



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Graciele Ribeiro de Moraes

Investigação de Curcuminoides Monocetônicos como Agentes
Antibacterianos

São José do Rio Preto - SP

2022

Graciele Ribeiro de Moraes

Investigação de Curcuminoides Monocetônicos como Agentes
Antibacterianos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

São José do Rio Preto - SP

2022

M827i	Moraes, Graciele Ribeiro de Investigação de Curcuminoides Monocetônicos como Agentes Antibacterianos / Graciele Ribeiro de Moraes. -- , 2022 151 p. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, Orientadora: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini 1. Curcumina. 2. Curcuminóide. 3. Antibacteriano. 4. Membrana bacteriana. 5. Antibiofilme. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Graciele Ribeiro de Moraes

**Investigação de Curcuminoides Monocetônicos como Agentes
Antibacterianos**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini (Orientador)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Prof. Dra. Janaina de Cássia Orlandi Sardi

Universidade de Cuiabá – UNIC

São José do Rio Preto - SP

30 de Junho de 2022

Peça a Deus que abençoe os seus planos, e eles darão certo.

Provérbio 16:3

Dedico este trabalho principalmente a **Deus**, à toda a minha família, especialmente, a minha mãe **Clélia Ribeiro de Moraes** e ao meu pai **Edesildo Peres**, meu avô, **Manoel Ireno de Moraes** e ao meu irmão, **Thayrone Moraes da Costa**.

AGRADECIMENTO

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus**, pela minha vida, pelas conquistas, por me ajudar sempre em todos os momentos, por realizar meus sonhos e por me proporcionar uma vida abundante.

A minha mãe **Clélia Ribeiro de Moraes** que do jeito dela me apoia, não é de elogiar a gente, mas para outras pessoas adora falar dos seus filhos, ao meu pai **Edezildo Perez** que mesmo não podendo vivenciar esse momento tenho certeza que se estivesse vivo iria se alegrar muito da minha trajetória e ao meu irmão, **Thayrone Moraes da Costa** que vibra com as minhas conquistas e diz que sou a melhor irmã do mundo quando trago comida para ele, sei lá a quem puxou!

A toda a minha família, em especial a minha tia **Suzana Ribeiro de Moraes** que sempre diz: Você é inteligente, consegue, até hoje me pergunto da onde ela tirou isso. Aos meus avós **Manoel Ireno de Moraes** e **Ana Ribeiro de Moraes** que cuidaram de mim, em especial ao meu vô que me incentivou a estudar, se ele estivesse presente estaria com lágrimas nos olhos por ver que levei a sério o seu conselho. A família do meu pai que são a representação dele aqui na terra, em especial aos meus tios **Sandra, Beto e Cida** por todo carinho que me dão mesmo morando longe.

A minha família espiritual que sempre me apoiou de forma maravilhosa, graças a essa família que me acolheu quando mudei para Araçatuba, eu pude viver momentos incríveis que ficaram na minha memória enquanto viver, que tempos! Aos meus pastores de Araçatuba **Alfredo de Souza Nogueira** e **Thelma de Souza Soccio Nogueira** por sempre me orientar sabiamente, pelas ministrações, cuidado e muitas vezes pela ajuda financeiramente. Se hoje sou o que sou, em parcela, devo a eles, fica minha eterna gratidão. Aos pastores **Júlio César Mouro** e **Vilma Celestina Viana Mouro** que me receberam de uma forma sensacional em São José do Rio Preto, que casal! Me deram todo o suporte necessário em muitas coisas, muito obrigada pela linda disposição em servir as pessoas.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luis Octávio Regasini**, por ter me aceitado como orientada, mesmo eu falando que não tinha experiência nenhuma em bancada de laboratório, pesquisa ou como era ser uma pós-graduanda, crua de tudo rsrsrs ele aceitou o desafio, coitado foi corajoso. Isso ficará na minha memória e como forma de agradecimento a essa confiança depositada, eu procurei me esforçar ao máximo para

aprender, quer dizer, ainda estou no processo, mas enquanto muitos disseram NÃO, você disse SIM, obrigada pelo crédito cedido. No começo não entendemos muito porque algumas portas se fecham e isso traz tristeza ao nosso coração, mas hoje vejo que essas portas fechadas me levaram a caminhos melhores do que a minha própria perspectiva imaginava. Hoje não me vejo fazendo outro tipo de pesquisa e sim eu me apaixonei completamente pelo meu trabalho. Eu já era apaixonada pelo submundo dos microrganismos, mais através a sua orientação descobri que aquela tal Química Medicinal que parecia um monstrinho da goiaba verde não é tão monstrinho assim e até que eu gosto, vai entender isso !!!!

Muito obrigada a **Profa. Dra. Cristiane Duque** pela parceria e por me receber tão bem em seu Laboratório de Cultura de Células (FOA) UNESP – Araçatuba e por sempre estar disponível para esclarecer minhas dúvidas. Aos alunos **Jesse Augusto Pereira** e **Vanessa Rodrigues dos Santos** que foram uma graça, explicando todo o processo de ensaio e tirando todas as dúvidas (Olha que eu perguntei hein, meu Deus), fica aqui o meu muito obrigado, vocês são demais.

Aos meus colegas de **Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos** por todo o auxílio laboratorial, pela contribuição no meu conhecimento científico e claro pelas risadas e brincadeiras porque nem só de trabalho vive um Ser humaninho. Em especial ao **Diniz**, que deu um primeiro norte a síntese dos compostos, a **Me. Leticia** que me ajudou muito esclarecendo os meus porquês e contribuiu muito a minha rota sintética, Lê se eu pudesse enviaria todo mês um fadinho de cerveja para você como forma de agradecimento. A **Me. Ligia** que ajudou nesse processo de aprendizado e gente eu perturbei essa menina rsrs, a **Geovana** e outros momento bons!

Gostaria de agradecer aos meus amigos da vida, em especial as minhas melhores amigas **Rebeca Fabris**, **Kelen Zurdo** e **Aline Tabata**, o que seria de mim sem vocês? Sempre me dando total apoio nos meus sonhos e conquistas, me ouviram, me aconselharam, me deram força e ombro amigo em dias de chororô, fica o meu mais sincero agradecimento. Gostaria de agradecer a **Priscila** por aceitar dividir seu apartamento comigo, graças a ela consegui sobreviver em Rio Preto e a **Ana Lídia** que chegou depois e agregou a casa das ricas, nunca vou esquecer o dia que eu disse que iria virar a noite escrevendo o meu projeto e ela apareceu com uma sacola contendo

salgadinhos, balas e chocolates e me deu dizendo que se eu fosse virar a noite, precisava me alimentar rsrsrs.

As minhas queridas **Maria Otília** (Tilinha) e **Maria Teresa** que me apoiaram financeiramente por um tempo, no qual foi um divisor para meu progresso no estudo, só tenho que agradecer a elas, afinal nem nós conhecíamos direito na época e mesmo assim resolveram me ajudar, depois viramos amigas é claro. Em especial a Tilinha que sempre me envia mensagens quando eu estava em Rio Preto perguntando sobre o meu bem-estar.

Em especial a Profa. **Dra. Rossana Abud Cabrera Rosa** que foi minha professora e coordenadora na graduação do Unisaesiano, essa mulher é incrível, ela me instrui no curso, me ajudou a conseguir bolsa e graças a ela tive a oportunidade de concluir meus estudos, ou seja, me ajudou absurdamente e esse mestrado só é possível porque lá atrás ela me estendeu a mão. Eu me lembro como se fosse hoje do dia que perguntei a ela: Rô porque você me ajuda tanto e ela respondeu: Porque eu quero que você seja a melhor bióloga! Isso me marcou profundamente, então Rô sempre terei um carinho especial por você.

Ao Prof. **Dr. Carlos Henrique Gomes Martins** e a aluna **Mariana Brentini Santiago** do laboratório de Testes Antimicrobianos, Instituto Ciências Biomédicas – ICBIM da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, muito obrigada parceria.

Ao Prof. **Dr. Henrique Ferreira** e ao doutorando Guilherme Dilarri do Departamento de Bioquímica e Microbiologia IB – UNESP Câmpus de Rio Claro.

Ao Prof. **Dr. Fernando R. Pavan** e seus alunos do laboratório de pesquisa em tuberculose - Departamento de Ciências Biológicas UNESP câmpus Araraquara – SP.

A profa. **Dra. Janaina de Cássia Orlandi Sardi** e seu aluno **Diego** do laboratório de biociência – Universidade de Cuiabá – MT, muito obrigada pela parceria.

Agradeço aos parceiros, como a **Profa. Dra. Eleni Gomes**, por todo suporte oferecido nas análises de Cromatografia em fase reversa, CLAE

Ao **Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular**, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP/São José do Rio Preto (FAPESP – Processo nº 2009/53989-4), especialmente, ao **Dr. Fábio Moraes**, pela realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao **Instituto de Biociência, Letras e Ciências Exatas (IBILCE)**, por entrar na minha história e agradeço aos **docentes** do Programa de Pós-graduação em Microbiologia que fizeram parte da minha formação e por transmitirem seus conhecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de **Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001** pela bolsa concedida e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro ao laboratório, sem as agências de fomentos não conseguiríamos realizar nossas pesquisas.

À **comissão Examinadora** pela disponibilidade e aceite em participar desse desafio, muito obrigada.

RESUMO

Infecções bacterianas constituem um grande problema de saúde em todo o mundo, o qual é agravado pela resistência aos antibacterianos. A busca por novos agentes vem sendo um desafio e os produtos naturais têm sido fonte de descobertas de novas substâncias bioativas. A curcumina exhibe destaque por suas propriedades terapêuticas, entretanto com algumas limitações em sua estrutura. Nesse contexto, a simplificação molecular pode conduzir análogos mais potentes. Portanto, para esse trabalho, uma série de curcuminoides monocetônicos foram planejados, sintetizados, caracterizados e investigados contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de importância clínica. Foram sintetizados 14 compostos, dentre eles 13 totalmente inéditos na literatura. Os análogos foram caracterizados por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , os valores de $\log P_{\text{o/w}}$ foram entre 1,55 a 3,36, com grau de pureza de 95,9 a 99,0%, o que confirma que a estrutura planejada foi formada. Entre a série, o análogo GRM12 obteve ação de amplo espectro pois exibiu atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas com valores de CIM de 3 a 60 μM . Outro fator importante foi a ação contra cepas resistentes, inclusive muitas delas, resistente a várias classes de antibióticos. O GRM12 exibiu uma CIM de 1 a 79 μM , valor igual ou próximo à tetraciclina, somente contra *P. aeruginosa* (ATCC 27453) o GRM12 foi fracamente ativo com uma CIM 1.000 μM . No estudo *in silico*, foi analisado padrões físico-químicos do GRM12, o que é crucial para molécula em fase experimental. Neste mesmo ensaio utilizamos a plataforma computacional (SwissTargetPrediction) para elucidar possíveis mecanismos de ação, no qual projetou forte interação com protease, enzima apagadora e quinase bacteriana. Com essa investigação esclarecemos pontos justificáveis a CIM tão baixo. No ensaio de permeação de membrana o GRM12 apresentou 75% de dano a membrana de *S. aureus* (ATCC 29213), o que pode associar ação desse análogo na ruptura da membrana bacteriana. Em teste de citotoxicidade *in vivo* para *Galleria mellonella*, o GRM12 não demonstrou toxicidade nas concentrações testadas, contribuindo no seguimento para outros ensaios. O biofilme é um mecanismo desafiador para inserção de antibióticos convencionais por decorrência da sua matriz muito bem organizada, tornando rígido a sua erradicação, entretanto o GRM12 foi capaz de inibir o biofilme formado em 50% contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas tendo uma ação bacteriostática contra a biomassa. Em contrapartida, a curva de morte bacteriana provocada pelo GRM12 foi igual ou menor aos fármacos, como vancomicina e tetraciclina, validando o GRM12 a um candidato promissor para futuros ensaios. Dentre a série de curcuminoides monocetônicos, outros compostos foram fortemente ativos. O GRM01, obteve atividade contra *H. pylori* (ATCC43526) com uma CIM 44 μM , GRM03 e GRM11 apresentaram atividade antibacteriana contra *H. pylori* (ATCC43526) e a cepa resistente MRSA (ATCC BAA44) com CIM entre 39 e 177 μM , respectivamente. Portanto, conclui-se que a simplificação molecular ocasionou curcuminoides ativos, corroborando o potencial da curcumina como um protótipo no planejamento de substância com competências antibacterianas. Um análogo com característica de amplo espectro em sua bioatividade e padrões mínimos predefinidos para viabilizar um futuro candidato a fármaco.

Palavras-chave: Curcumina, curcuminóide, síntese, antibacteriano, membrana bacteriana, antibiofilme, citotoxicidade.

ABSTRACT

Bacterial infections are a major health problem worldwide, compounded by resistance to antibacterials. The search for new agents has been a challenge and natural products have been the origin of discoveries of new bioactive substances. Curcumin stands out for its therapeutic properties, but with some limitations in its structure. In this context, molecular simplification can lead to more potent analogues. Therefore, for this work, a series of monocarbonyl curcuminoids was designed, synthesized, characterized and investigated against Gram-positive and Gram-negative bacteria of clinical importance. The 14 compounds were synthesized, among them 13 completely unpublished in the literature. The ^1H NMR and ^{13}C NMR characterized the analogs, and the log $P_{\text{o/w}}$ values were between 1.55 to 3.36, with a purity degree of 95.9 to 99.0%, which confirms that the structure plane was formed. Among the series, the GRM12 analog obtained broad-spectrum action, exhibiting activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria with MIC values from 3 to 60 μM . Another relevant factor was the action against resistant strains, including many of them, resistant to several classes of antibiotics. GRM12 exhibited a MIC of 1 to 79 μM , equal to or close to tetracycline, only against *P. aeruginosa* (ATCC 27453) was GRM12 weakly active with a MIC of 1000 μM . In the *in silico* study, physicochemical patterns of GRM12 were analyzed, which is crucial for a molecule in the experimental period. In this same assay, we used the computational platform (SwissTargetPrediction) to elucidate possible mechanisms of action, in which it projected a strong interaction with protease, eraser enzyme and bacterial kinase. With this investigation, we explain points that are justifiable for such a low MIC. In the membrane permeation test, GRM12 showed 75% damage to the membrane of *S. aureus* (ATCC 29213), which may associate the action of this analogue in the rupture of the bacterial membrane. In an *in vivo* cytotoxicity test for *Galleria mellonella*, GRM12 did not demonstrate toxicity at the tested concentrations, contributing to the follow-up of other assays. The biofilm is a challenging mechanism for the insertion of conventional antibiotics due to its very well organized matrix, making its eradication rigid, however, the GRM12 was able to inhibit the biofilm formed by 50% against Gram-positive and Gram-negative bacteria having a bacteriostatic action against biomass. In contrast, the bacterial death curve caused by GRM12 was equal to or lower than drugs such as vancomycin and tetracycline, validating GRM12 as a promising candidate for future trials. Among the series of monocarbonyl curcuminoids, other compounds were strongly active. GRM01, showed activity against *H. pylori* (ATCC43526) with a MIC 44 μM , GRM03 and GRM11 showed antibacterial activity against *H. pylori* (ATCC43526) and the MRSA resistant strain (ATCC BAA44) with MIC between 39 and 177 μM , respectively. Therefore, it is concluded that molecular simplification leads to active curcuminoids, corroborating the potential of curcumin as a prototype in the design of a substance with antibacterial competencies. An analog with a broad spectrum characteristic in its bioactivity and predefined minimum standards to enable a future drug candidate.

Keywords: Curcumin, curcuminoid, synthesis, antibacterial, bacterial membrane, antibiofilm, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1 Estruturas da parede celular de espécies bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas.....	38
--	----

CAPITULO II

Figura 1. Substância majoritária dos Rizomas de <i>Curcuma longa</i>	51
Figura 2. Planejamento estrutural dos análogos monocetônicos.....	58
Figura 3. Gráfico representativo BOILED - Egg.....	71
Figura 4. Principais classe-alvos de ação para o GRM12.....	72
Figura 5. Microscopia de fluorescência da membrana citoplasmática, barra de escala 5µm com ampliação de 100x.....	75
Figura 6. Porcentagem de permeabilidade células com membranas danificadas.....	76
Figura 7. Efeito do GRM 12 sobre o biofilme de <i>S. aureus</i> resistente a meticilina.....	78
Figura 8. Efeito da vancomicina sobre o biofilme de <i>S. aureus</i> resistente a meticilina....	78
Figura 9. Efeito do GRM 12 sobre o biofilme de <i>S. aureus</i> suscetível a meticilina.....	79
Figura 10. Efeito da tetraciclina sobre o biofilme de <i>S. aureus</i> suscetível a meticilina..	79
Figura 11. Efeito do GRM 12 sobre o biofilme de <i>Enterococcus faecium</i>	80
Figura 12. Efeito da tetraciclina sobre o biofilme de <i>Enterococcus faecium</i>	80
Figura 13. Efeito do GRM 12 sobre o biofilme de <i>Escherichia coli</i> resistente.....	81
Figura 14. Efeito da tetraciclina sobre o biofilme de <i>Escherichia coli</i> resistente.....	81
Figura 15. Efeito do GRM 12 sobre o biofilme de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	82
Figura 16. Efeito da tetraciclina sobre o biofilme de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	82
Figura 17. Avaliação da cinética de morte do GRM 12 nas concentrações 1x e 2x CIM e a vancomincina para <i>S. aureus</i> suscetível a meticilina no período de 24 horas.....	84
Figura 18. Avaliação da cinética de morte do GRM 12 nas concentrações 1x e 2x CIM e a vancomincina para <i>S. aureus</i> resistente a meticilina no período de 24 horas.....	84
Figura 19. Avaliação da cinética de morte do GRM 12 nas concentrações 1x e 2x CIM e a tetraciclina para <i>Enterococcus faecium</i> no período de 24 horas.....	85
Figura 20. Avaliação da cinética de morte do GRM 12 nas concentrações 1x e 2x CIM e a tetraciclina para <i>Escherichia coli</i> no período de 24 horas.....	85
Figura 21. Avaliação da cinética de morte do GRM 12 nas concentrações 1x e 2x CIM e a tetraciclina para <i>Klebsiella pneumoniae</i> no período de 24 horas.....	86

