–FCFHV36**

LIPINSKI, 2000, “Regra dos 5”: ClogP < 5, MM < 500, HBD < 5, HBA < 10; GHOSE, VISWANADHAN, WENDOLOSKI, 1999: ClogP entre -0.4 a 5.6, MR de 40 a 130, MM de 180 a 500, n.º de átomos de 20 a 70, PSA < 140 Å²; VEBER et al., 2002: ligações rotacionáveis < 10, PSA < 140 Å².

ANEXO 7

**Gráficos de Dispersão dos Parâmetros de Lipinski
Inibição do Crescimento (IC₉₀) x Descritor Molecular
Staphylococcus epidermidis multirresistente**

LIPINSKI, 2000, “Regra dos 5”: $ClogP < 5$, $MM < 500$, $HBD < 5$, $HBA < 10$; GHOSE, VISWANADHAN, WENDOLOSKI, 1999: $ClogP$ entre -0.4 a 5.6, MR de 40 a 130, MM de 180 a 500, n.º de átomos de 20 a 70, $PSA < 140 \text{ \AA}^2$; VEBER et al., 2002: ligações rotacionáveis < 10 , $PSA < 140 \text{ \AA}^2$.

ANEXO 8

Gráficos de Dispersão dos Parâmetros de Lipinski
Inibição do Crescimento (IC₉₀) x Descritor Molecular
Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina fenótipo *vanA

LIPINSKI, 2000, “Regra dos 5””: ClogP < 5, MM < 500, HBD < 5, HBA < 10; GHOSE, VISWANADHAN, WENDOLOSKI, 1999: ClogP entre -0.4 a 5.6, MR de 40 a 130, MM de 180 a 500, n.º de átomos de 20 a 70, PSA < 140 Å²; VEBER et al., 2002: ligações rotacionáveis < 10, PSA < 140 Å².

ANEXO 9**Curvas Dose-Resposta*****Staphylococcus aureus* ATCC 29213**

Composto 1. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida. **Nota.** μM : concentração em micro-molar; **MIC**: concentração inibitória mínima; **DP**: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; **IC₉₀**: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Composto 2. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)hexanohidrazida. **Nota.** μM : concentração em micro-molar; **MIC**: concentração inibitória mínima; **DP**: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; **IC₉₀**: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.34	0.003
8	99.34	0.002
4	98.90	0.003
2	95.61	0.005
1	90.12	0.013
0,5	81.78	0.006
0,25	81.34	0.008

Composto 3. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)nonanohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.55	0.002
8	96.86	0.005
4	87.23	0.005
2	85.21	0.005
1	83.64	0.007
0,5	82.07	0.007
0,25	80.73	0.004

Composto 4. *N'*-2-etil-((5-nitrofuran-2-il)metileno)carboxilato-hidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.78	0.002
8	99.56	0.002
4	99.56	0.007
2	98.90	0.007
1	93.85	0.002
0,5	82.65	0.001
0,25	80.46	0.003

Composto 5. *N'*-4-etoxi-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	89.68	—
8	88.58	—
4	84.85	—
2	81.12	—
1	80.24	—
0,5	79.80	—
0,25	78.92	—

Composto 6. *N'*-2-*tert*-butil-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carboxilatohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo; s. a.: sem atividade na concentração máxima avaliada.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.10	0.008
8	98.43	0.002
4	86.31	0.007
2	83.61	0.009
1	82.26	0.005
0,5	81.82	0.007
0,25	81.37	0.009

Composto 7. *N'*-2-ciano-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.002
8	99.78	0.002
4	98.88	0.005
2	96.64	0.008
1	84.09	0.008
0,5	82.07	0.007
0,25	81.18	0.006

Composto 8. *N'*-2-furano-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.10	0.002
8	97.98	0.003
4	95.51	0.000
2	93.27	0.002
1	85.18	0.001
0,5	84.96	0.000
0,25	83.16	0.002

Composto 9. *N'*-2-tiofeno-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.001
8	99.34	0.000
4	98.24	0.000
2	91.44	0.003
1	83.97	0.002
0,5	82.43	0.004
0,25	81.78	0.005

Composto 10. *N'*-4-metil-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-1,2,3-tiodiazol-carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.88	0.000
8	98.43	0.002
4	96.86	0.002
2	86.08	0.002
1	81.37	0.009
0,5	76.20	0.009
0,25	74.63	0.011

Composto 11. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)ciclopentanocarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.001
8	99.78	0.001
4	99.55	0.002
2	82.30	0.002
1	82.07	0.008
0,5	79.61	0.001
0,25	78.94	0.003

Composto 12. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)ciclohexancarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.56	0.001
8	99.56	0.001
4	99.56	0.001
2	96.71	0.001
1	87.05	0.002
0,5	78.70	0.001
0,25	74.75	0.002

Composto 13. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.001
8	99.78	0.003
4	99.55	0.002
2	91.26	0.010
1	80.73	0.005
0,5	79.39	0.004
0,25	78.27	0.009

Composto 14. 2-fenil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	83.84	—
8	83.39	—
4	81.59	—
2	80.92	—
1	80.92	—
0,5	80.24	—
0,25	79.57	—

Composto 15. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)benzenosulfonilhidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo; s. a.: sem atividade na concentração máxima avaliada.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.003
8	99.78	0.004
4	99.78	0.004
2	99.10	0.002
1	96.42	0.005
0,5	83.64	0.005
0,25	80.51	0.009

Composto 16. 4-bifenil-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.78	0.001
8	99.78	0.004
4	97.31	0.008
2	92.14	0.003
1	86.08	0.006
0,5	82.71	0.005
0,25	80.02	0.010

Composto 17. 2-fenoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.002
8	99.78	0.003
4	99.78	0.004
2	98.43	0.005
1	90.35	0.013
0,5	84.29	0.002
0,25	82.26	0.001

Composto 18. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-4-pentilciclohexanocarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.78	0.000
8	99.70	0.001
4	99.56	0.002
2	97.35	0.000
1	91.12	0.002
0,5	85.66	0.009
0,25	80.98	0.011

Composto 19. 4-pentil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.85	0.001
8	99.78	0.000
4	97.61	0.000
2	95.40	0.014
1	89.37	0.012
0,5	85.21	0.018
0,25	81.20	0.017

Composto 20. 4-heptil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.78	0.002
8	99.56	0.002
4	97.15	0.012
2	88.80	0.007
1	85.95	0.005
0,5	85.95	0.012
0,25	84.63	0.010

Composto 21. 4-heptoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.78	0.002
8	99.55	0.000
4	99.10	0.009
2	98.88	0.008
1	96.19	0.002
0,5	87.45	0.003
0,25	82.07	0.009

Composto 22. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.78	0.000
8	99.78	0.002
4	99.56	0.001
2	99.56	0.002
1	99.56	0.001
0,5	80.24	0.006
0,25	76.95	0.001

Composto 23. 6-hidroxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.85	0.001
8	99.70	0.001
4	99.56	0.000
2	99.56	0.000
1	99.26	0.001
0,5	97.33	0.006
0,25	85.69	0.000

Composto 24. 6-amino-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.78	0.001
8	99.78	0.001
4	99.78	0.003
2	99.34	0.001
1	98.68	0.006
0,5	92.75	0.004
0,25	80.02	0.006

Composto 25. 6-metoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.78	0.001
8	99.56	0.002
4	99.56	0.003
2	97.59	0.002
1	90.78	0.004
0,5	84.63	0.011
0,25	81.56	0.009

Composto 26. 6-fluór-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.55	0.003
8	99.10	0.002
4	98.88	0.003
2	85.88	0.001
1	80.95	0.008
0,5	80.06	0.008
0,25	79.61	0.007

27. nifuroxazida (composto-protótipo e fármaco de referência) **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.33	0.001
8	95.97	0.001
4	85.88	0.002
2	85.44	0.002
1	81.63	0.003
0,5	80.73	0.003
0,25	80.51	0.005

28. nitrofurantoína (fármaco de referência) **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.88	0.002
8	97.76	0.004
4	97.54	0.005
2	92.16	0.004
1	89.25	0.001
0,5	86.11	0.004
0,25	77.59	0.009

29. oxacilina (fármaco de referência). **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.10	0.004
8	98.88	0.003
4	98.88	0.002
2	98.43	0.004
1	97.98	0.004
0,5	97.54	0.003
0,25	82.52	0.010

30. vancomicina (fármaco de referência). **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

ANEXO 10**Curvas Dose-Resposta*****Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina**

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.53	0.001
8	96.69	0.006
4	85.35	0.006
2	79.96	0.015
1	77.98	0.006
0,5	76.08	0.012
0,25	75.51	0.016

Composto 1. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; **MIC:** concentração inibitória mínima; **DP:** desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; **IC₉₀:** concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	97.15	0.001
8	93.39	0.004
4	87.82	0.010
2	83.54	0.004
1	81.74	0.001
0,5	80.22	0.007
0,25	79.08	0.011

Composto 2. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)hexanohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; **MIC:** concentração inibitória mínima; **DP:** desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; **IC₉₀:** concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.19	0.001
8	97.34	0.004
4	90.92	0.002
2	84.67	0.008
1	84.30	0.007
0,5	83.06	0.007
0,25	82.12	0.009

Composto 3. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)nonanohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.70	0.002
8	93.98	0.006
4	88.82	0.008
2	86.53	0.006
1	84.81	0.001
0,5	84.52	0.003
0,25	82.80	0.006

Composto 4. *N'*-2-etil-((5-nitrofuran-2-il)metileno)carboxilato-hidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100	0.001
8	99.71	0.003
4	99.71	0.011
2	99.42	0.021
1	87.96	0.007
0,5	84.52	0.008
0,25	81.94	0.014

Composto 5. *N'*-4-etoxi-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	91.78	0.009
8	83.01	0.006
4	79.90	0.001
2	79.32	0.004
1	79.04	0.000
0,5	78.76	0.004
0,25	78.20	0.003

Composto 6. *N'*-2-*tert*-butil-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carboxilatohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo; s. a.: sem atividade na concentração máxima avaliada.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	95.12	0.008
8	87.39	0.001
4	85.96	0.003
2	84.81	0.003
1	84.52	0.000
0,5	83.66	0.004
0,25	83.66	0.001

Composto 7. *N'*-2-ciano-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.06	0.001
8	94.90	0.007
4	93.38	0.008
2	87.72	0.016
1	85.44	0.000
0,5	84.02	0.003
0,25	80.70	0.001

Composto 8. *N'*-2-furano-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.34	0.001
8	97.93	0.007
4	94.43	0.002
2	86.29	0.010
1	84.30	0.003
0,5	83.07	0.010
0,25	81.74	0.010