CAPITULO III

APÊNDICE I

Figura 1. Espectro de RMN ^1H do composto GRM01 (600 MHz; DMSO- <i>d</i>)	119
Figura 2. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM01 (150 MHz; DMSO- <i>d</i>)	120
Figura 3. Espectro de RMN ^1H do composto GRM02 (600 MHz; DMSO- <i>d</i>)	121
Figura 4. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM02 (150 MHz; DMSO- <i>d</i>)	122
Figura 5. Espectro de RMN ^1H do composto GRM03 (600 MHz; DMSO- <i>d</i>)	123
Figura 6. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM03 (150 MHz; DMSO- <i>d</i>)	124
Figura 7. Espectro de RMN ^1H do composto GRM04 (600 MHz; DMSO- <i>d</i>)	125
Figura 8. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM04 (150 MHz; DMSO- <i>d</i>)	126
Figura 9. Espectro de RMN ^1H do composto GRM05 (600 MHz; DMSO- <i>d</i>)	127
Figura 10. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM05 (150 MHz; DMSO- <i>d</i>)	128
Figura 11. Espectro de RMN ^1H do composto GRM06 (600 MHz; DMSO- <i>d</i>)	129
Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM06 (150 MHz; DMSO- <i>d</i>)	130
Figura 13. Espectro de RMN ^1H do composto GRM07 (600 MHz; DMSO- <i>d</i>)	131
Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM07 (150 MHz; DMSO- <i>d</i>)	132
Figura 15. Espectro de RMN ^1H do composto GRM08 (600 MHz; DMSO- <i>d</i>)	133
Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM08 (150 MHz; DMSO- <i>d</i>)	134
Figura 17. Espectro de RMN ^1H do composto GRM09 (600 MHz; DMSO- <i>d</i>)	135
Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM09 (150 MHz; DMSO- <i>d</i>)	136
Figura 19. Espectro de RMN ^1H do composto GRM10 (600 MHz; DMSO- <i>d</i>)	137
Figura 20. Espectro de RMN ^1H do composto GRM11 (600 MHz; DMSO- <i>d</i>)	138
Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM11 (150 MHz; DMSO- <i>d</i>)	139
Figura 22. Espectro de RMN ^1H do composto GRM12 (600 MHz; DMSO- <i>d</i>)	140
Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM12 (150 MHz; DMSO- <i>d</i>)	141
Figura 24. Espectro de RMN ^1H do composto GRM13 (600 MHz; DMSO- <i>d</i>)	142
Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM13 (150 MHz; DMSO- <i>d</i>)	143
Figura 26. Espectro de RMN ^1H do composto GRM14 (600 MHz; DMSO- <i>d</i>)	144

Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM14 (150 MHz; DMSO- <i>d</i>)	145
Figura 28. Cromatograma de CLAE da GRM01 a 254nm.....	146
Figura 29. Cromatograma de CLAE da GRM02 a 254nm.....	147
Figura 30. Cromatograma de CLAE da GRM03 a 254nm.....	148
Figura 31. Cromatograma de CLAE da GRM04 a 254nm.....	149
Figura 32. Cromatograma de CLAE da GRM05 a 254nm.....	150
Figura 33. Cromatograma de CLAE da GRM06 a 254nm.....	151
Figura 34. Cromatograma de CLAE da GRM07 a 254nm.....	152
Figura 35. Cromatograma de CLAE da GRM08 a 254nm.....	153
Figura 36. Cromatograma de CLAE da GRM09 a 254nm.....	154
Figura 37. Cromatograma de CLAE da GRM11 a 254nm.....	155
Figura 38. Cromatograma de CLAE da GRM12 a 254nm.....	156
Figura 39. Cromatograma de CLAE da GRM13 a 254nm.....	157
Figura 40. Cromatograma de CLAE da GRM14 a 254nm.....	158
Figura 41. Espectrometria de massa GRM01.....	159
Figura 42. Espectrometria de massa GRM02.....	159
Figura 43. Espectrometria de massa GRM 03.....	160
Figura 44. Espectrometria de massa GRM 04.....	160
Figura 45. Espectrometria de massa GRM 05.....	161
Figura 46. Espectrometria de massa GRM 06.....	161
Figura 47. Espectrometria de massa GRM 07.....	162
Figura 48. Espectrometria de massa GRM 08.....	162
Figura 49. Espectrometria de massa GRM 09.....	163
Figura 50. Espectrometria de massa GRM 10.....	163
Figura 51. Espectrometria de massa GRM 11.....	164
Figura 52. Espectrometria de massa GRM 12.....	164

LISTA DE ESQUEMA

CAPITULO II

Esquema1. Síntese de curcuminoides monocetônico monossustituído disubstituído.....	90
---	----

LISTA DE TABELA

CAPITULO II

Tabela 1. Análises de coeficiente de partição entre <i>n</i> -octanol e água ($\log P_o / w$), pureza e Massa Molar.....	60
Tabela 2. Análise <i>in silício</i> de classe-alvo pela plataforma (SwissTargetPrediction) ...	62
Tabela 3. Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) estão em μM para cada composto contra as bactérias testadas.....	64
Tabela 4. Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em μM	65
Tabela 5. Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em μM em bactérias resistentes.....	65
Tabela 6. Preditivos <i>in silico</i> (SwissADME) para GRM12.....	69
Tabela 7. Estrutura de intermediário e curcuminoides monocetônicos.....	92

LISTA DE GRÁFICO

CAPITULO II

Gráfico 1. Ensaio de citotoxicidade em diferentes concentrações do curcuminoide monocetônico (GRM12) e clorexidina (CHX) na viabilidade de células de queratinócitos (HaCat). Os resultados são expressos como médias $\pm$ D.....87

Gráfico 2. Ensaio de toxidade em diferentes concentrações do curcuminoide monocetônico GRM12 em *Galleria mellonella*.....88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME: Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

ATP: Adenosina trifosfato

BH: Barreira hematocenfálica

CGN: Curcuminoide nitrofurânico guaiacólico

CI₅₀: Concentração inibitória para 50%

CIM: Concentração inibitória mínima

CIM₉₀: Concentração inibitória para 90%

DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido hexadeuterado

EMA: European Medicines Agency

FOA: Faculdade de Odontologia de Araçatuba

GI: Gastrointestinal

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LAQ: Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos

Log *Po/w*: Logaritmo do coeficiente de partição *n*-octanol/water

MDR: Multidrug Resistant

MSSA: *Staphylococcus aureus* suscetível

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina

P-gp: Glicoproteína P

PSA: Superfície polar

REMA: Ensaio de microtitulação resazurina

RMN- ¹H: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN- ¹³C: Ressonância magnética nuclear de carbono Treze

TPSA: Área de superfície polar topológica

Sumário

CAPITULO I

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Aspectos gerais dos microrganismos.....	18
1.2 Resistência bacteriana.....	22
REFERÊNCIAS.....	26

CAPITULO II

1. INTRODUÇÃO.....	34
1.1 Ação Antimicrobiana da Curcumina e Curcuminoides.....	34
1.2 Mecanismo antibacteriano da curcumina.....	37
2. PLANEAMENTO MOLECULAR.....	40
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 Geral.....	41
3.1.2 Especifico.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Química.....	42
4.1.2. Relação de log <i>P in silico</i> (SwissADME) e Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	42
4.2 Atividade biológica.....	44
4.2.1 Classe-alvo <i>in silício</i> antibacteriano dos curcuminoides monocetônicos.....	44
4.2.2 Atividade antibacteriana.....	45
4.3 Propriedades <i>in silico</i> : físico-químicas, <i>drug-likeness</i> e farmacocinéticas obtidas pelo SwissADME do GRM12.....	51
4.3.1 Investigação <i>in silício</i> pelo SwissTargetPrediction de mecanismo de ação para GRM12.....	55
4.3.2 Ensaio de Permeabilidade de Membrana com <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	57
4.3.3 Ensaio de Antibiofilme.....	60
4.3.4 Cinética de morte.....	66
4.4 Teste de citotoxicidade.....	69
4.4.1 Ensaio em células queratinócitos (HaCat)	69

4.4.2 Citotoxicidade <i>Galleria mellonella</i>	70
5. CONCLUSÃO.....	72
6. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	73
6.1 Químico.....	73
6.1.2 Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC-FN) e Cromatografia de gel permeação em Sephadex ® LH20.....	76
6.1.3 Coeficiente de partição (n-octanol/água) medido pelo método Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE)	76
6.2 Ferramenta computacional.....	77
6.3 Procedimentos biológicos.....	77
6.3.1 Cepas microbianas padrão e condições de crescimento.....	77
6.3.2 Triagem dos compostos quanto à atividade antibacteriana.....	78
6.3.3 Atividade antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (BAA 44) - MRSA e <i>Staphylococcus aureus</i> suscetível à meticilina (ATCC 6538) – MSSA.....	79
6.3.4 Atividade antibacteriana contra cepa de <i>H. pylori</i> (ATCC43526)	80
6.3.5 Atividade antibacteriana contra cepa resistente Gram-positivas e Gram-negativas	80
6.4 Ensaio de permeação em membrana de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC29213)	81
6.5 Ensaio antibiofilme.....	82
6.6 Cinética bacteriana.....	84
6.7 Ensaio toxicidade contra queratinócitos humanos (HaCaT).....	85
6.7.1. Ensaio de toxicidade contra <i>Galleria mellonella</i>	85
REFERÊNCIA.....	87
 CAPITULO III	
APÊNDICE.....	101
1. Dados de espectroscopia.....	102

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais dos microrganismos

As bactérias são organismos unicelulares simples e procariontes, pois não possuem núcleo definido, nem organelas membranosas. Elas podem ser classificadas de acordo com seu aspecto morfológico como: Coco, bacilo, espirilo, espiroqueta, bactéria apendiculada e filamentosa (BEGG & DONACHIE, 1985; POINDEXTER, 1981; STACKEBRANDT & WOESE, 1979; HEDLUND et al., 1996; TAMAMES et al., 2001).

Com relação à identificação das espécies, é possível observar uma gama de características morfológicas e fisiológicas que diferenciam esses microrganismos como: Forma, endósporo, flagelos, corpos de inclusão, cor, dimensões, crescimento em várias temperaturas, valores de pH, concentrações de soluto ou condições atmosféricas, exemplo: Aeróbio e anaeróbico, desenvolvimento à presença de várias substâncias, como agentes antimicrobianos, metabolização de compostos e atividade enzimática (VAN DAMME et al., 1996; MAKI et al., 2000; MACNAB, 2003).

Os principais componentes bacterianos são parede celular, membrana citoplasmática, nucleóide, citoplasma, plasmídeo e ribossomo. Procariontes constituem o Reino Monera, algumas espécies causam doenças e outras são importantes para equilíbrio ecológico e de relevância industrial (WHITAKER, 1969; WOESE et al., 1990; MAKI et al., 2000; BARCO et al., 2020). A parede celular dos organismos procariotos é constituída por peptidoglicano, um polissacarídeo derivado de dois monossacarídeos, *N*-acetilglicosamina e ácido *N*-acetilmurâmico, além dos aminoácidos, *L*-alanina, ácido *D*-glutâmico e *L*-lisina dividindo as bactérias em dois grupos: Gram-positiva e Gram-negativa, que podem ser diferenciadas por meio da técnica de coloração de Gram (GRAM 1884; SCHLEIFER e KANDLER, 1972; VOLLMER et al., 2008).

Nas bactérias Gram-negativas contam com uma proteção extra, a lipopolissacarídeo (LPS), formada por fosfolipídeos e proteínas, corando-se rosa pela coloração de Gram (SCHLEIFER; KANDLER, 1972; GRAM, 1884; SNIJDER et al., 1999; RAETZ; WHITFIELD, 2002; GRONOW; BRADE, 2001).

Na membrana externa, o LPS atua como uma ancora hidrofóbica e desempenha uma função importante como forma de proteção com uma ampla cadeia de polissacarídeo constituída pelo *O*-antígeno e núcleo interno, lipídio A (RAETZ; WHITFIELD, 2002; GRONOW; BRADE, 2001).

As bactérias Gram-negativas são envolvidas por duas membranas, interna e externa, separadas pelo periplasma, um compartimento celular aquoso, sendo mais viscoso que o citoplasma, o que permite as bactérias Gram-negativas captar enzimas degradantes que são potencialmente prejudiciais à célula (MULLINEAX et al., 2006).

O LPS e seus componentes são sintetizados no citoplasma em unidades separadas e transportados até a parte externa da membrana pelo transportador ABC (RAETZ; WHITFIELD, 2002). As proteínas destinadas ao periplasma ou membrana externa são sintetizadas de forma precursora com uma sequência de sinal no amino terminal, essa sucessão de sinal direciona para translocação do citoplasma (DRIESSEN e NOUWEN, 2008).

O meio de transporte e catálise realizado por *Escherichia coli* na membrana interna, ocorre por meio de proteínas translocase formada pelo complexo SecA, usando a força próton-motriz e adenosina trifosfatase (ATPase), no qual impulsiona a reação de translocação formando um sistema chamado SecYEG (BERG et al., 2004; ZIMMER et al. 2008; SANGANNA et al., 2019).

Essa interação de SecA se dissocia do SecYEG após a hidrólise de ATP e se une ao citoplasma e pode juntar-se a ciclos de translocação adicionais. Todo esse processo dinâmico continua até que a estrutura polipeptídica completa passe pelo canal membranal (GOURIDIS et al., 2013; BAUER et al 2014; YOUNG e DUONG, 2019).

Portanto, com relação ao tráfico e integração da membrana interna e externa ainda existem alguns pontos a serem compreendidos. Contudo a integração de transporte entre as membranas é utilizada uma sinergia de proteínas periplasmáticas que realizam esse transporte (MATSUYAMA et al.,1995; TANAKA et al., 2001).

As subunidades de proteínas de superfície, como pili, são direcionadas e montadas por meio de vias específicas de chaperonas (KLEMM; CHRISTIANSEN, 1990; THANASSI et al., 1998). O gene *imp* está presente em uma ampla gama de bactérias Gram-negativas e envolvida em proteína da biogênese do envoltório celular, sendo essencial para viabilidade celular (SAMPSON et al. 1989; BRAUN; SILHAVY, 2002).

Os *Omps* são genes que codificam as porinas de membrana externa, essas proteínas transmembranares são responsáveis pela difusão de pequenos metabólitos, como: mono e dissacarídeos e aminoácidos por meio da membrana. As *OmpF* e *OmpC* são características em *E.coli* e as *OmpK35*, *OmpK36* e *OmpK37* em *Klebsiella*

pneumoniae (COWAN et al. 1992; SIMÕES, 2013). As chaperonas trabalham para evitar o dobramento incorreto ou agregação de proteínas inativas para microrganismo, um exemplo: As proteínas periplasmáticas que contém ligações dissulfeto, recorrem à dissulfeto oxidase periplasmática produzida pela proteína DsbA para o dobramento correto. Na falta de DsbA, a protease periplasmática/chaperona DegP codificada pelo gene *HtrA* pode substituir e evitar esse dobramento incorreto (SPIESS et al. 1999; TAN et al., 2004). Em bactérias Gram-negativas, a incorporação de pontes dissulfeto ocorre no compartimento periplasmático, organizada pela maquinaria Dsb, que é bem caracterizada em *E. coli* (HATAHET et al. 2014; KADOKURA & BECKWITH, 2010).

Em bactérias Gram-positivas a parede celular é composta por uma camada bem espessa de peptidoglicano e algumas espécies apresentam o ácido diaminopimélico (DAP) e outra lisina em vez de DAP. Essa camada formada por ligações cruzadas e por uma curta ponte de interpeptídica, ácidos teicóicos no qual estão ligados nos ácidos lipoteicóicos e ancorados aos grupos de cabeça dos lipídios da membrana, essa estrutura coram - se de roxo pelo processo de coloração de Gram (SCHLEIFER; KANDLER, 1972; GRAM, 1884; NEUHAUS, 2003; VOLLMER et al., 2008).

Os organismos Gram-positivos não contém camada externa, como os Gram-negativos, contudo para conter proteínas extracelulares, elas precisam apresentar elementos que as retêm dentro ou perto da membrana. Algumas bactérias, contém proteína em hélices e outras em ancoras lipídicas inseridas na membrana, podendo estar ligadas covalentemente, uma fortemente ao peptidoglicano ou aos ácidos teicóicos (SCOTT e BARNETT, 2006). Os ácidos teicóicos são polímeros aniônicos longos, compostos em grande parte de repetições de fosfato de glicerol, fosfato de glicosil ou ribitol. Esses polímeros podem compor mais de 60% da massa da parede das bactérias Gram-positivas se tornando importantes para a estrutura e fisiologia bacteriana (NEUHAUS, 2003).

Há dois tipos de ácidos teicóicos, os ácidos teicóicos de parede que estão acoplados ao peptidoglicano e os ácidos lipoteicóicos que estão sustentados à membrana celular (NEUHAUS, 2003). Os ácidos teicóicos têm uma parcela de participação na massa da parede celular e sua função é variada, dependendo da espécie. Por serem aniônicos e se ligam aos cátions, desempenham o papel de estabilidade de cátions, essa rede de

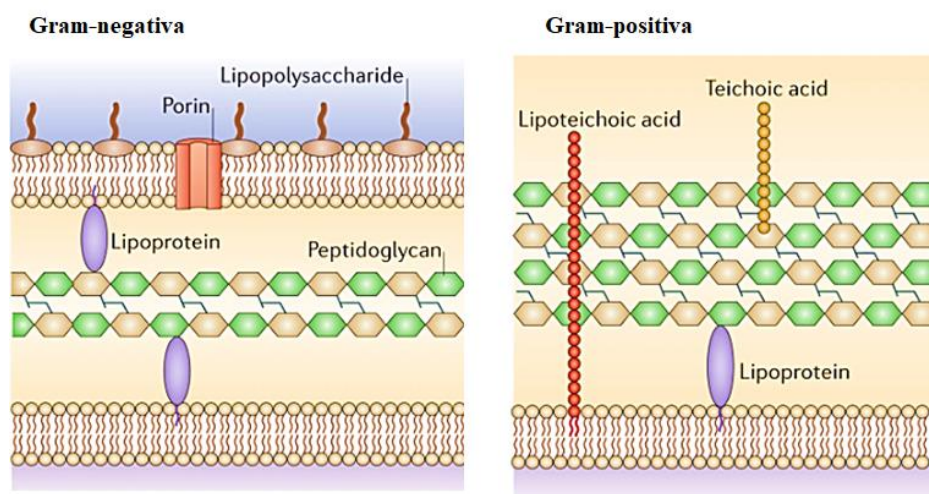
cátions e ácidos teicóicos de parede influenciam na rigidez e na porosidade da parede celular (MARQUIS et al. 1976; COLLINS et al. 2002).

Em cepas de *Staphylococcus aureus*, a composição de proteínas expressas de superfície pode mudar radicalmente dependendo das condições ambientais ou de crescimento, refletindo um papel importante da parede celular na adaptação ao meio (POLLACK e NEUHAUS, 1994).

Muitas dessas proteínas de superfície, chamadas adesinas estão ligadas por meio de interações iônicas não covalentes ao peptidoglicano ou ácidos teicóicos, outras estão ligadas covalentemente a peptídeos-tronco dentro das camadas de peptidoglicano (DRAMSI et al., 2008). As enzimas sortases que são as responsáveis por catalisar a reação de transpeptidação nos precursores do peptidoglicano, a qual ocorre em duas etapas.

A primeira etapa envolve um nucleófilo no sítio ativo da sortase que ataca a amida entre a treonina e a glicina assim produzindo intermediários covalentes, no qual o amino-terminal da proteína substrato é ligada na enzima. Na segunda etapa, o ramo de glicina do peptídeo-tronco entra no sítio ativo e o terminal amino nucleofílico do ramo de glicina ataca o intermediário acil-enzima, reintegrando a enzima e formando uma ligação modificada que é incorporada ao precursor peptidoglicano (DRAMSI et al., 2008; ARRAFFINI et al., 2006). Outra característica das bactérias Gram-positivas são os peptídeos de hastes ramificados que desempenham uma variedade de funções, atuando principalmente como sítio de ligação para proteínas ligadas covalentemente, o que influencia na resistência aos antibióticos β -lactâmicos (CHAMBERS 2003).

Figura 1. Estruturas da parede celular de espécies bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas



Fonte: BROWN et al., 2015.

1.2 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana é uma das principais barreiras para a antibioticoterapia, sendo um desafio para a saúde pública, mesmo vivendo na era de novas tecnologias e pesquisas, as doenças infecciosas sem tratamento são classificadas como as principais causas de morte no mundo (WHO, 2021). Em 2019 houve uma estimativa de 4,95 milhões de mortes associadas à resistência bacteriana, incluindo 1,27 milhão de mortes diretamente relacionadas às bactérias resistentes (KOULENTI et al., 2019; MÉLO SILVA et al., 2020).

O uso crescente de antibióticos pelos humanos e na produção animal são uma das maiores forças-motrizas para o surgimento de bactérias resistentes na comunidade em geral (WEGENER, 2003; UDIKOVIC-KOLIC et al., 2014; DE WAELE et al., 2018).

O aparecimento da resistência aos antibióticos é um processo de complexidade multifatorial (WATKINS & BONOMO, 2016). Geralmente as bactérias utilizam uma forma limitada para resistir aos antibióticos, englobando a inativação do mesmo por meio de ação enzimática, modificação no sítio de ligação do fármaco, alteração na permeabilidade celular, bem como as bombas de efluxo podem manter as concentrações de antibiótico abaixo das concentrações inibitórias e finalmente os genes plasmidiais de resistência adquiridos da transferência vertical ou horizontal (LEE et al., 2010; DAVIES et al., 2006; FAJARDO & MARTÍNEZ, 2008; AMINOV, 2009).

Nas bactérias Gram-negativas um dos principais mecanismos responsáveis pela resistência são as bombas de efluxo que bombeiam substâncias tóxicas como antibióticos, por meio das membranas celulares para o meio extracelular (KORONAKIS et al. 2000; ESWARAN et al. 2004; MURAKAMI et al. 2006; SYMMONS et al. 2009). O lipopolissacarídeo (LPS), está associado a liberação de endotóxico debilitando o sistema inato do indivíduo, já os fosfolipídios juntamente com LPS auxiliam como barreira física para resistência da espécie (RAETZ & WHITFIELD 2002; DELCOUR, 2009; BREUKINK & KRUIJFF, 2006; SILHAVY et al., 2010).

As porinas são outra barreira que dificulta a permeação de compostos antibacterianos pela membrana, pois envolve tamanho, polaridade e lipofilicidade dessas substâncias o que limita o número de antibióticos adequados para tratamento de infecções por bactérias Gram-negativa (ACOSTA-GUTIÉRREZ et al., 2018; BAJAJ et al., 2016).

Pseudomonas aeruginosa, uma bactéria Gram-negativa, é um organismo metabolicamente versátil, capaz de se adaptar e sobreviver em vários ambientes. Alguns estudos mostram que após múltiplas mutações houve a diminuição da permeabilidade da membrana e alteração da regulação das bombas de efluxo MICHALOPOULOS et al., 2005; KIPNIS et al., 2006; RUPPÉ et al., 2015).

Duas particularidades da *P. aeruginosa* que contribuem para sua alta taxa de mortalidade são seu fenótipo de resistência intrínseca ou adquirida e sua capacidade de formar biofilme o que dificulta a permeação de antibióticos em concentrações inibitórias, principalmente a resistência aos carbapenêmicos (CIOFU et al., 2015; RYBTKE et al., 2015).

As bactérias Gram-positivas utilizam alguns fatores de resistências, incluindo àqueles atrelados à degradação dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) por proteases, sendo um mecanismo encontrado em muitas espécies como: *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (SCHMIDTCHEN et al., 2002; SABAT et al., 2000; LAI et al., 2007). Essas proteases que degradam os AMPs são tipicamente encontradas em patógenos de mamíferos e incluem a metalopeptidases e proteases de cisteína, sendo secretadas por bactérias em seu meio extracelular circundante (SCHMIDTCHEN et al., 2002; HÄSE & FINKELSTEIN, 1993; DEL PAPA et al., 2007).

O isolamento dos AMPs é um adicional no mecanismo extracelular de resistência, em bactérias Gram-positivas. A produção de proteínas extracelulares ou ligadas a

superfícies se conectam aos AMPs e impedem o acesso a membrana celular, esse isolamento de AMPs é mediado por proteínas que variam de acordo com a cepa. Essa maquinaria é característica das espécies de *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Lactococcus lactis* (LAUTH et al., 2009; MAISEY et al., 2008; FRICK et al., 2003; FERNIE-KING et al., 2002; JIN et al., 2004). Tanto a parede celular e a membrana envolvem um alvo principal para atividade bactericida de AMPs, e as bactérias continuamente modificam as estruturas de superfície celular para combater os efeitos dos AMPs e assim reduzir a carga negativa na célula, alterando a fluidez da membrana ou mudando diretamente os alvos do AMP (POWERS & HANCOCK, 2003; ZASLOFF, 2002; WEIDENMAIER & PESCHEL, 2008; GOLDFINE, 1984).

Em espécies de *Staphylococcus* a resistência é determinada por mutações ou aquisição de genes, a resistência para β -lactâmicos (penicilinase) que veio pelo gene *mecA* (ALÓS, 2015; RODRÍGUEZ-NORIEGA et al., 2013; HIRAMATSU et al., 2001; DWEBBA et al., 2018). Nas espécies de *Enterococcus* as mutações cromossômicas para rifampicina foi no gene *rpoB*, para tetraciclinas ocorre na proteção ribossomal, os genes *tet* (M), *tet* (O), *tet* (S) e para trimetoprima, modificações no gene *dfr* e o gene adquirido *dfrF*, sendo para *Staphylococcus*. Em glicopeptídeos são os percussores de peptidoglicano contendo o *D*-alanil-*D*-lactato e os genes *vanA*, *vanB*, *vanD* e precursores de *D*-alanil-*D*-serina com genes *vanC*, *vanE* e *vanG* (LECLERCQ et al., 1988; WOODFORD, 2001; ENNE ET AL., 2004; COQUE et al., 1999; CHOPRA & ROBERTS, 2001).

De acordo com Sistema Global de Vigilância de Uso e Resistência Antimicrobiana – GLASS (2021), outros patógenos possuem alta prioridade, os quais causam infecções em humano são *Acinetobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *S. aureus* e *S. pneumoniae*, *Shigella spp.* e *Neisseria gonorrhoeae*.

No ano de 2020 dois patógenos de infecções por sepses entraram nessa lista, da família *Enterobacteriaceae*, primeiro *E. coli* resistente às cefalosporinas de terceira geração, mencionado por 60 países no ano de 2019 e segundo, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina reportado por 54 países, respectivamente (WHO, 2021; GAGLIOTTI et al., 2008; HUGUET et al., 2015). O índice de resistência média geral relatada para cefalosporinas de terceira geração foi de 40 a 50%, principalmente para infecções causada por *K. pneumoniae* e *E. coli* (WHO, 2021).

A média de resistência reportada para o cotrimoxazol usado para tratamento de infecções no trato urinário, foi de 54,4% para *E. coli* e de 43,1% para *K. pneumoniae*, já para resistência ao ciprofloxacino de 43,1% para *E.coli* e 36,4% para *K. pneumoniae* (WHO, 2021; GLASS, 2021). Resultados semelhantes foram encontrados para levofloxacina e fluoroquinolona (WHO, 2021; GLASS, 2021; GAGLIOTTI et al., 2008; HUGUET et al., 2015). As bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae* são microrganismos do microbioma do trato gastrointestinal, sendo também responsáveis por inúmeras patologias, entretanto a *K. pneumoniae* é responsável por um terço de todas infecções relacionadas as bactérias Gram-negativas em geral (PODSCHUN & ULLMANN 1998).

Por meio de mapeamento genético da bactéria multirresistentes *K. pneumoniae* (MDR) foram observados protótipo de 52 plasmídeos resistentes a antibióticos, como carbapenemases e β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) (KLIEBE et al., 1985; SIROT et al., 1987; NAVON-VENEZIA et al., 2003; CANTÓN et al., 2008).

O fator de mecanismo da *K. pneumoniae* que conferem resistência aos mais importantes antibióticos incluindo β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, tigeciclina e polimixinas, estão a associado a capacidade do microrganismo na codificação de enzimas, transferência de plasmídeo e mutações cromossômicas (BUSH & JACOBY, 2010; LIAKOPOULOS et al., 2016). Segundo estudos, alguns genes centrais reforçam essa resistência antimicrobiana e particularmente estão associadas na síntese de lipopolissacarídeo (LPS), bomba de efluxo ou permeabilidade da membrana, especificamente nas porinas externas (BERNARDINI et al., 2019; JANA et al., 2017; FAJARDO-LUBIÁN et al., 2019; WONG et al., 2019).

Portanto o surgimento de cepas resistentes aos fármacos atuais vem sendo um transtorno eminente, associado a alta ocorrência de coinfeção, por esse motivo, a mobilização por pesquisa de novas substâncias efetivas contra bactéria resistente é primordial, (PAI et al., 2016; O'NEILL, 2016).

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-GUTIÉRREZ, S., FERRARA, L., PATHANIA, M., MASI, M., WANG, J., BODRENKO, I., & CECCARELLI, M. Getting drugs into Gram-negative bacteria: rational rules for permeation through general porins. *ACS infectious diseases*, 4(10), 1487-1498 – 2018.
- ALÓS, J. I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, 33(10), 692-699 – 2015.
- AMINOV, R. I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Environmental microbiology**, 11(12), 2970-2988 – 2009.
- BAJAJ, H., SCORCIAPINO, M. A., MOYNIÉ, L., PAGE, M. G., NAISMITH, J. H., CECCARELLI, M., & WINTERHALTER, M. Molecular basis of filtering carbapenems by porins from β -lactam-resistant clinical strains of *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, 291(6), 2837-2847 – 2016.
- BAUER, B. W., SHEMESH, T., CHEN, Y., & RAPOPORT, T. A. A “push and slide” mechanism allows sequence-insensitive translocation of secretory proteins by the SecA ATPase. **Cell**, 157(6), 1416-1429 – 2014.
- BARCO, R.A., GARRITY, G.M., SCOTT, J.J., AMEND, J.P., NEALSON, K.H. E EMERSON, D. A genus definition for bacteria and archae based on a standard genome-wide ratio index. **MBio** 11 (1), e02475-19 – 2020.
- BEGG, K.J., & DONACHIE, W.D. Cell shape and division in *Escherichia coli*: experiments with shape and division mutants. **Journal of bacteriology**. 163 (2), 615-622 – 1985.
- BERG, B.V.D., CLEMONS, W.M., COLLINSON, I., MODIS, Y., HARTMANN, E., HARRISON, S.C., & RAPOPORT, T.A X-ray structure of a protein conducting channel. **Nature**, 427 36-44 – 2004.
- BERNARDINI, A., CUESTA, T., TOMÁS, A., BENGOCHEA, J. A., MARTÍNEZ, J. L., & SÁNCHEZ, M. B. The intrinsic resistome of *Klebsiella pneumoniae*. **International journal of antimicrobial agents**, 53(1), 29-33 – 2019.
- BUSH, K., & JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 54(3), 969-976 – 2010.
- BRAUN, M., & SILHAVY, T. J. Imp/OstA is required for cell envelope biogenesis in *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, 45(5), 1289-1302 – 2002.
- BREUKINK, E., & DE KRUIJFF, B. Lipid II as a target for antibiotics. **Nature reviews Drug discovery**, 5(4), 321-323 2006.
- BROWN, L.; WOLF, J. M.; PRADOS-ROSALES, R.; CASADEVALL, A. Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, *mycobacteria* and fungi. **Nature Reviews Microbiology** 16 set. 2015.
- CANTÓN, R., NOVAIS, A., VALVERDE, A., MACHADO, E., PEIXE, L., BAQUERO, F., & COQUE, T. M. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Clinical Microbiology and infection**, 14, 144-153 – 2008.
- CIOFU, O., TOLKER-NIELSEN, T., JENSEN, P. Ø., WANG, H., & HØIBY, N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. **Advanced drug delivery reviews**, 85, 7-23 – 2015.
- COLLINS, L. V., KRISTIAN, S. A., WEIDENMAIER, C., FAIGLE, M., VAN KESSEL, K. P., VAN STRIJP, J. A., ... & PESCHEL, A. *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of

teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *The Journal of infectious diseases*, 186(2), 214-219 – 2002.

COQUE, T. M., SINGH, K. V., WEINSTOCK, G. M., & MURRAY, B. E. Characterization of dihydrofolate reductase genes from trimethoprim-susceptible and trimethoprim-resistant strains of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(1), 141-147 – 1999.

COWAN, S.W., SCHIRMER, T., RUMMEL, G., STEIERT, M., GHOSH, R., PAUPTIT, R.A., JANSONIUS, J.N., ROSENBUSCH, J.P. Crystal structures explain the functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358: 727 – 733 – 1992.

CHAMBERS, H. F. Solving staphylococcal resistance to beta-lactams. *Trends in Microbiol* 11: 145–148 – 2003.

CHOPRA, I., & ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(2), 232-260 – 2001.

DAVIES, J., SPIEGELMAN, G. B., & YIM, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current opinion in microbiology*, 9(5), 445-453 – 2006.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1794(5), 808-816 – 2009.

DE WAELE, J. J., AKOVA, M., ANTONELLI, M., CANTON, R., CARLET, J., DE BACKER, D., & BASSETTI, M. Antimicrobial resistance and antibiotic stewardship programs in the ICU: insistence and persistence in the fight against resistance. A position statement from ESICM/ESCMID/WAAAR round table on multi-drug resistance. *Intensive care medicine*, 44(2), 189-196 – 2018.

DELPAPA, M. F., HANCOCK, L. E., THOMAS, V. C., & PEREGO, M. Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *Journal of bacteriology*, 189(24), 8835-8843 – 2007.

DEWHIRST, F.E., FOX, J.G., & ON, S.L. Padrões mínimos recomendados para descrever novas espécies do gênero *Helicobacter*. *Revista Internacional de Microbiologia Sistemática e Evolutiva*, 50 (6), 2231-2237 – 2000.

DRAMSI S , MAGNET S , DAVISON S , ARTHUR M. Covalent binding of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiol Rev* 32: 307 – 320 – 2008.

DRIESSEN AJ , NOUWEN N. Translocation of proteins across the bacterial cytoplasmic membrane *Rev Biochem* 77 : 643-667 – 2008.

DWEBBA, C. C., ZISHIRI, O. T., & EL ZOWALATY, M. E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: livestock-associated, antimicrobial, and heavy metal resistance. *Infection and Drug Resistance*, 11, 2497 – 2018.

ENNE, V. I., DELSOL, A. A., ROE, J. M., & BENNETT, P. M. Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 203-207 – 2004.

ESWARAN, J., KORONAKIS, E., HIGGINS, M. K., HUGHES, C., & KORONAKIS, V. Three is company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Current opinion in structural. biology*, 14(6), 741-747 – 2004.

FAJARDO, A., & MARTÍNEZ, J. L. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current opinion in microbiology*, 11(2), 161-167 – 2008.

- FAJARDO-LUBIÁN, A., BEN ZAKOUR, N. L., AGYEKUM, A., QI, Q., & IREDELL, J. R. Host adaptation and convergent evolution increases antibiotic resistance without loss of virulence in a major human pathogen. **PLoS pathogens**, 15(3), e1007218 – 2019.
- FERNIE-KING, B. A., SEILLY, D. J., DAVIES, A., & LACHMANN, P. J. Streptococcal inhibitor of complement inhibits two additional components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor and lysozyme. **Infection and Immunity**, 70(9), 4908-4916 – 2002.
- FRICK, I. M., ÅKESSON, P., RASMUSSEN, M., SCHMIDTCHEN, A., & BJÖRCK, L. SIC, a Secreted Protein of Streptococcus pyogenes that Inactivates Antibacterial Peptides. **Journal of Biological Chemistry**, 278(19), 16561-16566 – 2003.
- GAGLIOTTI, C., BUTTAZZI, R., SFORZA, S., MORO, M. L., & EMILIA-ROMAGNA. Antibiotic Resistance Study Group. Resistance to fluoroquinolones and treatment failure/short-term relapse of community-acquired urinary tract infections caused by Escherichia coli. **Journal of Infection**, 57(3), 179-184 – 2008.
- GOLDFINE, H. Bacterial membranes and lipid packing theory. **Journal of lipid research**, 25(13), 1501-1507 – 1984.
- GOURIDIS, G., KARAMANOU, S., SARDIS, M. F., SCHÄRER, M. A., CAPITANI, G., & ECONOMOU, A. Quaternary dynamics of the SecA motor drive translocase catalysis. **Molecular cell**, 52(5), 655-666 – 2013.
- GLASS - Global Antimicrobial Resistance Surveillance System - GLASS 2021. Disponível em: <https://www.who.int/initiatives/glass> acessado em Maio 2022.
- GRAM, C. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt-und Trockenpräparaten. **Fortschritte der Medicin**, 2, 185-189 – 1884.
- GRONOW, S., & BRADE, H. Invited review: Lipopolysaccharide biosynthesis: which steps do bacteria need to survive. **Journal of Endotoxin Research**, 7(1), 3-23 – 2001.
- HATAHET, F., BOYD, D., & BECKWITH, J. Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1844(8), 1402-1414 – 2014.
- HÄSE, C. C., & FINKELSTEIN, R. A. Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. **Microbiological reviews**, 57(4), 823-837 – 1993.
- HEDLUND, B. P., GOSINK, J. J., & STALEY, J. T. Phylogeny of Prosthecobacter, the fusiform caulobacters: members of a recently discovered division of the Bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 46(4), 960-966 – 1996.
- HIRAMATSU, K., CUI, L., KURODA, M., & ITO, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Trends in microbiology**, 9(10), 486-493 – 2001.
- HUGUET, A., PENSEC, J., & SOUMET, C. Resistance in Escherichia coli: variable contribution of efflux pumps with respect to different fluoroquinolones. **Journal of applied microbiology**, 114(5), 1294-1299 – 2013.
- JANA, B., CAIN, A. K., DOERRLER, W. T., BOINETT, C. J., FOOKES, M. C., PARKHILL, J., & GUARDABASSI, L. The secondary resistome of multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae. *Scientific reports*, 7(1), 1-10 – 2017.
- JIN, T., BOKAREWA, M., FOSTER, T., MITCHELL, J., HIGGINS, J., & TARKOWSKI, A. Staphylococcus aureus resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. **The Journal of Immunology**, 172(2), 1169-1176 – 2004.