Composto 9. *N'*-2-tiêno-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.05	0.001
8	98.77	0.003
4	97.45	0.004
2	95.84	0.008
1	84.40	0.002
0,5	83.26	0.007
0,25	81.26	0.007

Composto 10. *N'*-4-metil-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-1,2,3-tiodiazol-carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	97.83	0.004
8	96.13	0.013
4	86.66	0.009
2	82.98	0.012
1	79.09	0.001
0,5	78.15	0.003
0,25	77.58	0.003

Composto 11. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)ciclopentanocarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.68	0.003
8	96.59	0.001
4	89.34	0.001
2	80.34	0.001
1	79.21	0.006
0,5	77.60	0.008
0,25	76.37	0.011

Composto 12. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)ciclohexancarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.96	0.003
8	97.73	0.004
4	95.09	0.004
2	84.21	0.002
1	81.55	0.001
0,5	77.77	0.001
0,25	76.07	0.001

Composto 13. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.49	0.004
8	95.85	0.011
4	88.36	0.002
2	81.93	0.003
1	80.79	0.001
0,5	79.37	0.006
0,25	79.95	0.001

Composto 14. 2-fenil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	92.70	0.004
8	86.46	0.012
4	84.86	0.007
2	83.63	0.003
1	82.49	0.005
0,5	81.84	0.003
0,25	80.60	0.006

Composto 15. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzenosulfonilhidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo; s. a.: sem atividade na concentração máxima avaliada.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.62	0.001
8	98.96	0.000
4	97.17	0.004
2	92.32	0.006
1	86.38	0.002
0,5	85.24	0.006
0,25	83.82	0.002

Composto 16. 4-bifenil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.87	0.003
8	98.39	0.001
4	95.19	0.006
2	90.17	0.010
1	86.19	0.004
0,5	84.67	0.006
0,25	83.73	0.005

Composto 17. 2-fenoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.004
8	99.57	0.001
4	97.72	0.006
2	88.61	0.008
1	84.48	0.009
0,5	83.62	0.000
0,25	82.20	0.003

Composto 18. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-4-pentilciclohexanocarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.43	0.003
8	99.15	0.003
4	97.17	0.006
2	92.64	0.001
1	86.69	0.004
0,5	86.41	0.007
0,25	84.71	0.007

Composto 19. 4-pentil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.72	0.000
8	98.58	0.003
4	98.30	0.003
2	94.34	0.005
1	90.09	0.002
0,5	86.97	0.001
0,25	85.28	0.001

Composto 20. 4-heptil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.72	0.001
8	99.72	0.003
4	99.43	0.003
2	98.87	0.010
1	96.89	0.011
0,5	89.24	0.001
0,25	85.84	0.006

Composto 21. 4-heptoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.91	0.001
8	98.21	0.004
4	98.03	0.003
2	95.86	0.008
1	92.15	0.003
0,5	88.18	0.001
0,25	87.33	0.003

Composto 22. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.004
8	100.00	0.006
4	100.00	0.001
2	97.71	0.011
1	86.82	0.005
0,5	83.67	0.003
0,25	81.09	0.009

Composto 23. 6-hidroxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.003
8	100.00	0.007
4	99.71	0.012
2	99.71	0.014
1	98.85	0.000
0,5	89.69	0.006
0,25	81.38	0.003

Composto 24. 6-amino-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.72	0.001
8	99.72	0.007
4	99.15	0.006
2	98.02	0.007
1	88.67	0.014
0,5	82.16	0.011
0,25	78.76	0.012

Composto 25. 6-metoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.15	0.004
8	98.87	0.006
4	98.02	0.004
2	94.34	0.003
1	79.05	0.008
0,5	76.21	0.002
0,25	74.23	0.002

Composto 26. 6-fluór-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.71	0.001
8	97.42	0.006
4	86.53	0.001
2	84.24	0.001
1	83.38	0.009
0,5	82.52	0.009
0,25	82.24	0.005

27. nifuroxazida (composto-protótipo e fármaco de referência) **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	95.19	0.002
8	89.81	0.003
4	85.56	0.002
2	83.29	0.003
1	81.88	0.005
0,5	81.88	0.003
0,25	81.31	0.013

28. nitrofurantoína (fármaco de referência) **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	82.52	—
8	82.52	—
4	81.66	—
2	81.09	—
1	79.94	—
0,5	73.35	—
0,25	71.92	—

29. oxacilina (fármaco de referência). **Nota.** μM : concentração em micro-molar; **MIC**: concentração inibitória mínima; **DP**: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; **IC₉₀**: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.15	0.003
8	99.15	0.003
4	99.15	0.003
2	98.87	0.003
1	97.74	0.000
0,5	90.09	0.021
0,25	85.28	0.010

30. vancomicina (fármaco de referência). **Nota.** μM : concentração em micro-molar; **MIC**: concentração inibitória mínima; **DP**: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; **IC₉₀**: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

ANEXO 11**Curvas Dose-Resposta**

***Staphylococcus aureus* heterogênea com resistência intermediária à vancomicina**

hVISA–FCFHV36

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.73	0.002
8	89.97	0.021
4	48.71	0.001
2	41.80	0.005
1	37.64	0.009
0,5	34.43	0.009
0,25	30.31	0.007

Composto 1. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; **MIC:** concentração inibitória mínima; **DP:** desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; **IC₉₀:** concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.14	0.003
8	80.29	0.008
4	61.32	0.002
2	57.23	0.006
1	53.88	0.004
0,5	53.14	0.002
0,25	48.67	0.002

Composto 2. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)hexanohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; **MIC:** concentração inibitória mínima; **DP:** desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; **IC₉₀:** concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.88	0.002
8	99.18	0.006
4	74.19	0.001
2	62.91	0.005
1	60.42	0.001
0,5	59.15	0.006
0,25	55.09	0.005

Composto 3. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)nonanohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	97.40	0.006
8	69.50	0.004
4	61.32	0.000
2	59.46	0.006
1	56.11	0.004
0,5	54.62	0.002
0,25	52.02	0.001

Composto 4. *N'*-2-etil-((5-nitrofuran-2-il)metileno)carboxilato-hidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.65	0.000
8	99.41	0.002
4	98.81	0.006
2	86.84	0.001
1	64.33	0.005
0,5	61.13	0.004
0,25	56.16	0.002

Composto 5. *N'*-4-etoxi-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	83.63	—
8	68.01	—
4	61.69	—
2	57.97	—
1	57.97	—
0,5	57.23	—
0,25	52.39	—

Composto 6. *N'*-2-*tert*-butil-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carboxilatohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo; s. a.: sem atividade na concentração máxima avaliada.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	97.02	0.001
8	72.48	0.003
4	65.04	0.001
2	59.83	0.002
1	59.09	0.000
0,5	56.11	0.002
0,25	53.14	0.003

Composto 7. *N'*-2-ciano-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.66	0.002
8	99.66	0.002
4	83.48	0.019
2	67.97	0.004
1	63.58	0.006
0,5	61.22	0.003
0,25	58.19	0.002

Composto 8. *N'*-2-furano-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.26	0.003
8	98.51	0.004
4	76.94	0.009
2	63.18	0.003
1	59.46	0.005
0,5	59.09	0.002
0,25	54.25	0.002

Composto 9. *N'*-2-tiêno-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.64	0.002
8	97.14	0.002
4	67.13	0.005
2	63.55	0.007
1	60.69	0.003
0,5	60.69	0.002
0,25	57.48	0.005

Composto 10. *N'*-4-metil-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-1,2,3-tiodiazol-carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.93	0.003
8	98.93	0.003
4	63.20	0.008
2	60.69	0.011
1	58.19	0.010
0,5	57.48	0.004
0,25	54.62	0.009

Composto 11. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)ciclopentanocarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.64	0.001
8	98.57	0.003
4	50.69	0.006
2	41.40	0.008
1	35.68	0.013
0,5	32.82	0.003
0,25	31.39	0.016

Composto 12. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)ciclohexancarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.66	0.000
8	99.66	0.002
4	64.26	0.003
2	47.40	0.004
1	38.63	0.001
0,5	37.96	0.006
0,25	32.56	0.003

Composto 13. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.64	0.003
8	98.57	0.004
4	62.84	0.008
2	60.34	0.005
1	59.27	0.009
0,5	57.84	0.003
0,25	57.12	0.003

Composto 14. 2-fenil-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)acetohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	82.89	—
8	66.15	—
4	61.32	—
2	57.97	—
1	56.48	—
0,5	56.11	—
0,25	55.74	—

Composto 15. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)benzenosulfonilhidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo; s. a.: sem atividade na concentração máxima avaliada.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.002
8	99.63	0.003
4	97.02	0.001
2	78.43	0.014
1	68.01	0.004
0,5	58.34	0.008
0,25	54.62	0.008

Composto 16. 4-bifenil-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.14	0.004
8	77.68	0.002
4	66.15	0.005
2	60.20	0.006
1	59.46	0.006
0,5	57.23	0.005
0,25	56.11	0.004

Composto 17. 2-fenoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	97.04	0.001
8	96.35	0.008
4	92.77	0.001
2	66.53	0.003
1	61.64	0.001
0,5	60.72	0.002
0,25	56.33	0.006

Composto 18. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-4-pentilciclohexanocarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.63	0.001
8	99.26	0.000
4	99.26	0.011
2	97.02	0.027
1	61.32	0.005
0,5	59.09	0.011
0,25	55.74	0.012

Composto 19. 4-pentil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.26	0.004
8	98.88	0.006
4	94.05	0.016
2	71.36	0.004
1	63.18	0.008
0,5	61.69	0.009
0,25	56.85	0.009

Composto 20. 4-heptil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.29	0.002
8	98.93	0.004
4	92.85	0.007
2	77.49	0.026
1	63.91	0.004
0,5	62.48	0.006
0,25	58.91	0.001

Composto 21. 4-heptoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.007
8	99.63	0.006
4	97.77	0.008
2	65.41	0.008
1	60.20	0.011
0,5	59.46	0.010
0,25	55.00	0.018

Composto 22. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.64	0.002
8	99.64	0.004
4	99.29	0.001
2	99.29	0.000
1	68.56	0.010
0,5	61.41	0.015
0,25	55.69	0.008

Composto 23. 6-hidroxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.000
8	99.63	0.001
4	99.63	0.005
2	98.14	0.001
1	98.14	0.001
0,5	40.12	0.016
0,25	29.70	0.012

Composto 24. 6-amino-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.66	0.002
8	99.66	0.004
4	98.99	0.002
2	97.98	0.001
1	48.07	0.010
0,5	37.62	0.015
0,25	29.87	0.004