- KADOKURA, H., & BECKWITH, J. Mechanisms of oxidative protein folding in the bacterial cell envelope. **Antioxidants & redox signaling**, 13(8), 1231-1246 – 2010.
- KIPNIS, E., SAWA, T., & WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Medecine et maladies infectieuses**, 36(2), 78-91 – 2006.
- KOULENTI, D., XU, E., SONG, A., SUM MOK, I. Y., KARAGEORGOPOULOS, D. E., ARMAGANIDIS, A., & LIPMAN, J. Emerging treatment options for infections by multidrug-resistant gram-positive microorganisms. **Microorganisms**, 8(2), 191 – 2020.
- KORONAKIS, V., SHARFF, A., KORONAKIS, E., LUISI, B., & HUGHES, C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. **Nature**, 405(6789), 914-919 – 2000.
- KLEMM, P., & CHRISTIANSEN, G. The fim D gene required for cell surface localization of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. **Molecular and General Genetics** MGG, 220(2), 334-338 – 1990.
- KLIEBE, C., NIES, B. A., MEYER, J. F., TOLXDORFF-NEUTZLING, R. M., & WIEDEMANN, B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 28(2), 302-307 – 1985.
- LAI, Y., VILLARUZ, A. E., LI, M., CHA, D. J., STURDEVANT, D. E., & OTTO, M. The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. **Molecular microbiology**, 63(2), 497-506 2007.
- LAUTH, X., VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M., MCNAMARA, C. W., MYSKOWSKI, S., ZINKERNAGEL, A. S., BEALL, B., & NIZET, V. M1 protein allows Group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. **Journal of innate immunity**, 1(3), 202-214 – 2009.
- LEE, H. H., MOLLA, M. N., CANTOR, C. R., & COLLINS, J. J. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. **Nature**, 467(7311), 82-85 – 2010.
- LECLERCQ, R., DERLOT, E., DUVAL, J., & COURVALIN, P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **New England Journal of Medicine**, 319(3), 157-161 – 1988.
- LIAKOPOULOS, A., MEVIUS, D., & CECCARELLI, D. A review of SHV extended-spectrum β -lactamases: neglected yet ubiquitous. **Frontiers in microbiology**, 7, 1374 – 2016.
- MAISEY, H. C., QUACH, D., HENSLEY, M. E., LIU, G. Y., GALLO, R. L., NIZET, V., & DORAN, K. S. A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. **The FASEB Journal**, 22(6), 1715-1724 – 2008.
- MAKI, N., GESTWICKI, J. E., LAKE, E. M., KIESSLING, L. L., & ADLER, J. Motility and chemotaxis of filamentous cells of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, 182(15), 4337-434 – 2000.
- MARRAFFINI, L. A., DEDENT, A. C., SCHNEEWIND, O. Sortases e a arte de ancorar proteínas aos envelopes de bactérias gram-positivas . **Microbiol Molec Biol Rev** 70: 192 – 221 – 2006.
- MATSUYAMA, S. L., TAJIMA, T., & TOKUDA, H. A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. **The EMBO journal**, 14(14), 3365-3372 – 1995.
- MÉLO SILVA, I. S., DO AMORIM COSTA GASPAR, L. M., ROCHA, A. M. O., DA COSTA, L. P., TADA, D. B., FRANCESCHI, E., & PADILHA, F. F. Encapsulation of red propolis in polymer nanoparticles for the destruction of pathogenic biofilms. **Aaps Pharmscitech**, 21(2), 1-9 – 2020.

- MICHALOPOULOS, A. S., TSIDRAS, S., RELLOS, K., MENTZELOPOULOS, S., & FALAGAS, M. E. Colistin treatment in patients with ICU-acquired infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria: the renaissance of an old antibiotic. **Clinical microbiology and infection**, 11(2), 115-121 - 2005.
- MULLINEAUX, C.W., NENNINGER, A., RAY, N., ROBINSON, C. Difusão de proteína verde fluorescente em três ambientes celulares em *Escherichia coli*. **J Bacteriol** 188: 3442 – 3448 – 2006.
- MURAKAMI, S., NAKASHIMA, R., YAMASHITA, E., MATSUMOTO, T., & YAMAGUCHI, A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. **Nature**, 443(7108), 173-179 – 2006.
- NAVON-VENEZIA, S., HAMMER-MUNZ, O., SCHWARTZ, D., TURNER, D., KUZMENKO, B., & CARMELI, Y. Occurrence and phenotypic characteristics of extended-spectrum β -lactamases among members of the family Enterobacteriaceae at the Tel-Aviv Medical Center (Israel) and evaluation of diagnostic tests. **Journal of clinical microbiology**, 41(1), 155-158 – 2003.
- NEUHAUS F. A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria. **Micro Molec Biol Rev** 67: 686–723 – 2003.
- O'NEILL, J. Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations** – 2016.
- PODSCHUN, R., & ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical microbiology reviews**, 11(4), 589-603 – 1998.
- POINDEXTER, J.S. As caulobacters: bactérias incomuns onipresentes. **Rev. microbiológicas**, 45 (1), 123-179 – 1981.
- POLLACK J. H., NEUHAUS F. C. Alterações no ácido teicóico da parede durante a transição bastonete-esfera de *Bacillus subtilis* 168. **J Bacteriol** 176: 7252 – 7259 – 1994.
- POWERS, J. P. S., & HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, 24(11), 1681-1691 – 2003.
- RAETZ, C. R., & WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual review of biochemistry**, 71(1), 635-700 – 2002.
- RODRÍGUEZ-NORIEGA, E., LEÓN-GARNICA, G., PETERSEN-MORFÍN, S., PÉREZ-GÓMEZ, H. R., GONZÁLEZ-DÍAZ, E., & MORFÍN-OTERO, R. L.A. evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. **Biomédica**, 34, 181-190 – 2014.
- RUPPÉ, E., WOERTHER, P. L., & BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of intensive care**, 5(1), 1-15 - 2015.
- RYBTKE, M., HULTQVIST, L. D., GIVSKOV, M., & TOLKER-NIELSEN, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. **Journal of molecular biology**, 427(23), 3628-3645 – 2015.
- SABAT, A., KOSOWSKA, K., POULSEN, K., KASPROWICZ, A., SEKOWSKA, A., VAN DEN BURG, B., & POTEPA, J. Two allelic forms of the aureolysin gene (*aur*) within *Staphylococcus aureus*. **Infection and immunity**, 68(2), 973-976 – 2000.
- SANGANNA GARI, R. R., CHATTRAKUN, K., MARSH, B. P., MAO, C., CHADA, N., RANDALL, L. L., & KING, G. M. Direct visualization of the *E. coli* Sec translocase engaging precursor proteins in lipid bilayers. **Science advances**, 5(6), eaav9404 – 2019.

SAMPSON, B. A., MISRA, R., & BENSON, S. A. Identification and characterization of a new gene of *Escherichia coli* K-12 involved in outer membrane permeability. **Genetics** 122(3), 491-501 – 1989.

SIMÕES, C. B. Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria with decreased susceptibility to carbapenems: laboratory characterization - Doctoral dissertation – 2013.

SILHAVY, T. J., KAHNE, D., & WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 2(5), a000414 – 2010.

SIROT, D., SIROT, J., LABIA, R., MORAND, A., COURVALIN, P., DARFEUILLE-MICHAUD, A., ... & CLUZEL, R. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 20(3), 323-334 – 1987.

SCOTT J. R. , BARNETT T.C. Proteínas de superfície de bactérias Gram-positivas e como elas chegam lá . **Ann Rev Microbiol** 60: 397 – 423 – 2006.

SCHLEIFER, K. H. KANDLER O., Tipos de peptidoglicanos de paredes celulares bacterianos e suas implicações taxonômicas, **Bacteriol. Rev.**36,143–187 – 1972.

SCHMIDTCHEN, A., FRICK, I. M., ANDERSSON, E., TAPPER, H., & BJÖRCK, L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. **Molecular microbiology**, 46(1), 157-168 – 2002.

SNIJDER H. J., UBARETXENA- BELANDIA I., BLAAUW M., KALK K.H., VERHEIJ H.M., EGMOND M.R., DEKKER N., DIJKSTRA B. W. Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. **Nature** 401: 717 – 721 – 1999.

STACKEBRANDT, E., & WOESE, C. R. A phylogenetic dissection of the family Micrococcaceae. **Current Microbiology**, 2(6), 317-322 – 1979.

SYMMONS, M. F., BOKMA, E., KORONAKIS, E., HUGHES, C., & KORONAKIS, V. The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106(17), 7173-7178 – 2009.

TAMAMES, J., GONZÁLEZ-MORENO, M., MINGORANCE, J., VALENCIA, A., & VICENTE, M. Bringing gene order into bacterial shape. **Trends in Genetics**, 17(3), 124-126 – 2001.

TAN, J. T., & BARDWELL, J. C. Key Players Involved in Bacterial Disulfide-Bond Formation. **Chembiochem**, 5(11), 1479-1487 – 2004.

TANAKA, K., MATSUYAMA, S. I., & TOKUDA, H. Deletion of *lolB*, encoding an outer membrane lipoprotein, is lethal for *Escherichia coli* and causes accumulation of lipoprotein localization intermediates in the periplasm. **Journal of Bacteriology**, 183(22), 6538-6542 – 2001.

THANASSI, D. G., SAULINO, E. T., & HULTGREN, S. J. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. **Current opinion in microbiology**, 1(2), 223-231 – 1998.

UDI KOVIC-KOLIC, N., WICHMANN, F., BRODERICK, N. A., & HANDELSMAN, J. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 111(42), 15202-15207 – 2014.

VAN DAMME P., PANELA B., GILLIS M., DE VOS P., BALANÇOS J., Taxonomia polifásica, uma abordagem de consenso para sistemática bacteriana, **Microbiol. Rev.**60,407–438 – 1996.

VOLLMER W., BLANOT D., DE PEDRO M. A. Estrutura e arquitetura do peptidoglicano. **FEMS Microbiol Rev** 32: 149 – 167 – 2008.

- WATKINS, R. R., & BONOMO, R. A. Overview: global and local impact of antibiotic resistance. **Infectious Disease Clinics**, 30(2), 313-322 - 2016.
- WEGENER, H. C. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. **Current opinion in microbiology**, 6(5), 439-445 – 2003.
- WEIDENMAIER, C., & PESCHEL, A. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, 6(4), 276-287 – 2008.
- WHITAKER, R. H. Novos Conceitos de Reinos de Organismos: As relações evolutivas são melhor representadas por novas classificações do que pelos dois reinos tradicionais. **Science**, 163 (3863), 150-160 - 1969.
- WOODFORD, N. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. **Microbial Drug Resistance**, 7(3), 229-236 – 2001.
- WOESE, C. R., BLANZ, P., HESPELL, R. B., & HAHN, C. M. Phylogenetic relationships among various helical bacteria. **Current Microbiology**, 7(2), 119-124 – 1982.
- WOESE, C. R., KANDLER, O., & WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 87(12), 4576-4579 – 1990.
- WONG, J. L., ROMANO, M., KERRY, L. E., KWONG, H. S., LOW, W. W., BRETT, S. J., & FRANKEL, G. mpk36-mediated carbapenem resistance attenuates ST258 *Klebsiella pneumoniae* in vivo. **Nature communications**, 10(1), 1-10 – 2019.
- WHO - The World health statistics report is the World Health Organization - 2021 Acesso disponível: www.who.int/data/gho/publications/world-health-statistics acessado em maio de 2022.
- YOUNG, J., & DUONG, F. Investigating the stability of the SecA–SecYEG complex during protein translocation across the bacterial membrane. **Journal of Biological Chemistry**, 294(10), 3577-3587 – 2019.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *nature*, 415(6870), 389-395 – 2002.

Capítulo II

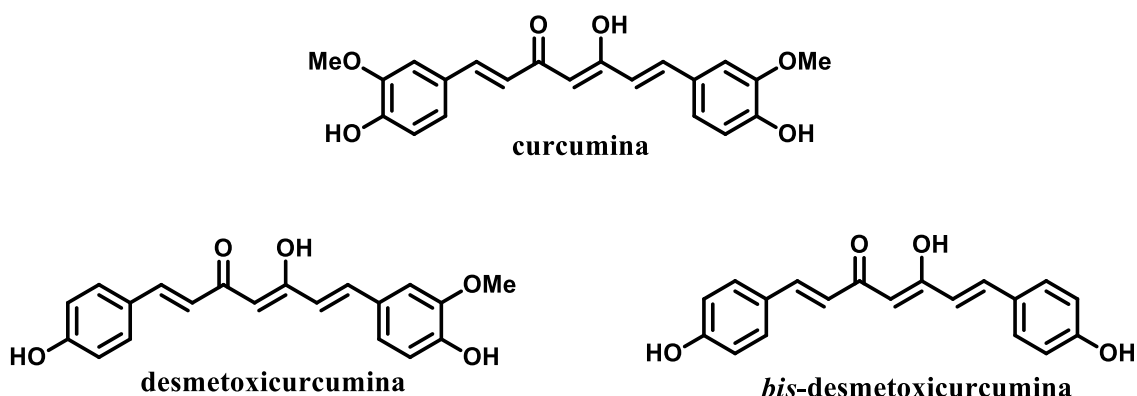
1. INTRODUÇÃO

1.1 Ação Antimicrobiana da Curcumina e Curcuminoides

Os estudos de produtos naturais e seus derivados têm permitido ao longo tempo inúmeras descobertas de novos fármacos e substância bioativas (BERNARDINI et al., 2018; THOMFORD et al., 2018).

Curcuma longa é uma planta da família Zingiberaceae, popularmente denominada como "cúrcuma" ou "açafrão-da-terra", sendo bastante utilizada para fins culinários e medicinais. Nos rizomas de *C. longa* são acumuladas três substâncias majoritárias: curcumina (60%), desmetoxicurcumina (22%) e bis-desmetoxicurcumina (18%) (Figura 1), sendo responsáveis pela coloração amarela intensa (VAUGHN et al., 2016; MAJEED et al., 1996).

Figura 1. Substâncias Majoritárias dos Rizomas de *Curcuma longa*



Ao longo do tempo, a cúrcuma tem sido utilizada como fonte medicinal e fins culinário em alguns países da Ásia. Com isso, a curcumina (substância mais ativa da cúrcuma), tem sido investigada por suas características terapêuticas, com um número considerável de publicação na literatura no quais atestam seu potencial farmacológico seja natural ou sintético, como atividade antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e antimicrobiana (antiprotozoária, anti-helmíntica, antibacteriana e antifúngica) (ARAÚJO; LEON, 2001; KRAUSZ et al., 2015; VALLIANOU et al., 2015).

A curcumina exibe amplo espectro de atividade antibacteriana, demonstrando ação tanto contra espécies Gram-positivas: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, como Gram-negativas:

Escherichia coli, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella entérica sorovar Typhi*, *Vibrio cholerae* e *Yersinia enterocolitica* (DE et al., 2009; SELVAKUMAR e VENKATARAMAN, 2010).

Contudo, a curcumina, apresenta baixa hidrossolubilidade, biodisponibilidade e instabilidade química, o que tem limitado sua aplicação terapêutica. Portanto, o planejamento de análogos pode contornar esses desafios, culminando na obtenção de curcuminoides com melhores propriedades físico-químicas e farmacológicas (WANG et al., 1997; ANAND et al., 2007; KHARAT et al., 2017).

Alguns estudos demonstram que essa instabilidade é referente, principalmente, à subunidade β -dicêtonica (HEGER et al., 2014; HAMPANNAVAR et al., 2016). Entre as várias táticas da química medicinal, a simplificação molecular pode conduzir a análogos mais ativos e menos tóxicos, permitindo a descoberta de contribuições farmacofóricas das funcionalidades estruturais, bem como maior acessibilidade sintética por meio de rotas sintéticas mais concisas (MIGUELEZ et al., 2013; BARREIRO 2002; MOSLEY et al., 2007).

Nesse contexto, vários pesquisadores vêm alterando a estrutura da curcumina com a obtenção de análogos sintéticos ou semissintéticos com atividade antimicrobiana potente (MOSLEY et al., 2007).

Em estudo realizado por Morão e colaboradores (2019) foram testados a curcumina e seus análogos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Contra *E. coli* (ATCC25922) a curcumina apresentou uma CIM de 65 $\mu\text{g/mL}$, enquanto os análogos valores de CIM de <10 a 38 $\mu\text{g/mL}$, contra *S. aureus* (ATCC25923) a curcumina obteve uma CIM de 95 $\mu\text{g/mL}$, enquanto seus análogos valores de CIM de entre 21 a < 10 $\mu\text{g/mL}$.

Contra bactéria *E. faecalis* (ATCC29212) uma CIM de 52 $\mu\text{g/mL}$ para curcumina e seus curcuminoides com valores de <10 a 78 $\mu\text{g/mL}$, comprovando a importância da simplificação molecular para o aumento da potência antimicrobiana (MORÃO et al., 2019).

Nesse mesmo trabalho a bactéria *B. subtilis* (cepa 168) foi exposta a curcumina e um análogo simplificado onde mostrou uma perturbação considerável na integridade da membrana bacteriana, agindo na divisão celular, diretamente na proteína FtsZ e no aumento da atividade da GTPase (MORÃO et. al., 2019; ZHENG et al., 2020).

Em um outro estudo feito por Polaquini e colaboradores (2019), a espécie *B. subtilis* (cepa 168) foi submetida ao composto 3,3'-dihidroxicurcumina (DHC) por período de 15 e 30 minutos, no qual mostrou danos de 72% e 85% na permeabilidade da membrana, corroborando a eficiência dos derivados da curcumina.

Em comparação com o composto 4,4'-dimetoxicurcumina, foi observada uma ação inativa em contraposto ao 3,3'-dihidroxicurcumina (DHC) demonstrou atividade mais potente que a curcumina contra *E. faecalis* e *M. tuberculosis* com valores de CIM de 78 e 156 µg/mL, respectivamente (POLAQUINI et. al., 2019).

A diacetilcurcumina (DAC) outro análogo originado da curcumina apresentou resultados contra as cepas *S. aureus* suscetível à meticilina (ATCC 25923) - MSSA com uma CIM de 17,3 µg/mL e *S. aureus* resistente à meticilina (ATCC 33591) - MRSA com um CIM de 34,6 µg/mL (SARDI et. al. 2017).

Outro efeito desse composto foi a capacidade de repressão a formação de biofilme e a subsequência de biofilmes pré-formados em concentrações 10 x CIM e 100 x CIM (SARDI et. al. 2017).

Nos patógenos *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* os quais provocam infecções do trato urinário em humanos, a curcumina conseguiu reduzir ou deixar menos densa a estrutura do biofilme (PACKIAVATHY et al., 2014). Sugerindo que a curcumina desempenha papéis inibitórios em relação à sinalização do gene ativador *Quorum Sensing* e atua como efeito bacteriostático, reduzindo a massa do biofilme (LEE et al., 2021).

A curcumina e seu derivado a diacetilcurcumina tiveram seus efeitos avaliados em terapia fotodinâmica contra biofilme provocado por *S. mutans* (ATCC 700610) no qual demonstrou reduções consideráveis ao mecanismo de biofilme com valores de (8,7 log₁₀) para diacetilcurcumina e para curcumina (8,9 log₁₀) (SANCHES et al., 2017).

Theodoro e colaboradores (2017) similarmente testaram a curcumina contra *S. mutans* que está associada a casos clínicos como doenças periodontais, cáries e complicações a implantes dentários por placa bacteriana.

Em uma pesquisa realizada em camundongos com periodontite, foi observado que o uso da curcumina juntamente, com estímulo fotodinâmico promoveu uma redução no processo inflamatório e controle da perda óssea, o que apoia o potencial de uso clínico da curcumina (WANG et al., 2020; MOGHADAMTOUSI et al., 2014).

Em relação *H. pylori*, responsável por provocar inflamação no estômago humano, uma pesquisa demonstrou a eficácia da utilização da curcumina de forma natural para o tratamento contra *H. pylori* no estômago de camundongos infectados (DE et al., 2009; CROWE, 2019). Portanto a literatura demonstra uma variedade de competências da curcumina e seus análogos, com mecanismos de ação na célula microbiana, como: alteração da permeabilidade, polaridade e ruptura da membrana celular, desordem na interação de proteínas ou enzimas e interrupção da síntese proteica (TYAGI et al., 2015; TAJBAKHSH et al., 2008; RAI et al., 2008).

A curcumina surgiu como uma nova e eficaz alternativa no combate à virulência e resistência do *M. abscessus* aos antibióticos, com uma CIM de 128 µg/mL e atividade sinérgica com amicacina, ciprofloxacina, claritromicina e linezolida. Além disso, reduziu a motilidade do *M. abscessus* em 1/8 da CIM (MARINI et al., 2018). Singh e colaboradores (2017) estudou a ação da curcumina em outra espécie de micobactéria, no qual exibiu um CIM de 16 µg/mL para cepas de *M. tuberculosis* H37Rv.

1.2 Mecanismo antibacteriano da curcumina

Vários pesquisadores ao longo dos anos vem conduzindo elucidações sobre os mecanismos antibacterianos da curcumina. Estudos apontaram que a curcumina possuía melhor ação contra bactérias Gram-positivas por decorrência das várias camadas de peptideoglicano, hoje a diferença entre a estrutura celular e a composição das Gram-positivas e Gram-negativas causam variação em suas atividades, mais não o impedimento de ação da curcumina (GAYANI et al., 2019; ŁOPUSIEWICZ et al., 2021). Tyagi e colaboradores (2015) confirmaram a natureza antimicrobiana de amplo espectro da curcumina e sua capacidade de danificar a membrana. Contudo as Gram-positivas continua a ter maior sensibilidade a curcumina, porém a suscetibilidade vai de acordo com a estrutura celular bacteriana (RAJAGOPAL et al., 2017; GAYANI et al., 2019).

De fato, as Gram-negativas possuem componentes que conferem resistência a curcumina, como lipopolissacarídeo (LPS), esse apêndice na membrana externa protege como uma barreira de permeabilidade controlando a entrada e saída de várias substâncias, como: Íons, nutrientes e toxinas. Por este motivo as Gram-negativas demonstram maior

resistência aos agentes antimicrobianos do que as bactérias Gram-positivas (MUN et al., 2014; RAJAGOPAL et al. 2017; KOKOULIN et al., 2020).

A curcumina sendo uma molécula anfipática e lipofílica, ela se insere em bicamadas de lipossomas e aumenta sua permeabilidade da membrana, além disso, principalmente na desordem das membranas de 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC) inserindo afundo chegando a transbicamada e induzindo processos de fusão exocitótica (VARSHNEY et al, 2013; BARRY et al., 2009).

Estudos revelam que a curcumina pode se auto-oxidar, criando uma variedade de intermediários, incluindo radicais livres e intermediários eletrófilos, inibindo a proliferação bacteriana, danificando o DNA e proteínas necessárias para o seu crescimento (GAYANI et al., 2019).

Tyagi e coautores (2015) realizaram o ensaio de permeabilidade de membrana com a curcumina, contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus* (ATCC29213), *E. faecalis* (ATCC29212) e Gram-negativas *E. coli* (ATCC25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 25619) com concentrações de 25 µM, 50 µM e 100 µM por período de 30, 60 e 120 minutos e concluíram que a curcumina tem ação eficaz contra todos os gêneros testados. Além disso, a curcumina tem a habilidade de juntar-se com o peptidoglicano rompendo a integridade da membrana bacteriana, levando à lise celular (DURACKA et al., 2019; TAJBAKHSI et al., 2008).

A curcumina atua também de forma significativa nos níveis de proteína fixadora de penicilina PBP2a codificada pelo gene *mecA*, um dos fatores responsável pela resistência de *S. aureus* a antibióticos β-lactâmicos, também tem efeito contra a enzima sortase A, interferindo na adesão e formação do biofilme de *S. aureus* resistente à meticilina e *S. mutans* (ZHENG et al., 2020; CUSSOLIM, JUNIOR, 2021; MUN et al., 2014).

As bactérias como forma de sobrevivência possuem uma resposta de SOS quando o DNA é danificado por algum fator mecânico, rapidamente esse dano é identificado e o DNA é reparado, considerando que a resposta SOS contribui para resistência celular, sendo mecanismo de proteção bacteriana (RECACHA et al., 2019; RUDRAPPA et al., 2008).

A proteína RecA é dependente de ATP e desempenha um papel no reparo e recombinação do DNA, na resposta SOS, transferência horizontal de genes,

movimentação e formação de biofilme (COSTA et al., 2014; GÓMEZ-GÓMEZ et al., 2007; STRUGEON et al., 2016). A RecA pode ativar a resposta SOS e iniciar a autoclivagem dos inibidores LexA que omitir a resposta SOS (BAHAROGLU et al., 2014). Em estudos mostram que a curcumina inibiu o processo de ativação do sistema SOS não permitindo a regeneração do DNA danificado, atuando diretamente no RecA levando a bactéria *E. coli* á ruptura celular (YUN; LEE, 2016; JENKINS et al., 2014; BELLIO et al., 2014; GÓMEZ-GÓMEZ et al., 2007).

Wang e colaboradores (2016) trataram com curcumina, camundongos com pneumonia causada por MSSA e MRSA e observaram que a curcumina foi capaz de prevenir a formação da α -hemolisina (toxina alfa), um fator de virulência das cepas *S. aureus* no processo patológico.

Estudos demonstraram que a infecção por *H. pylori* induz a secreção de metaloproteinase matriz (MMPs) de uma variedade de células gástricas, que por sua vez contribuem para a patogênese de úlcera e câncer gástrico. Nesse contexto, derivados de curcumina interage com MMPs tendo efeito benéfico na patogênese gástrica induzida por *H. pylori* (GUPTA et al., 2011).

Um estudo feito por Rai e colaboradores (2008) sugere que o mecanismo de ação da curcumina é no processo de inibição da dinâmica de montagem de FtsZ, impedindo a divisão celular, como também discutido no trabalho de Morão e colaboradores sobre os efeitos da curcumina e seus análogos contra *B. subtilis*.

A atividade antibacteriana da curcumina é fundamentado na interferência da montagem da proteína FtsZ (alça Z), resultando no bloqueio da divisão celular associando-se aos microtúbulos interrompendo o RNA, consequentemente a síntese de proteínas (RAI et al., 2008). A proteína Z (FtsZ) é um homólogo procariótico da proteína tubulina que polimeriza em células intermediárias para formação do citoesqueleto eucariótico e coordena a divisão celular e a citocinese das bactérias, resultando no bloqueio da proliferação bacteriana (RAI et al., 2008).

Um mecanismo desafiador das batérias é a formação de biofilme no qual aumenta a resistência do sistema imunológico do hospedeiro aos antibacterianos, sendo um obstáculo ao tratamento clínico (SHARMA et al., 2014). As células bacterianas do biofilme tem um metabolismo baixo, portanto crescimento lento, tornando mais resistentes aos fármacos (HAWVER et al., 2016; ZHANG et al., 2019). Composto por

vários polímeros, enzimas, sais minerais, exopolissacarídeos, DNA e proteínas formando uma matriz polissacarídica extracelular tornando as bactérias em biofilmes bem protegidas (SHARMA et al., 2014; HAWVER et al., 2016; ZHANG et al., 2019; ŁOPUSIEWICZ et al., 2021).

Pesquisas mostram que a curcumina e seus análogos atua no sistema do gene ativador *Quorum Sensing* (QS) bacteriano tanto em biofilmes formado por Gram-positivas e Gram-negativas reduzindo a massa formada (PACKIAVATHY et al., 2014; HAWVER et al., 2016; SANCHES et al., 2017; THEODORO et al., 2017; ŁOPUSIEWICZ et al., 2021; LEE et al., 2021).

O *Quorum Sensing* possui três sistemas principais, o sistema QS acilhomoserina lactona (AHL) em bactérias Gram-negativas; o sistema QS de peptídeo autoindutor (AIP) em bactérias Gram-positivas e o sistema QS autoindutor-2 (AI-2), que está em ambos procariotos (BRACKMAN; COENYE, 2015).

O QS é um processo de comunicação entre células bacterianas por meio da sinalização da molécula auto indutor no qual monitora a densidade celular e a complexidade das espécies em uma população (HAWVER et al., 2016). O mecanismo de ação da curcumina é a interação com vários alvos moleculares e vias de transdução por meio de uma estratégia de infecção multi-mecânica, semelhante aos mecanismos de muitos antibióticos (KRAUSZ et al., 2015; SELVAM et al., 2019).

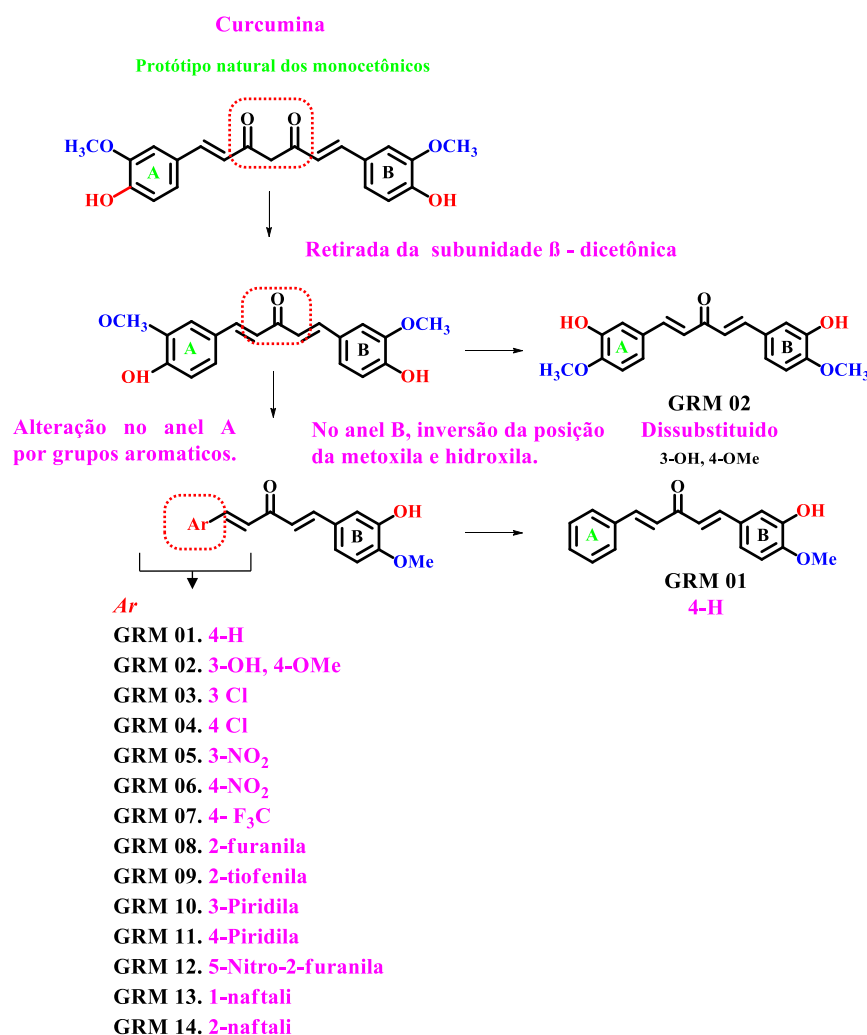
Como abordado anteriormente no trabalho de Gayani e colaboradores (2019) sobre o poder da curcumina se auto-oxidar, curiosamente sugere-se que essa oxidação pode inibir a formação de biofilme. Contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis*, a curcumina produz lactato desidrogenase (LDH), esse complexo exibiu atividades antibacteriana e antibiofilme (GAYANI et al., 2019).

2. PLANEJAMENTO MOLECULAR

Com fundamentos nos resultados obtidos em trabalhos anteriores no Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ) foi estruturado o planejamento molecular da série de curcuminoides monocetônicos. No trabalho de Ayusso e colaboradores (2019) (dados não publicados) foi observado que grupos de anéis aromáticos corroboram a bioatividade dos curcuminoides contra *M. tuberculosis* e no trabalho reportado por Morão e colaboradores (2019) o curcuminóide dissustituído (4-OH, 3-OMe) exibiu atividade para

bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Dentro disso, o planejamento molecular da série de compostos foi estabelecido com a simplificação molecular da curcumina com a retirada da subunidade β -dicetônica, aprimorando a estabilidade química e modificações estrutural no anel A e B (Figura 2).

Figura 2. Planejamento estrutural dos análogos monocetônicos



Fonte: Elaborado pelo autor.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Planejar, sintetizar, purificar, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana, toxicidade e o mecanismo de ação dos curcuminoide monocetônicos.

3.1.2 Específicos

- A. Sintetizar, purificar e identificar curcuminoides monocetônicos;
- B. Avaliar a atividade antibacteriana das substâncias;
- C. Determinar o coeficiente de partição *n*-octanol/água ($\log P_{o/a}$) dos análogos sintetizados;
- D. Avaliar a toxicidade do análogo mais ativo em queratinócitos humanos (HaCaT) e *Galleria mellonella*;
- E. Investigar atividade antibiofilme da substância mais ativa em placas de poliestireno;
- F. Avaliar a substância mais ativa em curva de morte;
- G. Avaliar substância mais ativa em ensaio de permeação em membrana em *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213);
- H. Avaliar as propriedades físico-químicas, *drug-likeness* e farmacocinéticas *in silico* das substâncias bioativas na plataforma computacional (SwissADME);
- I. Investigar classes de alvo das substâncias *in silico* pela plataforma computacional (SwissTargetPrediction).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Química

Os curcuminoides foram sintetizados por meio de condensação aldólica de Claisen-Schmidt (KUBRA et al., 2014). Foram sintetizados 14 curcuminoides monocetônicos, sendo 13 compostos inéditos de acordo com banco de dados SciFinder, com rendimento global de 3 a 98%. Parâmetros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C) incluindo deslocamento químicos e constantes de acoplamento confirmam a estrutura química. Os compostos obtiveram a avaliação de massa em relação à carga (m/z) e peso molecular através do ensaio de espectrometria de massa.

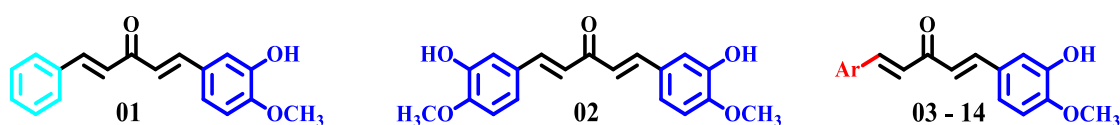
Os espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C e os espectros de massas estão no Apêndice do trabalho.

4.1.2. Relação de $\log P$ *in silico* (SwissADME) e Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A lipofilicidade é uma propriedade físico-química fundamental no desenvolvimento de novos fármacos, a qual pode ser mensurada pelo logaritmo do coeficiente de partição entre dois solventes imiscíveis ($\log P$ octanol / P água; $\log P_o/w$) (LEO; HANSCH; ELKINS, 1971; ARNOTT et al., 2012). A lipofilicidade descreve a partição de um composto entre ambiente aquoso e um lipofílico tendo uma forte inter-relação com os parâmetros farmacocinéticos: absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) bem com os parâmetros farmacodinâmicos. Portanto está diretamente correlacionada com outras propriedades, tais como: solubilidade, permeabilidade, metabolismo, toxicidade e biodisponibilidade (PICCIRILLO, AMARAL, 2018; HENCHOZ et al., 2008).

Por esses motivos a lipofilicidade do composto é um ponto importante no processo farmacocinético, pois a solubilidade interfere na absorção intestinal, permeabilidade da membrana, ligação com proteínas e a distribuição em diferentes tecidos (PRICE et al., 2021; RAEVSKY, 2004; PODUNAVAC-KUZMANOVIĆ; CVETKOVIĆ; BARNA, 2008).

Tabela 1. Análises de coeficiente de partição entre *n*-octanol e água ($\log P_o / w$), pureza e Massa Molar



Código	Ar	Massa Molar	$\log P^a$ in silico	$\log P^b$	Pureza (%)
GRM01	4 H	280,32	3,43	2,50	98,0
GRM02	3-OH, 4-OMe	326,34	3,07	1,66	97,9
GRM03	3-Cl	314,76	3,97	3,18	98,0
GRM04	4-Cl	314,76	3,96	3,13	96,8
GRM05	3- NO ₂	325,32	2,67	2,54	97,0
GRM06	4- NO ₂	325,32	2,68	2,57	98,0
GRM07	4-CF ₃	348,32	4,48	2,88	96,9
GRM08	2-furanila	270,28	2,68	2,05	97,7
GRM09	2-tiofenila	286,35	3,33	2,33	99,0
GRM11	4-piridila	281,31	2,60	1,55	99,0
GRM12	5- nitro- 2-furanila	315,28	2,13	2,09	95,9
GRM13	1-naftali	330,38	4,36	3,34	97,0
GRM14	2-naftali	330,38	4,35	3,36	98,0

^aSwissADME (DAINA; ZOETE, 2017), ^bDeterminação de coeficiente de partição (n-octanol/água), método HPLC (OECD, 1989).

Com os valores descritos na (Tabela 1) podemos observar que houve algumas variações entre o log *P* do experimento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE e o *in silico* (SwissADME).

Os valores de bases ideais para log *P*, que indicam noção de permeação, no qual variam de -0,7 a 5,0 e quanto maior o índice menos insolúveis será a molécula (TIAN et al., 2015; MANNHOLD et al., 2009). De acordo com os valores apresentado acima, a série de curcuminoides monocetônicos está dentro do padrão de referência, indicando potencial para administração oral. No estudo de Velayudhan e colaboradores (2012) foi avaliado a biodisponibilidade da curcumina, no qual mostrou que a biomolécula tinha um boa absorção e seus analógos demonstraram a mesma eficiência do seu protótipo original.

Além disso, através da análise feita por cromatografia foram determinados índices de pureza entre 95,9 a 99% por meio dos valores de área dose picos, os espectros UV-Vis e os cromatogramas foram apresentados no Apêndice.

4.2 Atividade biológica

4.2.1 Classe-alvo *in silício* antibacteriana dos curcuminoides monocetônicos

A curcumina tem vários mecanismos de ação antibacteriano descritos na literatura, portanto a série de curcuminoides monocetônicos foram investigadas *in silico* na plataforma computacional (SwissTargetPrediction), já que os compostos são inéditos na literatura, com exceção de GRM02 (GFELLER et al.,2014; DAINA; ZOETE, 2017).

A plataforma computacional é utilizada para realizar várias pesquisas de molécula em construção, ou seja, investigar o potencial da substância antes do início da síntese (RESENDE, 2022). Hoje o sistema operacional da (SwissTargetPrediction) tem sido muito usado pela robustez dos dados fornecidos e pela sua referência em artigos científicos (DAINA; ZOETE, 2017; SOHN et al.,2021).

Sua previsão envolve alvos macromoleculares de pequenas moléculas, sendo utilizado para entender os mecanismos moleculares subjacentes a um determinado fenótipo ou bioatividade (DAINA; ZOETE, 2017). A classe-alvo citada na (tabela 2) dos curcuminoides monocetônicos e a curcumina são os alvos com maior porcentagem de ligação. De acordo com os dados fornecidos *in silico* da sequência de compostos,

podemos observar que muitos alvos foram preservados do protótipo original, principalmente quando analisamos a curcumina (CUR) na plataforma.