Composto 25. 6-metoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.29	0.003
8	99.29	0.002
4	97.86	0.001
2	76.06	0.007
1	60.69	0.001
0,5	60.69	0.007
0,25	55.69	0.001

Composto 26. 6-fluór-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.33	0.006
8	93.59	0.003
4	64.60	0.008
2	59.54	0.001
1	58.53	0.003
0,5	56.84	0.009
0,25	52.46	0.004

27. nifuroxazida (composto-protótipo e fármaco de referência) **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.99	0.002
8	72.01	0.005
4	60.55	0.004
2	58.53	0.008
1	56.17	0.010
0,5	55.83	0.001
0,25	52.46	0.003

28. nitrofurantoína (fármaco de referência) **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	89.99	—
8	69.27	—
4	65.70	—
2	65.34	—
1	62.84	—
0,5	62.12	—
0,25	59.62	—

29. oxacilina (fármaco de referência). **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.65	0.000
8	98.92	0.005
4	98.56	0.006
2	95.19	0.003
1	94.72	0.004
0,5	64.02	0.010
0,25	56.28	0.013

30. vancomicina (fármaco de referência). **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

ANEXO 12**Curvas Dose-Resposta*****Staphylococcus epidermidis* multirresistente**

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.24	0.002
8	96.94	0.005
4	74.25	0.007
2	57.68	0.003
1	52.33	0.009
0,5	50.04	0.008
0,25	48.76	0.008

Composto 1. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)acetohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.98	0.002
8	96.94	0.009
4	72.47	0.011
2	59.98	0.009
1	56.66	0.011
0,5	53.86	0.011
0,25	52.59	0.012

Composto 2. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)hexanohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.000
8	99.74	0.002
4	83.65	0.012
2	66.18	0.007
1	59.01	0.003
0,5	56.51	0.009
0,25	53.85	0.007

Composto 3. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)nonanohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.73	0.002
8	85.22	0.005
4	66.10	0.005
2	60.49	0.007
1	57.17	0.009
0,5	55.14	0.011
0,25	52.84	0.016

Composto 4. *N'*-2-etil-((5-nitrofuran-2-il)metileno)carboxilato-hidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.000
8	99.75	0.001
4	99.49	0.001
2	97.71	0.020
1	90.06	0.004
0,5	79.86	0.002
0,25	72.47	0.010

Composto 5. *N'*-4-etoxi-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.24	0.001
8	80.12	0.006
4	64.82	0.000
2	59.47	0.001
1	56.41	0.002
0,5	55.90	0.004
0,25	53.61	0.004

Composto 6. *N'*-2-*tert*-butil-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carboxilatohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo; s. a.: sem atividade na concentração máxima avaliada.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.49	0.002
8	95.41	0.001
4	77.57	0.009
2	67.88	0.008
1	60.49	0.005
0,5	57.17	0.007
0,25	55.14	0.004

Composto 7. *N'*-2-ciano-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetilhidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.92	0.001
8	99.65	0.001
4	93.72	0.004
2	78.30	0.008
1	66.08	0.002
0,5	59.18	0.006
0,25	56.52	0.004

Composto 8. *N'*-2-furano-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.83	0.001
8	99.65	0.001
4	94.74	0.005
2	79.14	0.013
1	65.63	0.010
0,5	59.35	0.005
0,25	56.51	0.006

Composto 9. *N'*-2-tiofeno-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.75	0.000
8	96.18	0.003
4	80.63	0.013
2	67.12	0.013
1	60.49	0.008
0,5	56.92	0.009
0,25	55.39	0.006

Composto 10. *N'*-4-metil-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-1,2,3-tiodiazol-carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.92	0.001
8	99.14	0.001
4	73.91	0.002
2	62.36	0.008
1	57.11	0.008
0,5	54.52	0.009
0,25	53.40	0.010

Composto 11. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)ciclopentanocarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.001
8	98.13	0.002
4	76.24	0.004
2	58.89	0.012
1	51.95	0.011
0,5	49.01	0.011
0,25	47.41	0.013

Composto 12. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)ciclohexancarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.75	0.002
8	97.97	0.003
4	85.56	0.007
2	68.33	0.011
1	58.20	0.017
0,5	53.64	0.013
0,25	49.58	0.020

Composto 13. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.91	0.001
8	96.59	0.008
4	80.89	0.008
2	65.30	0.004
1	58.58	0.006
0,5	55.73	0.008
0,25	52.63	0.011

Composto 14. 2-fenil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	95.92	0.007
8	78.84	0.004
4	64.82	0.008
2	59.98	0.006
1	56.92	0.012
0,5	55.90	0.013
0,25	53.35	0.012

Composto 15. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)benzenosulfonilhidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo; s. a.: sem atividade na concentração máxima avaliada.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.75	0.001
8	99.75	0.002
4	99.49	0.003
2	99.24	0.005
1	78.59	0.014
0,5	63.80	0.008
0,25	57.43	0.012

Composto 16. 4-bifenil-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.13	0.005
8	96.57	0.001
4	82.91	0.012
2	70.89	0.007
1	62.28	0.004
0,5	57.96	0.012
0,25	54.77	0.012

Composto 17. 2-fenoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.49	0.001
8	99.24	0.002
4	97.72	0.006
2	78.97	0.004
1	65.80	0.008
0,5	58.96	0.012
0,25	55.41	0.005