Tabela 2. Análise *in silico* de classe-alvo pela plataforma (SwissTargetPrediction)

Código	Ar	^a Classe - alvo <i>in silico</i>
*CUR	-	Oxidoredutase; Quinase
GRM01	4-H	Oxidoredutase; Liase; Quinase
GRM02	3-OH, 4-OMe	Oxidoredutase; Quinase
GRM03	3-Cl	Oxidoredutase; Receptor acoplado à proteína da família AG
GRM04	4-Cl	Oxidoredutase; Receptor de membrana
GRM05	3-NO ₂	Quinase; Protease; Fator de transcrição
GRM06	4-NO ₂	Enzima apagadoras; Oxidoredutase; Protease
GRM07	4-CF ₃	Quinase; Oxidoredutase
GRM08	2-furanila	Quinase, Receptor acoplado à proteína da família AG; Enzima; Canal iônico dependente de voltagem
GRM09	2-tiofenila	Fosfodiesterase; Quinase
GRM10	3-piridila	Protease; Quinase
GRM11	4-piridila	Quinase; Oxidoredutase; Antígeno de superfície; Receptor acoplado à proteína da família AG
GRM12	5- nitro- 2-furanila	Protease; Enzimas apagadoras; Quinase
GRM13	1-naftali	Fator de transcrição; Quinase; Liase
GRM14	2-naftali	Quinase; Proteína não classificada; Liase

*Curcumina: CUR; (N.d.) – nada determinado; ^aSwissTargetPrediction (DAINA; ZOETE, 2017);

4.2.2 Atividade antibacteriana

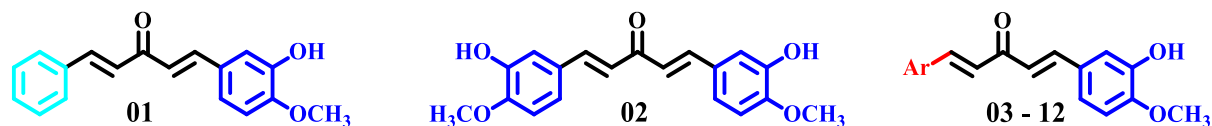
Em trabalhos anteriores, vários estudos mostraram que a curcumina possui atividade antibacteriana de amplo espectro (POLAQUINI et al., 2021; NIAMSA; SITTIWET, 2009; KHAN, et al., 2020).

Contudo a estrutura original da curcumina foi simplificada com intuito de aumentar a potência antibacteriana, gerando vários análogos. Primeiramente, foi avaliada a interferência do substituinte na atividade biológica. O GRM01 foi fracamente ativo praticamente contra todas as bactérias testadas, porém com exceção contra *H. pylori* no qual obteve uma CIM de 12.5 µg/mL (44 µM). O composto GRM02, foi fracamente ativo contra as bactérias testadas (tabela 3,4 e 5) com CIM de 625 e 400 µg/mL (1.229 e 1.226 µM) diferente dos valores apresentado no estudo de Morão e colaboradores que foram, contra bactéria *E. coli* CIM <10 µg/mL (30 µM), MSSA 21 µg/mL (64 µM) e *E. faecalis* com CIM de 78 µg/mL (239 µM). Portanto se pode observar que nesse trabalho o análogo GRM02 perdeu sua efetividade antibacteriana com a inversão de posição dos grupos

hidroxila e metoxila (MORÃO et al., 2019). Contudo, para a avaliação dos resultados dessa interferência seria necessário aplicar o curcuminóide GRM02 aos mesmo experimentos realizado no trabalho de Morão e colaboradores (2019) e assim determinar os fatos se essa modificação estrutural implica na perda da bioatividade ou não, já que no estudo por Ghose e colaboradores (2006) mostra que mudança estrutural pode alterar atividade.

Na tabela 4 avaliou-se o GRM03 no qual obteve atividade contra *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) com uma CIM de 12.5 µg/mL (39 µM) e contra *H. pylori*, CIM de 25 µg/mL (79 µM), conforme a (tabela 4). Em compensação o mesmo composto não obteve atividade contra as outras bactérias testadas como *E. coli*, *E. faecalis*, *S. mutans* e *S. aureus* suscetível à meticilina (MSSA), somente uma fraca atividade contra *S. mutans* com CIM de 625 µg/mL (1.985 µM) conforme mostrado na (tabela 3).

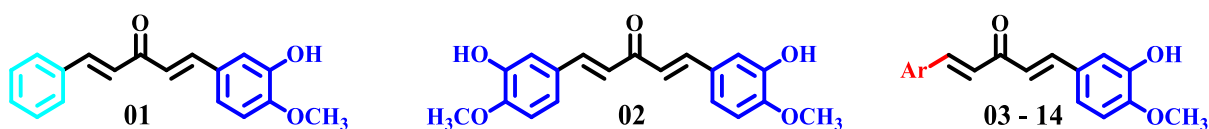
Tabela 3. Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) estão em μM para cada composto contra as bactérias testadas



Código	Ar	<i>E. coli</i> (ATCC 10536)		<i>E. faecalis</i> (ATCC51299)		<i>S. aureus</i> (ATCC 14458)		<i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	
		CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
GRM 01	4-H	>2.229	>2.229	>2.229	>2.229	>2.229	>2.229	2.229	>2.229
GRM 02	3-OH, 4-OMe	>1.915	>1.915	>1.915	>1.915	>1.915	>1.915	>1.915	>1.915
GRM 03	3-Cl	>1.985	>1.985	>1.985	>1.985	>1.985	>1.985	1.985	>1.985
GRM 04	4-Cl	>1.985	>1.985	>1.985	>1.985	1.985	>1.985	1.985	>1.985
GRM 05	3- NO ₂	>1.921	>1.921	>1.921	>1.921	>1.921	>1.921	>1.921	>1.921
GRM 06	4- NO ₂	>1.921	>1.921	>1.921	>1.921	>1.921	>1.921	1.921	>1.921
GRM 07	4-CF ₃	>1.794	>1.794	>1.794	>1.794	>1.794	>1.794	1.794	>1.794
GRM 08	2-furanila	>2.312	>2.312	>2.312	>2.312	577	1.154	1.154 – 2.312	2.312
GRM 09	2-tiofenila	>2.182	>2.182	>2.182	>2.182	2.182	>2.182	2.182	>2.182
GRM 10	3-piridila	-	-	-	-	-	-	-	-
GRM 11	4-piridila	-	-	-	-	-	-	-	-
GRM 12	5- nitro- 2-furanila	3 - 12	12 – 61	61	60 – 123	6	6	60	123
^b CHX	-	0.05 – 0.79	0,19 - 0,79	1.1 – 1.7	1.1 – 1.7	0.1 – 0.19	0.1 – 0.19	0.1	0.19 – 0.79
Ciprofloxacino	-	0.3	0.3	1,81 – 5.73	1.81 – 5.73	0.18	0.18	0.18	0.18 – 3.01

(–) não determinado, * Os valores são apresentados em intervalos (mínimo – máximo MIC/MBC) foram obtidos por dois experimentos independentes, ^a*Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina; concentrações iniciadas para CIM e MBC em 625 $\mu\text{g/mL}$; ^bCHX: clorexidina.

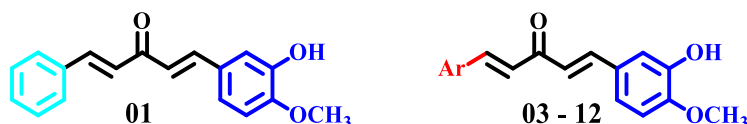
Tabela 4. Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µM



Código	Ar	^a <i>H. pylori</i> (ATCC 43526)	^b MRSA (ATCC BAA44)	^c MSSA (ATCC6538)
GRM 01	4-H	44	>1.426	1.426
GRM 02	3-OH, 4-OMe	>1.225	1.225	1.225
GRM 03	3-Cl	158	19	1.270
GRM 04	4-Cl	>1.270	>1.270	>1.270
GRM 05	3- NO ₂	>1.229	1.229	>1.229
GRM 06	4- NO ₂	>1.229	1.229	>1.229
GRM 07	4-CF ₃	>1.148	>1.148	>1.148
GRM 08	2-furanila	369	>1.479	>1.479
GRM 09	2-tiofenila	>1.396	1.396	1.396
GRM 10	3-piridila	-	-	-
GRM 11	4-piridila	44	177	-
GRM 12	5- nitro- 2-furanila	4	1	4
GRM 13	1-naftila	-	-	-
GRM 14	2-naftila	>1.210	>1.210	-
Vancomicina	-	-	0,5	-
Tetraciclina	-	3	-	0.4

(-) não determinado; ^a*Helicobacter pylori*; ^b*Staphylococcus aureus* resistente à metilicina; ^c*Staphylococcus aureus* suscetível à metilicina; a concentração inibitória mínima foi avaliada frente às bactérias em 0,195 µg/mL a 400 µg/mL e concentrações do antibiótico (vancomicina e tetraciclina) avaliado frente às bactérias = 0,0115 a 5,9 µg/mL.

Tabela 5. Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µM contra bactérias resistentes



Código	Ar	^b <i>E. faecium</i> (ATCC700221)	^a <i>E. coli</i> (BAA198)	^c <i>P. aeruginosa</i> (ATCC27453)	^d <i>K. pneumoniae</i> (ATCC13883)
GRM 01	4-H	1.426	>1.426	>1.426	>1.426
GRM 02	3-OH, 4-OMe	1.225	>1.225	>1.225	>1.225
GRM 03	3-Cl	1.270	>1.270	>1.270	>1.270
GRM 04	4-Cl	>1.270	>1.270	>1.270	>1.270
GRM 05	3- NO ₂	1.229	>1.229	>1.229	>1.229
GRM 06	4- NO ₂	1.229	>1.229	>1.229	>1.229
GRM 07	4-CF ₃	1.148	>1.148	>1.148	>1.148
GRM 08	2-furanila	574	>1.479	>1.479	>1.479
GRM 09	2-tiofenila	1.396	>1.396	>1.396	>1.396
GRM 12	5- nitro- 2-Furanila	39	19	1.268	79
Tetraciclina	-	0.8	3	13	6.6

(-) não determinado; ^a*Escherichia coli*; ^b*Enterococcus faecium*; ^c*Pseudomonas aeruginosa*; ^d*Klebsiella pneumoniae*; Concentrações das amostras avaliadas frente às bactérias testadas = 0,195 µg/mL a 400 µg/mL e para os antibióticos Tetraciclina: 0,0115µg/mL a 5,9 µg/mL.

Para esclarecer um possível mecanismo de ação, um estudo *in silico* (SwissTargetPrediction) foi realizado e apresentado na (tabela 2). Os principais alvos para GRM03 são: Oxidorredutase, receptor acoplado à proteína A/G, quinase e proteases (DAINA; ZOETE, 2017).

H. pylori usa a oxidorredutase dimérica para catalisar e formar ligações dissulfeto no periplasma, na revisão e reparo da viabilidade celular, isto é, uma enzima importante no processo desenvolvimento da bactéria (DENIC et al. 2020; BOCIAN-OSTRZYCKA et al., 2016). Desta forma, esse processo enzimático pode ser um alvo molecular dos GRM01 e GRM03. Em relação à *S. aureus*, o microrganismo possui a proteína A de superfície celular por onde tem forte fusão a proteína G, esse mecanismo está interligado ao processo infeccioso entre a bactéria e o hospedeiro, sendo muito peculiar da espécie, portanto pode haver uma hipótese do GRM03 estaria agindo nessa proteína (CUSSOLIM, JUNIOR, 2021; KOBAYASHI; DELEO, 2013). Sendo um prognose justificável perante ao valor apresentado, com CIM de 12,5 µg/mL (39 µM) para MRSA.

Em relação à diferença de valores de CIM entre MSSA e MRSA, vários fatores podem estar envolvidos. Primeiro, a categoria de metodologia aplicação ao CIM, no qual os valores podem deferir, segundo, na fonte dos microrganismos testados (FINCH et al., 2011). Terceiro o fator de resistência, as cepas *S. aureus* resistente à meticilina normalmente transportam o gene *mecA* que codifica uma proteína de ligação à penicilina (PBP2a) sendo resistente a antibióticos β -lactâmicos (CUSSOLIM, JUNIOR, 2021; MUN et al., 2013).

Desse modo, para esclarecer esse ponto, as cepas MSSA e MRSA foram testadas com a mesma metodologia e concentrações. O resultado a esse teste foi o mesmo, o GRM03 é fortemente ativo contra o MSRA e fracamente ativo contra MSSA, levantando hipótese que o fator de resistência ou mutações de MRSA o deixa vulnerável ao análogo GRM03, diferente do MSSA. Portanto para melhores respostas dessa interferência, novos experimentos seriam necessário.

Os curcuminoides GRM04 e GRM09 foram inativos contra a maioria das bactérias, somente uma atividade fraca contra MSSA e *S. mutans* com CIM de 625 µg/mL (1.915 e 2.182 µM), já o GRM06 e GRM07 obteve uma inibição na maior concentração somente contra *S. mutans* (Tabela 05 e 06), em relação ao composto GRM05, ele foi inativos para todas as bactérias testadas.

O GRM08 possui grupo furanila e apresentou uma CIM de 156 µg/mL (577 µM) contra MSSA, *E. faecium* com uma CIM de 200 µg/mL (574 µM), *H. pylori* CIM de 100 µg/mL (369 µM) e contra *S. mutans* um valor de 312 - 625 µg/mL (1.154 – 2.312 µM), exibindo atividade contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa expressando um grupo de amplo espectro.

O composto GRM10 não entrou no ensaio (tabela 3,4 e 5) por falta de material disponível. Já o seu regioisômero o GRM 11 exibiu contra MRSA uma CIM de 50 µg/mL (177 µM) e *H. pylori* uma CIM de 12,5 µg/mL (44 µM).

Pode-se considerar que o GRM11 pode estar interligado na ação das oxidoredutases de *H. pylori* de acordo com o estudo *in silico* realizado.

Da série de curcuminoides o que exibiu melhor resultado antibacteriano foi GRM12, esse composto nitrofurânico mostrou atividade contra todas as bactérias testadas, revelando uma bioatividade de amplo espectro, com exceção da fraca ação contra *Pseudomonas aeruginosa* com uma CIM de 400 µg/mL (1.268µM).

O grupo nitro precisa de redução enzimática para produzir efeitos biológicos, isso porque a redução é geralmente mediada por nitrorredutases que usam mononucleotídeo de flavina (FMN) ou dinucleotídeo de flavina adenina (FAD) como grupos prostéticos e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como subunidades redutores.

Gerando uma sequência generalizada para via biorredutiva que envolve a formação de um derivado nitroso, um ânion radical nitro, um radical nitroxil, hidroxilamina e uma amina primária (MACHEREY& DANSETTE, 2008; LEE & ZHAO, 2007; NISHINO & SPAIN, 2004; SPAIN, 1995). Esse processo redox que a bactéria realiza, pode produzir radicais capaz de matar ou inibir metabolismo bacteriano, sendo uma possível elucidação sobre a ação do GRM12.

Contra bactérias Gram-negativas o GRM 12 obteve uma CIM 1.56 µg/mL (4 µM), contra *H. pylori*, sendo uma CIM próxima a tetraciclina, o fármaco de referência e contra *E. coli* uma CIM 1- 4 µg/mL (3-12 µM), já contra *E.coli* (BAA198) multirresistente, o mesmo obteve uma CIM de 6.25 µg/mL (19 µM) um valor maior ao fármaco de referência. O curcuminóide GRM12 foi testado contra bactéria multirresistente, a *k. pneumoniae* e apresentou um valor de CIM de 25 µg/mL (79 µM).

Em bactérias Gram-positivas o GRM12 exibiu uma atividade praticamente igual ou maior ao fármaco de referência contra a cepa MRSA com um CIM 0.39 µg/mL (1 µM), para *E. faecalis* CIM de 19 µg/mL (61 µM), MSSA com CIM 2 µg/mL (6 µM), *S. mutans* CIM 19 µg/mL (60 µM) e *E. faecium* com CIM 12.5 µg/mL (39 µM).

Portanto através desses resultados, o curcuminoide GRM12 possui em sua estrutura química, mecanismo de ação com liberdade de agir em bactérias com parede celular diferente.

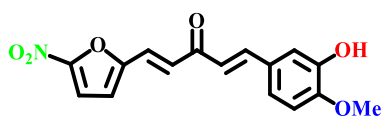
4.3 Propriedades *in silico*: físico-químicas, *drug-likeness* e farmacocinéticas obtidas pelo SwissADME do GRM12

Para produzir um fármaco eficaz, certas propriedades físico-química precisam ser analisadas, sendo que essa molécula deve reunir potência, eficácia e baixos efeitos tóxicos (AFONSO, 2009). Ser potente ao atingir o alvo no organismo na concentração suficiente e bioativa no tempo certo para que os eventos biológicos esperados ocorram, isto é, tendo uma boa inter-relação com absorção, distribuição, metabolismo e excreção - ADME (PRICE et al., 2021; PICCIRILLO, AMARAL, 2018; MALIK et al., 2017).

Aperfeiçoar essas propriedades por modificações moleculares é fundamental na seleção de substâncias para não serem descartadas na fase clínica. Estudo preliminar *in silico* é utilizado em etapas anteriores ao desenvolvimento dos fármacos (DAINA; ZOETE, 2017; VOTANO et al., 2004).

Nesse contexto, foi avaliado dados preditivos do GRM12 pelo plataforma SwissADME sobre as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, afinidade com fármacos e conformidade com a química medicinal do composto GRM12 (DAINA; ZOETE, 2017; GHOSE, et al., 2006).

Tabela 6. Preditivos *in silico* (SwissADME) para GRM12



Propriedade	^a Valores preditos
Peso molar (g/mol)	315,28
Num. de átomos pesados	23
Num. arom. Átomos pesados	11
Fração Csp ³	0,06
Num. ligações giratórias	6
Num. aceptores H	6
Num. doadores H-bond	1
Refratividade molar	85,56
TPSA	105,49 Å ²
Lipofilicidade	-
Log P o/w	2,13
Solubilidade	-
Log S	-3,64
Solubilidade em água	Solúvel
Farmacocinética	-
Absorção GI	Alto
Permeação BBB	Não
Substrato P-gp	Não
Log K _p	-6,09cm / S
Semelhança a fármaco	-
Lipinski	Sim, 0 violações
Química Medicinal	-
Pontuação de biodisponibilidade	0,55
Acessibilidade sintética	3,16

(–) não determinado; ^aSwissADME (DAINA; ZOETE, 2017)

De acordo com análise *in silico* o análogo GRM12 indicou massa molar de 315,28 g/mol, valor esse que está inserido na faixa ótima entre 150 e 500 g/mol. A massa molar está entre as regras de Lipinski para determinar tamanho molecular de um composto ideal, pois o tamanho implica na determinação de alguns compartimentos que a substância será absorvida (ERMONDI et al., 2020; GHOSE, et al., 2006; LIPINSKI, 2001). Dentro disso, uma flexibilidade ideal é ter até 9 ligações rotativas e o GRM12 apresentou 6 ligações, avaliação essa, considerável já que o número de rotação molecular influência, em particular, na passagem pela membrana, biodisponibilidade e potência de ligação (RITCHIE et al., 2011; GHOSE, et al., 2006).