Composto 18. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-4-pentilciclohexanocarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.75	0.001
8	99.49	0.002
4	99.49	0.001
2	99.49	0.003
1	85.81	0.016
0,5	63.01	0.008
0,25	57.18	0.010

Composto 19. 4-pentil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.57	0.003
8	99.31	0.003
4	95.84	0.004
2	85.30	0.005
1	73.43	0.010
0,5	63.75	0.005
0,25	56.93	0.011

Composto 20. 4-heptil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.75	0.001
8	99.75	0.001
4	99.49	0.001
2	99.24	0.000
1	86.07	0.006
0,5	68.33	0.002
0,25	59.46	0.008

Composto 21. 4-heptoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100.00	0.001
8	99.75	0.001
4	99.75	0.003
2	92.86	0.003
1	70.43	0.003
0,5	59.72	0.006
0,25	55.39	0.003

Composto 22. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.75	0.001
8	99.75	0.001
4	99.49	0.001
2	99.49	0.000
1	99.24	0.001
0,5	79.99	0.020
0,25	57.69	0.011

Composto 23. 6-hidroxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.75	0.001
8	99.24	0.003
4	98.48	0.000
2	98.23	0.001
1	97.72	0.003
0,5	70.61	0.003
0,25	53.89	0.007

Composto 24. 6-amino-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	100	0.000
8	100	0.001
4	99.75	0.000
2	98.99	0.003
1	96.71	0.001
0,5	74.16	0.003
0,25	61.49	0.004

Composto 25. 6-metoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.92	0.001
8	99.83	0.001
4	99.74	0.000
2	99.57	0.002
1	80.11	0.023
0,5	64.53	0.024
0,25	59.20	0.008

Composto 26. 6-fluór-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.65	0.001
8	99.48	0.004
4	88.15	0.001
2	73.01	0.001
1	64.16	0.005
0,5	58.30	0.003
0,25	54.96	0.002

27. nifuroxazida (composto-protótipo e fármaco de referência) **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	96.40	0.005
8	91.07	0.007
4	75.29	0.005
2	70.02	0.009
1	63.57	0.006
0,5	58.40	0.008
0,25	54.35	0.008

28. nitrofurantoína (fármaco de referência) **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	95.52	0.001
8	75.96	0.010
4	69.84	0.012
2	66.23	0.012
1	63.64	0.011
0,5	57.19	0.011
0,25	53.07	0.005

29. oxacilina (fármaco de referência). **Nota.** μM: concentração em micro-molar; **MIC**: concentração inibitória mínima; **DP**: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; **IC₉₀**: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.75	0.001
8	99.75	0.000
4	99.24	0.001
2	96.71	0.001
1	81.76	0.014
0,5	64.03	0.007
0,25	55.92	0.004

30. vancomicina (fármaco de referência). **Nota.** μM: concentração em micro-molar; **MIC**: concentração inibitória mínima; **DP**: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; **IC₉₀**: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

ANEXO 13**Curvas Dose-Resposta**

Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina fenótipo *vanA

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.59	0.000
8	94.59	0.002
4	74.12	0.002
2	58.48	0.012
1	54.47	0.001
0,5	51.08	0.003
0,25	49.24	0.018

Composto 1. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.51	0.001
8	93.34	0.002
4	72.13	0.008
2	60.54	0.001
1	56.84	0.002
0,5	54.12	0.004
0,25	53.14	0.012

Composto 2. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)hexanohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	96.44	0.017
8	95.97	0.015
4	84.10	0.031
2	68.44	0.022
1	62.51	0.020
0,5	59.90	0.020
0,25	57.76	0.021

Composto 3. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)nonanohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.38	0.005
8	83.96	0.011
4	67.37	0.025
2	61.25	0.030
1	58.51	0.021
0,5	57.46	0.019
0,25	55.70	0.015

Composto 4. *N'*-2-etil-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carboxilato-hidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.92	0.001
8	99.76	0.000
4	99.59	0.002
2	99.11	0.004
1	89.12	0.006
0,5	71.39	0.013
0,25	60.12	0.009

Composto 5. *N'*-4-etoxi-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.87	0.005
8	84.05	0.005
4	68.51	0.017
2	60.93	0.016
1	57.79	0.020
0,5	56.73	0.022
0,25	54.49	0.017

Composto 6. *N'*-2-*tert*-butil-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carboxilatohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo; s. a.: sem atividade na concentração máxima avaliada.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.68	0.003
8	93.33	0.015
4	75.85	0.005
2	66.10	0.011
1	60.05	0.018
0,5	57.47	0.019
0,25	55.21	0.018

Composto 7. *N'*-2-ciano-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.84	0.001
8	99.60	0.001
4	92.42	0.020
2	76.87	0.026
1	64.40	0.026
0,5	59.88	0.023
0,25	55.77	0.025

Composto 8. *N'*-2-furano-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.76	0.002
8	99.60	0.001
4	94.11	0.008
2	78.88	0.012
1	65.45	0.017
0,5	60.44	0.020
0,25	57.15	0.022

Composto 9. *N'*-2-tiêno-((5-nitrofurano-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.68	0.001
8	94.50	0.019
4	78.39	0.016
2	66.31	0.017
1	60.13	0.014
0,5	58.27	0.016
0,25	55.37	0.021

Composto 10. *N'*-4-metil-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-1,2,3-tiodiazol-carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.68	0.004
8	95.79	0.014
4	76.15	0.008
2	64.07	0.015
1	59.48	0.016
0,5	56.57	0.019
0,25	54.65	0.017

Composto 11. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)ciclopentanocarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.11	0.003
8	97.09	0.008
4	78.56	0.009
2	63.98	0.013
1	55.45	0.011
0,5	53.27	0.015
0,25	51.59	0.015

Composto 12. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)ciclohexancarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.27	0.003
8	96.22	0.013
4	81.72	0.007
2	65.92	0.015
1	56.08	0.024
0,5	51.33	0.026
0,25	49.08	0.029

Composto 13. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.35	0.004
8	95.06	0.018
4	77.96	0.033
2	64.69	0.024
1	59.63	0.022
0,5	55.93	0.020
0,25	54.00	0.017

Composto 14. 2-fenil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)acetohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	96.86	0.002
8	77.67	0.017
4	64.70	0.018
2	60.68	0.018
1	57.45	0.018
0,5	56.08	0.019
0,25	54.39	0.017

Composto 15. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)benzenosulfonilhidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo; s. a.: sem atividade na concentração máxima avaliada.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.68	0.001
8	99.11	0.004
4	98.87	0.004
2	98.14	0.008
1	74.20	0.021
0,5	62.85	0.016
0,25	58.84	0.006

Composto 16. 4-bifenil-*N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)carbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.87	0.007
8	95.56	0.008
4	81.30	0.015
2	68.74	0.019
1	62.37	0.018
0,5	59.47	0.015
0,25	56.58	0.007

Composto 17. 2-fenoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.68	0.002
8	99.60	0.003
4	85.58	0.021
2	70.83	0.026
1	61.97	0.018
0,5	58.99	0.022
0,25	56.18	0.006

Composto 18. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-4-pentilciclohexanocarbohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.92	0.001
8	99.51	0.004
4	99.03	0.004
2	94.61	0.007
1	71.45	0.029
0,5	60.68	0.014
0,25	57.95	0.009

Composto 19. 4-pentil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.11	0.004
8	97.82	0.004
4	86.61	0.016
2	76.78	0.015
1	67.92	0.019
0,5	62.04	0.019
0,25	58.92	0.008

Composto 20. 4-heptil-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micromolar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.76	0.002
8	99.27	0.002
4	97.65	0.004
2	95.13	0.006
1	81.98	0.002
0,5	68.23	0.001
0,25	60.20	0.002

Composto 21. 4-heptoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzihidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.01	0.001
8	98.52	0.002
4	98.03	0.003
2	89.15	0.001
1	67.94	0.008
0,5	59.55	0.008
0,25	57.08	0.009

Composto 22. *N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.76%	0.000
8	99.76	0.000
4	99.51	0.002
2	99.15	0.001
1	97.08	0.002
0,5	76.71	0.009
0,25	57.09	0.000

Composto 23. 6-hidroxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.76	0.000
8	99.76	0.000
4	99.76	0.002
2	99.52	0.003
1	98.07	0.000
0,5	72.04	0.001
0,25	50.10	0.025

Composto 24. 6-amino-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.76	0.002
8	99.52	0.000
4	99.43	0.001
2	98.95	0.003
1	85.79	0.031
0,5	59.78	0.036
0,25	52.06	0.027

Composto 25. 6-metoxi-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.67	0.003
8	99.35	0.002
4	99.19	0.001
2	97.02	0.003
1	73.39	0.021
0,5	59.00	0.012
0,25	55.14	0.011

Composto 26. 6-fluor-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)-2-naftohidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	98.37	0.016
8	94.20	0.003
4	86.07	0.001
2	72.20	0.009
1	62.62	0.007
0,5	57.95	0.007
0,25	54.00	0.012

27. nifuroxazida (composto-protótipo e fármaco de referência) **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.68	0.002
8	87.77	0.010
4	73.58	0.004
2	65.92	0.012
1	61.01	0.008
0,5	57.22	0.010
0,25	54.08	0.011

28. nitrofurantoína (fármaco de referência) **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	96.79	0.009
8	79.65	0.018
4	66.58	0.013
2	63.03	0.010
1	59.89	0.011
0,5	56.11	0.003
0,25	52.08	0.008

29. oxacilina (fármaco de referência). **Nota.** μM : concentração em micro-molar; **MIC**: concentração inibitória mínima; **DP**: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; **IC₉₀**: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	—	—
8	—	—
4	—	—
2	—	—
1	—	—
0,5	—	—
0,25	—	—

$IC_{90} = \text{s. a.}$

30. vancomicina (fármaco de referência). **Nota.** μM : concentração em micro-molar; **MIC**: concentração inibitória mínima; **DP**: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; **IC₉₀**: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

ANEXO 14

Curvas Dose-Resposta

***Staphylococcus aureus* ATCC 29213**

Trabalho de Conclusão de Curso

Ana Carolina Hahns

Tabela. Dados de atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213*

Composto (R)	Intervalo de inibição (μM)	IC ₉₀ (μM)	Intervalo de inibição (μg/mL)	IC ₉₀ (μg/mL)	Log1/IC ₉₀
c1	8 – 4	4.98 ± 0.18	2 – 1	1.29	5.89
c2	4 – 2	3.21 ± 2.17	1 – 0.5	0.93	6.03
c3	4 – 2	3.18 ± 0.05	1 – 0.5	0.93	6.03
c4	2 – 1	1.46 ± 0.49	0.5 – 0.25	0.46	6.34
c5	4 – 2	3.29 ± 0.06	1 – 0.5	0.94	6.03
c6	8 – 4	7.9 ± 0.54	4 – 2	2.38	5.62
c7	8 – 4	6.96 ± 0.35	4 – 2	2.31	5.64
c8	4 – 2	3.88 ± 0.4	2 – 1	1.30	5.89
c9	16 – 8	12.11 ± 0.42	8 – 4	4.50	5.35
c10	8 – 4	4.98 ± 1.22	2 – 1	1.62	5.79
c11	s. a	s. a	s. a	s. a	s. a
c12	s. a	s. a	s. a	s. a	s. a
c13	s. a	s. a	s. a	s. a	s. a
c14	s. a	s. a	s. a	s. a	s. a
c15	s. a	s. a	s. a	s. a	s. a