A polaridade é uma propriedade molecular relacionada à permeabilidade, a área de superfície polar topológica (TPSA) ideal é de 20 à 140 Å² e o GRM 12 apresentou o

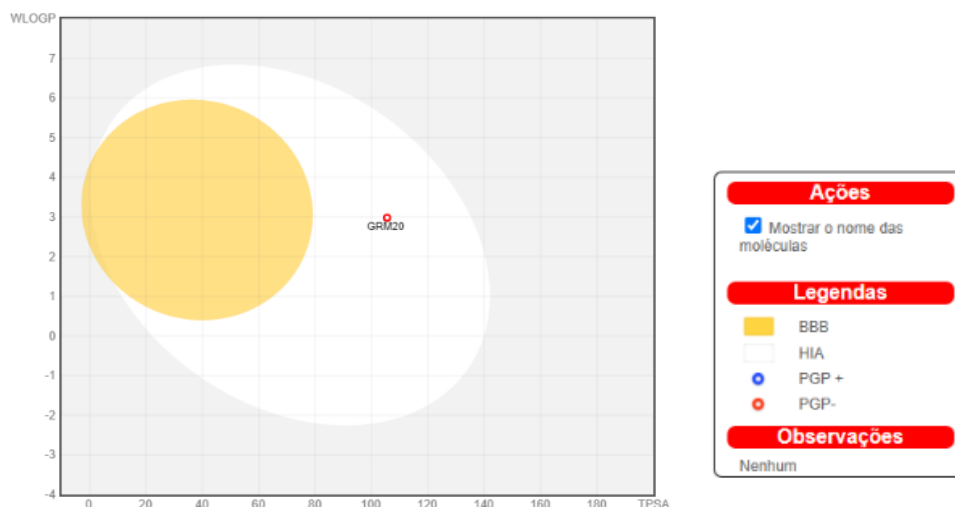
valor de 105,49 Å² o que está inserido no intervalo sugerido, pois na literatura indica que compostos com área de superfície polar (PSA) segundo essa referência apresenta melhor biodisponibilidade oral (ERMONDI et al., 2020; DAINA et al., 2017; GHOSE, et al., 2006; KELDER et al., 1999). Na saturação, que representa a fração de carbonos na hibridização sp³, o GRM12 apresentou valor de 0,06 o que está no padrão considerável que é de pelo menos $\geq 0,25$. O log S foi satisfatório baseado na média de três categorias de cálculos que a plataforma computacional oferece, o ESOL, Ali e SILICOS-IT.

Em relação ao log *P in silico* e o fornecido experimental (CLAE) não houve muita diferença nos números, porém, ambos estão dentro dos padrões indicativos que variam de -0,7 a 5,0, valores significativos que indicam uma boa permeação (DAINA; ZOETE, 2017).

Portanto, o composto GRM12 apresenta um potencial de atravessar membranas por difusão passiva no meio gastrointestinal e uma administração oral viável, sem ter acesso à barreira hematoencefálica baseado no dado representado no (Figura 3), interessante já que o sistema nervoso central (SNC) não é foco, pois as propriedades do composto devem ser traçadas com base em um objetivo terapêutico (GHOSE, et al., 2006). Pois, se tivéssemos tal finalidade de permeabilidade cerebral teriam que ter um PSA menor, entre <60-70 Å² (KELDER et al., 1999).

Na figura 6 observamos dados que estimulam a estender a abordagem para a permeação da barreira hematoencefálica (BBB), para avaliar preditivo de penetração e prevenção de efeitos indesejados (DAINA; ZOETE, 2017; EGAN et al., 2000).

Figura 3. Gráfico representativo BOILED – Egg



Fonte: (SwissADME; EGAN et al., 2000).

Outro fator importante é que o análogo GRM12 mostrou-se negativo no potencial substrato para a glicoproteína (P-gp) sendo relevante, visto que a proteína é significativa entre os transportadores de cassete de ligação de ATP ou transportadores, ABC (SZAKÁCS et al., 2008). Essa proteína desempenha a função de uma bomba de efluxo ativo através de membranas biológicas contra substâncias xenobióticos prejudiciais ao organismo e um dos principais papéis da P-gp é proteger o sistema nervoso central (SZAKÁCS et al., 2008). Da mesma forma é importante lembrar que o P-gp é expressa em algumas células tumorais e consequentemente a cânceres persistentes (SHAROM et al., 2008).

Vale evidenciar que a série de curcuminoides monocetônicos possuem propriedades que estão em conformidade com a regra de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge (VEBER et al., 2002; EGAN et al.,2000; MUEGGE et al., 2001; LIPINSKI et al.,2001; GHOSE et al.,1997).

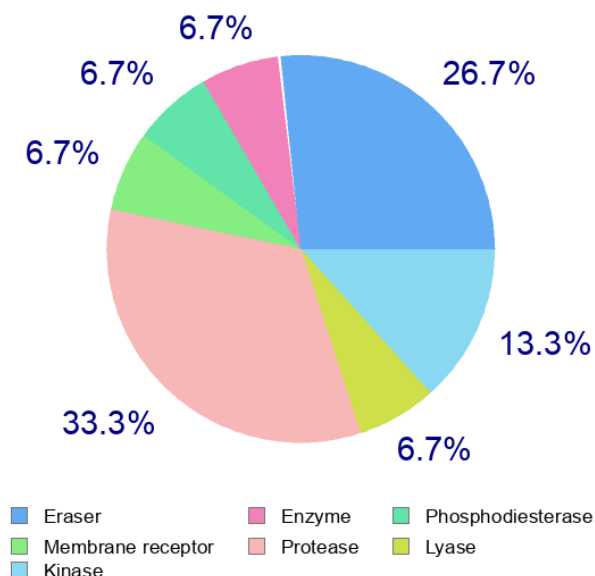
Outro fator *in silico* fornecido pelo SwissADME é uma análise na estrutura química para identificar se há fragmentos potencialmente problemáticos (composto promíscuo). Esses fragmentos podem proporcionar desvio premeditadamente de resultados falso-positivos em testes biológicos (BAELL et al., 2010; PICCIRILLO, AMARAL, 2018). Portanto com a análise feita no análogo GRM12 não foi diagnosticado fragmento que seja questionável e com uma acessibilidade sintética de 3,16 classificando

em uma síntese moderada, já que os valores de referência são de 1 muito fácil a 10 muito difícil. Uma acessibilidade sintética razoável é significativa para uma futura produção em larga escala (ERTL, SCHUFFENHAUER, 2009).

4.3.1. Investigação *in silício* pelo SwissTargetPrediction de mecanismo de ação para GRM12

No estudo *in silico* pelo SwissTargetPrediction verificamos dados preditivos de classe-alvo do GRM12 que estão em fase de construção (Figura 4) (GFELLER et al., 2014; DAINA; ZOETE, 2017). A importância de uma análise *in silico* é que conseguimos elucidar melhor os resultados obtidos, já que o composto GRM 12 é inédito na literatura portando uma molécula em fase de elucidação de seus mecanismos.

Figura 4. Principais classe-alvos de ação para o GRM12



Fonte: (SwissTargetPrediction).

Conforme observado na (Figura 4) o GRM 12 possui uma interação de 33.3% por proteases bacterianas. As proteases são um amplo conjunto de enzimas, essenciais na viabilidade celular, produz resposta ao estresse bacteriano e processo de patogenicidade, pois as proteases permitem que as bactérias desenvolvam a capacidade de infectar o hospedeiro e causar doenças (ZHENG et al., 2021; EMIOLA et al., 2015).

Hoje, a maioria dos mecanismos antimicrobianos convencionais se resumem em bloqueios da biossíntese da parede celular, biossíntese de proteínas e DNA/RNA, contudo, tal ação talvez tenha sido superada com o surgimento de várias cepas resistentes (BROWN; WRIGHT, 2016). Por esse motivo, é importante buscar novas alternativas, e proteases bacterianas oferecem um conjunto de opção antibacteriana (BROWN; WRIGHT, 2016).

Atualmente, as proteases têm sido foco molecular no desenvolvimento de antivirais, fármaco disponível com tal mecanismo de ação tem sido promissor na indústria farmacêutica, inclusive há pesquisa de moléculas contra a principal protease presente no vírus SARS-CoV-2 (NITSCHKE, 2019; MAHMUD, et al., 2021).

Em *E. coli*, as proteases têm papéis importantes na fisiologia e bioquímica, a bactéria possui um conjunto de genes essenciais de várias proteases que regula a enzima da biossíntese da membrana externa, ativa resposta ao estresse celular, peptidases de sinais e outras para evitar a proteólise descontrolada na célula bacteriana (EMIOLA et al., 2015; AKIYAMA et al., 2015; PAETZEL et al., 2002). Interferir nessas enzimas pode ser uma rota alternativa de alvos inexplorados, logo, pode-se justificar que o composto GRM12 pode estar intervindo nesse alvo, pois o mesmo, obteve atividade contra *E. coli* (ATCC 10536) com CIM de 1- 4 µg/mL (3-12 µM) (tabela 3) e para cepa resistente de *E. coli* (BAA 198) com CIM de 6,25 µg/mL (19 µM) (tabela 5).

A clpP é uma subunidade proteolítica de protease caseinolítica que desempenha a função proteostase de células procarióticas (KIRSCH et al., 2020; MORENO-CINOS et al., 2019). A maior parte das espécies bacterianas, como *E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus* tem um gene clpP que se associa com a família AAA + ATPases, no entanto, não são essenciais para a viabilidade celular, contudo a desregulação ou perturbação do clpP nessas cepas aumenta sua suscetibilidade aos antibacterianos e diminui a virulência em alguns patógenos, por exemplo, *S. aureus* (KIRSCH et al., 2020; FLYNN et al., 2003; KOCK et al., 2004; CHATTERJEE et al., 2005; FREES et al., 2014).

A inativação de clpP no complexo proteolítico e vários desses reguladores de virulência dependerá de cada cepa bacteriana (FREES et al., 2014; BÆK et al., 2014).

A clpP depende da associação de AAA + ATPases para selecionar e desenrolar substratos de proteína, a desordem desses parceiros pode desregular totalmente o sistema proteolítico trazendo complicações a viabilidade celular (RAJI et al., 2012). Vale ressaltar

que no estudo de Sui e colaboradores (1993) a curcumina já apresentava uma fraca atividade através de indicação *in vitro* para proteases do HIV-1 e HIV-2, sendo potencializado em seu analágo GRM12.

Outra classe-alvo interessante, depois das proteases, são as enzimas apagadoras com 26.7%, um conjunto de enzimas conhecidas como “borrachas” ou “apagadores”.

Essas enzimas são essenciais para os eventos de reprogramação epigenética, necessários durante os estágios de evolução (O’SULLIVAN et al., 2019).

À nível celular, a atividade das “borrachas” é importante para a transição de uma fase do ciclo celular para outra, ou seja, existem várias categorias de apagadores epigenéticos que têm como alvo as histonas (ESTEVE-PUIG et al., 2020; O’SULLIVAN et al., 2019). Outras classe-alvo para o GRM12 são as quinases, com 13.3% e para enzimas, liase, fosfodiesterase e receptor de membrana com 6.7% pelo SwissTargetPrediction.

Há uma hipótese que moléculas com características de função de aceitador de ligação de H ou doadora complementar podem ter afinidade em ligantes de quinase (GHOSE, et al., 2006).

Uma condição que o composto GRM12 preservou de seu protótipo, a curcumina, foi o alvo na metaloproteinase matriz (MMPs) conforme fornecido *in silico* (SwissTargetPrediction) os MMP são classe-alvo de proteases. Essas enzimas proteolíticas conforme discutidas anteriormente são importantes para o desenvolvimento de infecção por *H. pylori* como mostrado no estudo *in vivo* por Gupta e colaboradores (2011). Assim sendo, o GRM12 pode interferir nesse processo contra *H. Pylori*, pois o mesmo obteve fortemente atividade de CIM tal bactéria.

Dessa forma podemos considerar que o curcuminoide GRM12 pode ser um candidato promissor a atuar em alvos como as proteases bacterianas de acordo com os dados *in silico* e os resultados antibacterianos apresentados.

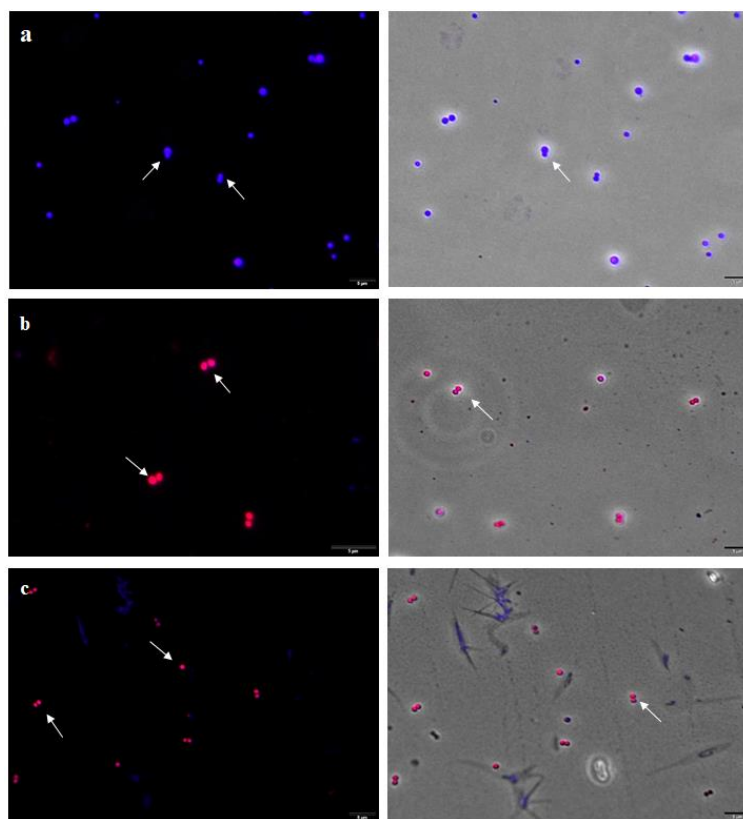
4.3.2 Ensaio de Permeabilidade de Membrana com *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)

Para investigar a ação do curcuminoide GRM12 na membrana bacteriana, foi utilizada a espécie de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), um microrganismo pertencente a microbiota da pele e conhecido por causar infecções graves em seres

humanos, principalmente no âmbito hospitalar, pois os biofilmes formados são difíceis de erradicar com agentes antibacterianos convencionais (ARCHER et al., 2011; DE LA CALLE et al., 2016; BRADLEY, 2015). A célula bacteriana foi exposta ao composto GRM12 na concentração do valor de CIM 2 $\mu\text{g/mL}$ (6 μM) por 15 minutos, assim como a nisina (disruptor de membrana usado como controle positivo).

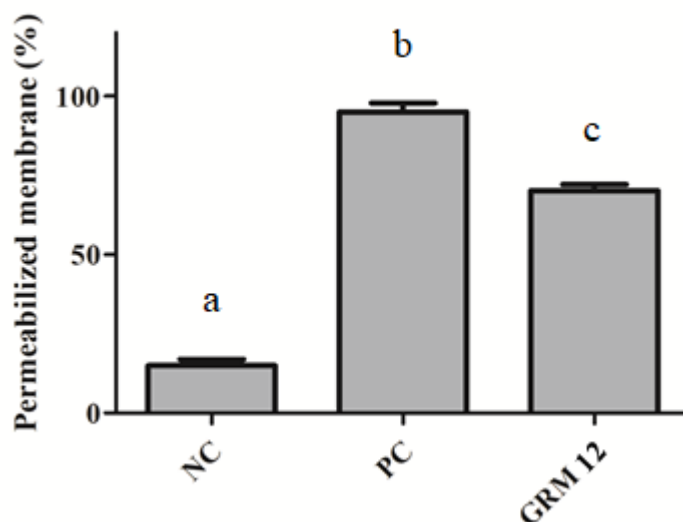
Imagens de microscopia de fluorescência representativas do controle negativo (células tratadas com 1% de DMSO), o controle positivo (nisina a 5,0 $\mu\text{g/mL}$) e o composto GRM12 estão apresentados na figura 5. As relações de porcentagens de células com membranas danificadas foram quantificadas a partir das imagens do microscópio (Figura 6). As culturas tratadas com DMSO a 1% apresentaram aproximadamente 10% das células com membranas permeabilizadas. O tratamento com nisina demonstrou 95% das células coradas com PI/SYTO9. O tratamento com o GRM12 apontou porcentagens de dano de 75% sendo capaz de danificar a membrana levando citólise de *S. aureus*.

Figura 5. Microscopia de fluorescência da membrana citoplasmática, barra de escala 5 μm com ampliação de 100 x.



a.Células tratadas com DMSO 1% (controle negativo); b.Células tratadas com nisina (controle positivo) e c.Células tratadas com GRM12.

Figura 6. Porcentagem de permeabilidade células com membranas danificadas



a. NC: Células tratadas com DMSO 1% (controle negativo); b. PC: Células tratadas com nisina (controle positivo) e c. Células tratadas com GM12.

Alguns estudos com análogos da curcumina apontavam sua forte interação na ruptura da membrana bacteriana o que corrobora com os resultados apresentado neste trabalho (MORÃO et al., 2019; POLAQUINI et al., 2021).

Em estudos anteriores é possível observar um amplo mecanismo de ação da curcumina, principalmente a sua interferência na montagem da proteína FtsZ, responsável pela divisão celular (RAI et al., 2008). Com esses resultados podemos afirmar que o análogo GRM12, um composto simplificado da curcumina não perdeu sua efetividade de ação na membrana bacteriana, assim como também seu efeito bacteriostático (TAJBAKHSI et al., 2008; DILARRI et al., 2021). Ao contrário o GRM12 preservou os fatores de ação do seu progenitor, como também teve seu potencial aumentado com a simplificação molecular da sua estrutura.

Estudos apontam que compostos que atuam na atividade da proteína FtsZ podem ser inibidores promissores no processo de divisão celular bacteriana (SUN et al., 2014; GROUNDWATER et al., 2017).

4.3.3 Ensaio de Antibiofilme

O biofilme é um mecanismo desafiador para penetração de antibacterianos por decorrência da formação de uma matriz polissacarídica muito bem organizada, tornando resistente a sua irradicação (SHARMA et al., 2014; HAWVER et al., 2016; ZHANG et al., 2019; ŁOPUSIEWICZ et al., 2021).

Muitos microrganismos possuem essa capacidade de formar biofilme como MSSA, MRSA, *E. coli*, *E. faecium*, *K. pneumoniae* (SOOD et al., 2008, SHARMA et al., 2014). Essas bactérias já são conhecidas por provocar infecções graves e difíceis de tratar levando vários pacientes a óbitos, por serem resistentes a várias classes de antibióticos existentes, tornando seu biofilme mais complexo ao tratamento clínico (HAWVER et al., 2016; ZHANG et al., 2019). Assim sendo, a descoberta de novos agentes inibitórios direcionados ao sistema *Quorum sensing* bacteriano é uma importante estratégia para controlar a formação e resistência do biofilme. Portanto neste trabalho foi avaliado o efeito do GRM12 contra biofilme em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

O curcuminoide GRM12, vancomicina e a tetraciclina foram avaliados em várias concentrações, no qual o GRM12 apresentou atividade antibiofilme com valores de CIMB de 0.195 µg/mL (0.61 µM) contra MRSA e MSSA (Figura 7 á 10) demonstrando mais de 50% de inibição celular, já para vancomicina os valores de inibição foram nos valores de 0.73 µg/mL (0.50 µM) contra MRSA e 0.045 µg/mL (0.03 µM) contra MSSA.