*Dados obtido de Trabalho de Conclusão de Curso realizado pela aluna Ana Carolina Hahns.

Composto. *N'*-((5-nitrofuran-2-il)metileno)benzidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.61	0.001
8	99.30	0.002
4	97.59	0.003
2	69.63	0.113
1	25.55	0.009
0.5	23.84	0.009
0.25	20.03	0.026

Composto. 4-metoxi-*N'*-((5-nitrodurano-2-il)metileno)benzidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.69	0.001
8	99.46	0.001
4	99.07	0.002
2	29.75	0.021
1	24.69	0.006
0.5	23.99	0.006
0.25	21.59	0.011

Composto. 4-cloro-*N'*-((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.69	0.003
8	99.61	0.003
4	99.23	0.006
2	93.25	0.046
1	56.04	0.079
0.5	25.07	0.020
0.25	22.89	0.012

Composto. 4-butil- N' -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida. **Nota.** μM : concentração em micro-molar; **MIC**: concentração inibitória mínima; **DP**: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; **IC₉₀**: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.53	0.002
8	99.22	0.002
4	98.37	0.002
2	30.83	0.020
1	24.92	0.014
0.5	24.30	0.014
0.25	23.21	0.005

Composto. 4-ciano- N' -((5-nitrofurano-2-il)metileno)benzidrazida. **Nota.** μM : concentração em micro-molar; **MIC**: concentração inibitória mínima; **DP**: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; **IC₉₀**: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.77	0.002
8	91.61	0.043
4	29.20	0.016
2	27.18	0.007
1	26.01	0.012
0.5	25.39	0.011
0.25	23.67	0.018

Composto. 1-5-(5-(nitrofurano-2-il)-2-fenil-2,5-dihidro-1,2,3-oxadiazol-4-il)etanona. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.69	0.001
8	97.03	0.013
4	34.97	0.026
2	29.74	0.019
1	27.10	0.014
0.5	26.09	0.014
0.25	25.15	0.020

Composto. 1-(2-(4-metoxifenil)-5-(5-nitrofurano-2-il)-2,5-dihidro-1,2,3-oxadiazol-4-il)etanona. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.84	0.001
8	99.46	0.003
4	92.65	0.046
2	29.98	0.018
1	27.87	0.020
0.5	26.24	0.014
0.25	25.61	0.018

Composto. 1-(2-(4-clorofenil)-5-(5-nitrofurano-2-il)-2,5-dihidro-1,2,3-oxadiazol-4-il)etanona. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.77	0.002
8	63.72	0.076
4	35.31	0.028
2	28.28	0.005
1	26.33	0.009
0.5	24.30	0.011
0.25	23.05	0.015

Composto. 1-(5-(5-nitrofurano-2-il)-2-(4pentilfenil)-2,5-dihidro-1,2,3-oxadiazol-4-il)etanona. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC_{90} : concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	99.85	0.001
8	99.46	0.004
4	72.70	0.065
2	27.10	0.018
1	24.85	0.007
0.5	23.68	0.004
0.25	22.12	0.009

Composto. 4-(4-acetil-5-(5-nitrofuran-2-yl)-1,2,3-oxadiazol-2-(5H)-il)benzonitrila. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	38.73	—
8	31.07	—
4	26.43	—
2	22.02	—
1	20.39	—
0.5	19.23	—
0.25	18.53	—

Composto. N'-(furan-2-ylmetileno)benzidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	31.62	—
8	20.96	—
4	16.56	—
2	15.17	—
1	14.47	—
0.5	14.24	—
0.25	13.78	—

Composto. N'-(furan-2-ilmetileno)-4-metoxibenzidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	29.54	—
8	25.13	—
4	17.25	—
2	15.40	—
1	14.24	—
0.5	13.08	—
0.25	11.46	—

Composto. 4-cloro-N'-(furan-2-ilmetileno)benzidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{\text{ajust.}}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	37.80	—
8	32.23	—
4	28.28	—
2	25.50	—
1	23.64	—
0.5	16.68	—
0.25	14.59	—

Composto. 4-butil-*N'*-(furan-2-ilmetileno)benzidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.

Concentração (μM)	MIC (%)	DP
16	39.79	—
8	31.49	—
4	29.36	—
2	24.86	—
1	24.62	—
0.5	23.91	—
0.25	22.49	—

Composto. 4-ciano-*N'*-(furan-2-ilmetileno)benzidrazida. **Nota.** μM: concentração em micro-molar; MIC: concentração inibitória mínima; DP: desvio padrão; $r^2_{ajust.}$: coeficiente de correlação linear ajustado; IC₉₀: concentração capaz de inibir o crescimento de 90% do micro-organismo.