Outra bactéria avaliada foi *E. faecium*, produtores de biofilme e causadora de infecções recorrentes, crônicas e resistentes a antibióticos (SOOD et al., 2008). O GRM12 e tetraciclina foram testadas no qual obteve atividade de CIMB foi de 12.5 µg/mL (39 µM) e a tetraciclina um valor de inibição de 0.0925 µg/mL (0.20 µM). Nas bactérias Gram-negativas, o GRM12 apresentou contra *E.coli* resistente uma inibição na concentração de 3.12 µg/mL (9.89 µM), valor um pouco superior que a tetraciclina que foi de 0.1845 µg/mL (0.41 µM). Em *K. pneumoniae* o GRM12 também obteve atividade antibiofilme nas concentrações de 12.5 µg/mL (39 µM) e para tetraciclina um valor de 1.47 µg/mL (3.30 µM). Para todas as bactérias testadas o GRM12 obteve atividade antibiofilme e com valores de inibição superior a 50% e diminuindo ou zerando os números de células viáveis quando comparado ao controle não tratado conforme mostrado nas figuras abaixo.

A curcumina já havia demonstrado processo inibitório sobre biofilme de algumas espécies, agindo na redução da biomassa, dificuldade de adesão, desfazendo a estrutura do biofilme e modulando o sistema Quorum Sensing e além disso a curcumina inibe os fatores de virulência que dependem do Quorum Sensing, provavelmente no GRM12 deve ter sido potencializado esses fatores de ação.

Figura 7. Efeito do GRM 12 sobre o biofilme de *S. aureus* resistente a meticilina. A barra em cinza representam o valor MBIC e as linhas representam o $\log_{10}$ UFC/mL.

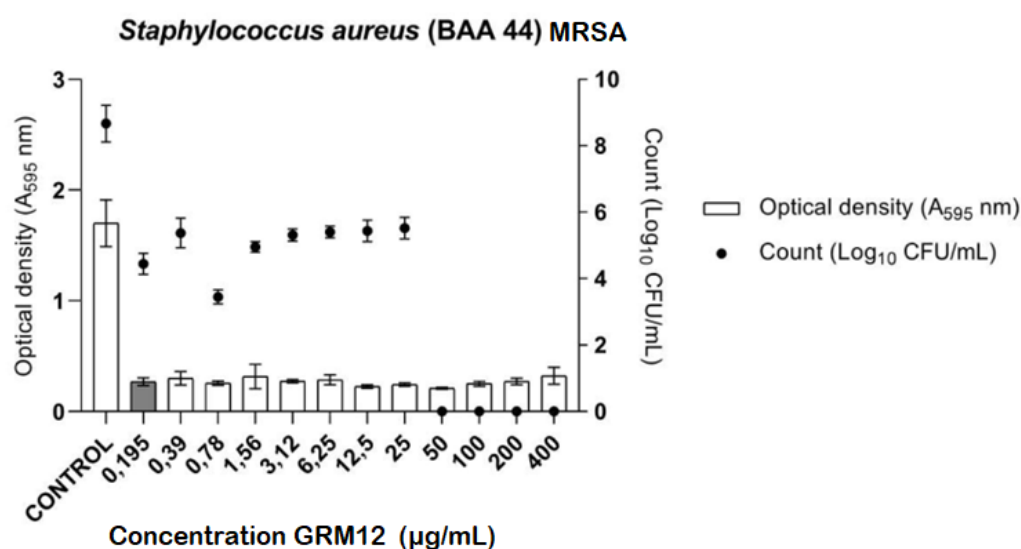


Figura 8. Efeito da vancomicina sobre o biofilme de *S. aureus* resistente a meticilina. A barra em cinza representam o valor MBIC e as linhas representam o $\log_{10}$ UFC/mL.

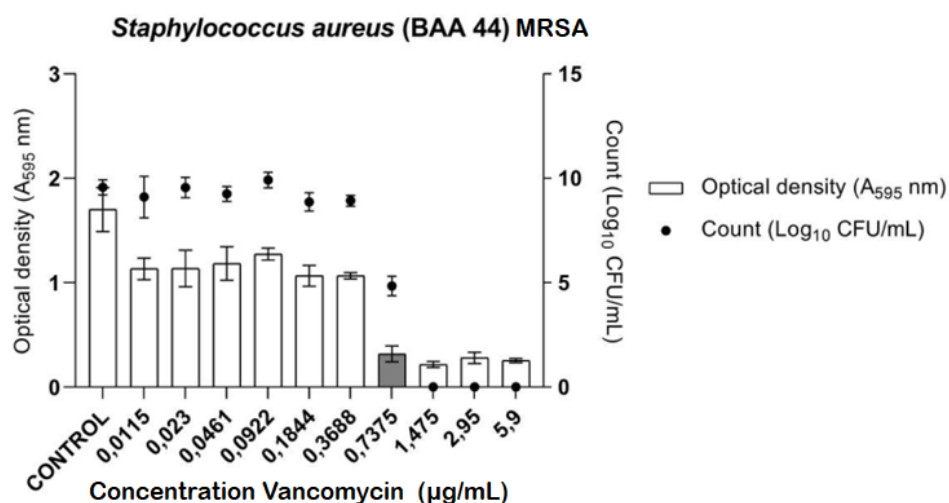


Figura 09. Efeito do GRM 12 sobre o biofilme de *S. aureus* suscetível a meticilina. A barra em cinza representam o valor MBIC e as linhas representam o log₁₀ UFC/mL.

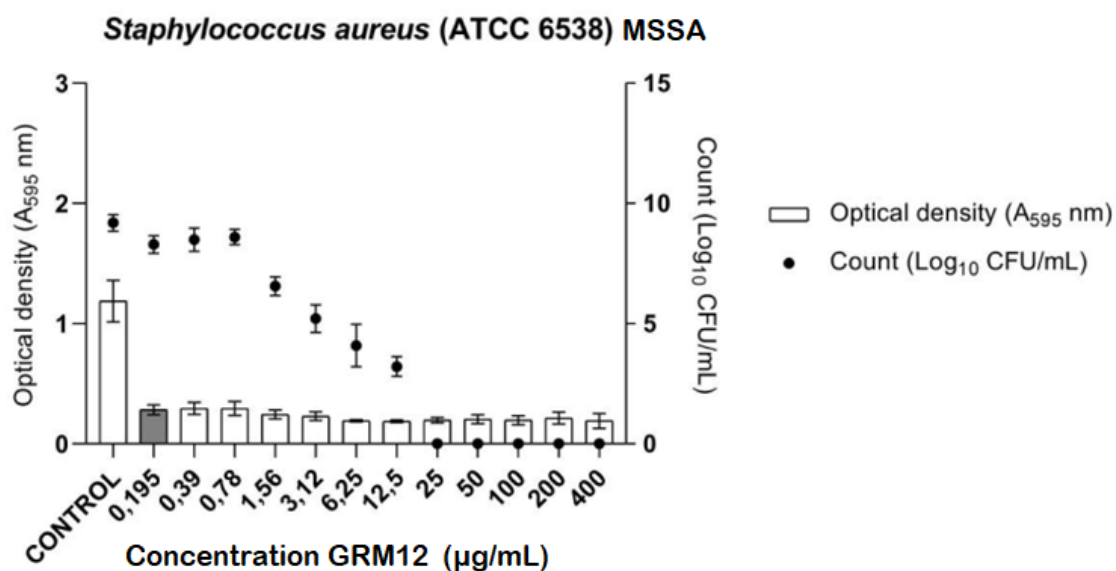


Figura 10. Efeito da tetraciclina sobre o biofilme de *S. aureus* suscetível a meticilina. A barra em cinza representam o valor MBIC e as linhas representam o log₁₀ UFC/mL.

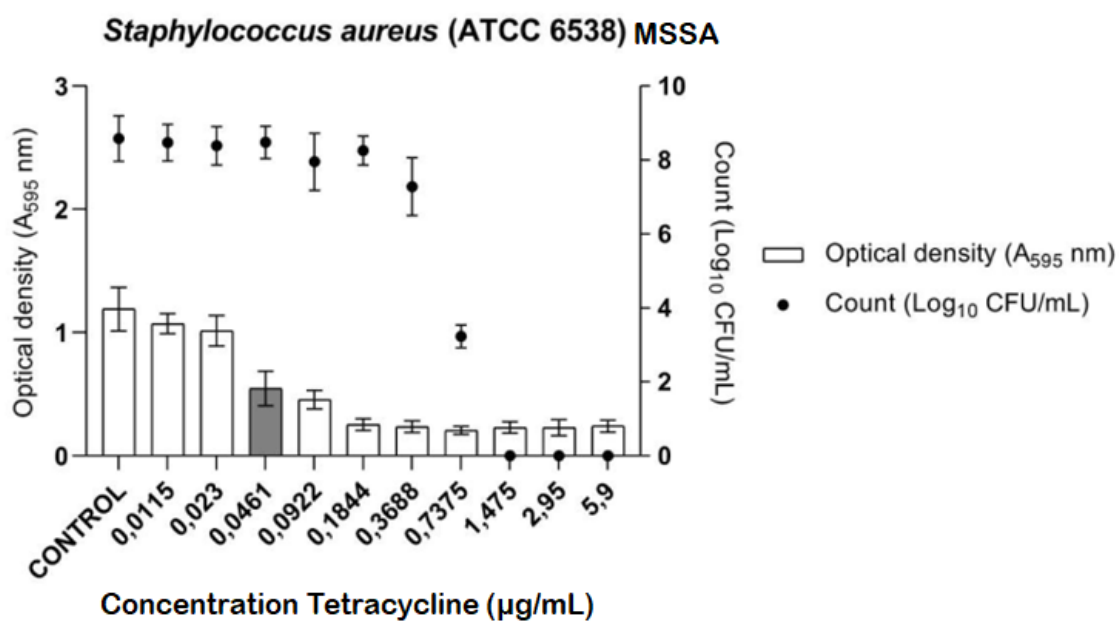


Figura 11. Efeito do GRM 12 sobre o biofilme de *Enterococcus faecium*. A barra em cinza representam o valor MBIC e as linhas representam o log₁₀ UFC/mL.

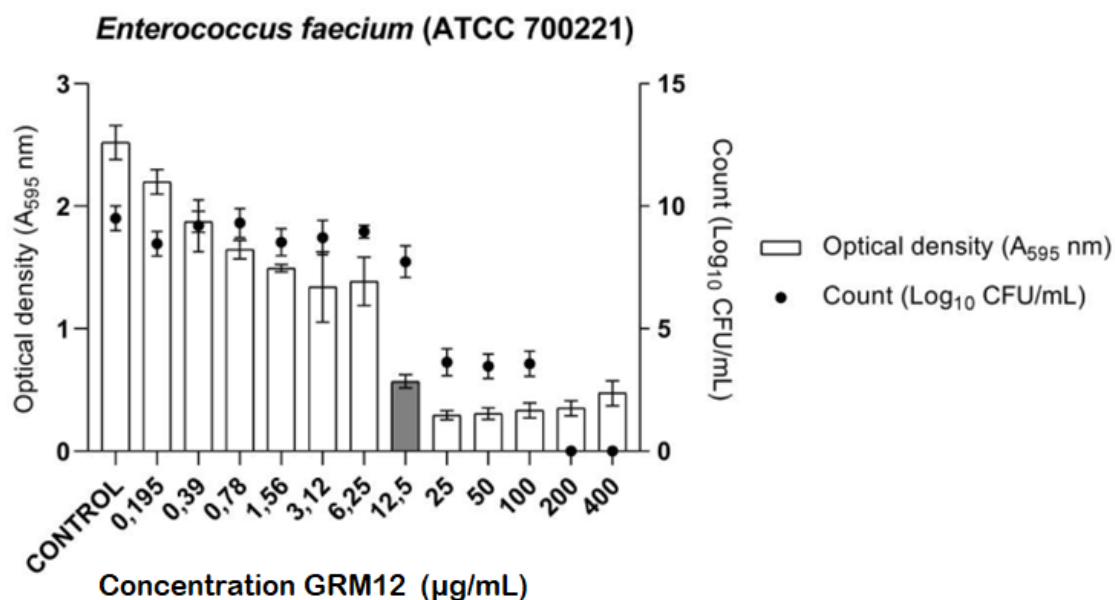


Figura 12. Efeito da tetraciclina sobre o biofilme de *Enterococcus faecium*. A barra em cinza representam o valor MBIC e as linhas representam o log₁₀ UFC/mL.

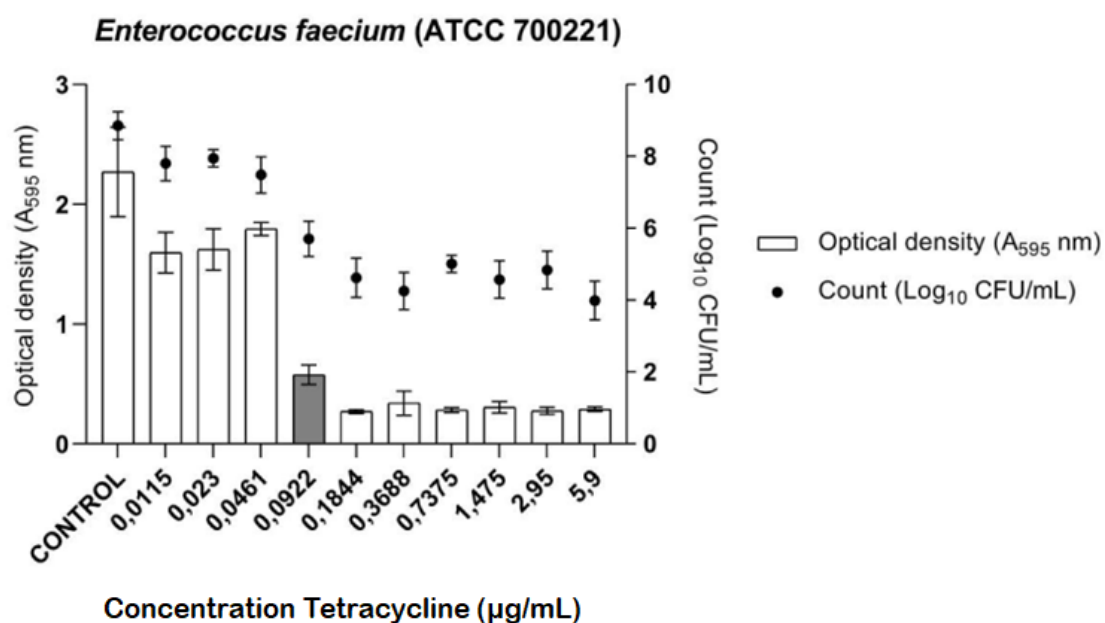


Figura 13. Efeito do GRM 12 sobre o biofilme de *Escherichia coli* resistente. A barra em cinza representam o valor MBIC e as linhas representam o $\log_{10}$ UFC/mL.

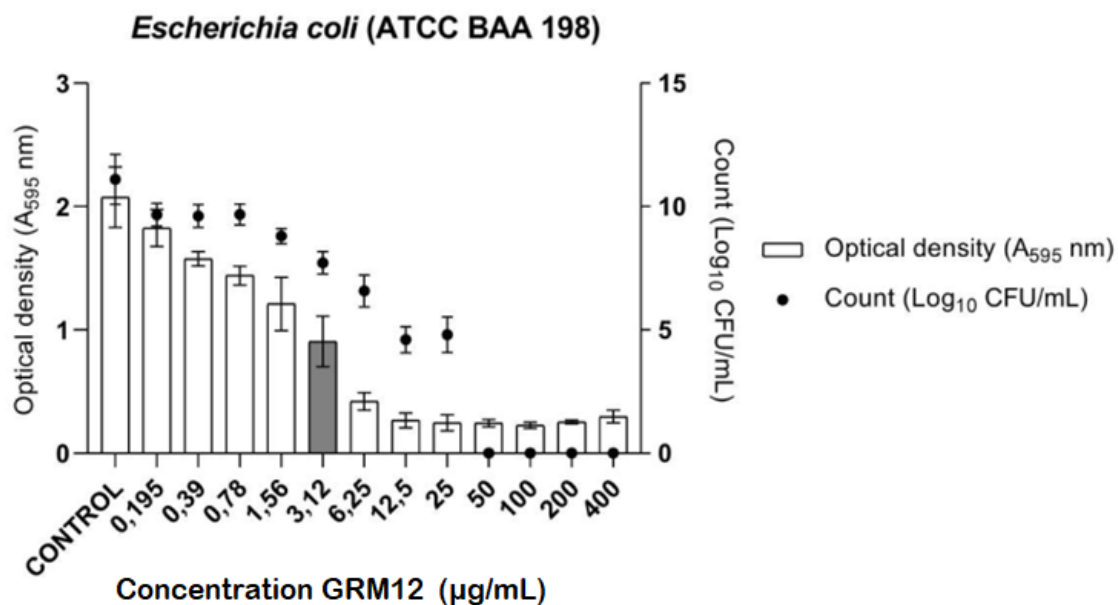


Figura 14. Efeito da tetraciclina sobre o biofilme de *Escherichia coli* resistente. A barra em cinza representam o valor MBIC e as linhas representam o $\log_{10}$ UFC/mL.

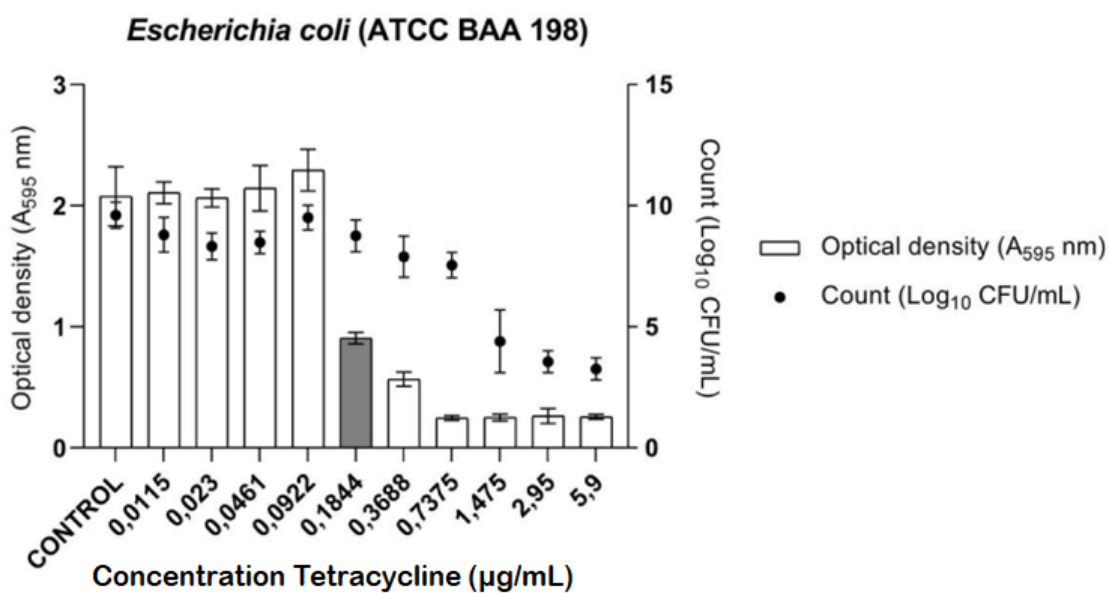


Figura 15. Efeito do GRM 12 sobre o biofilme de *Klebsiella pneumoniae*. A barra em cinza representam o valor MBIC e as linhas representam o log₁₀ UFC/mL.

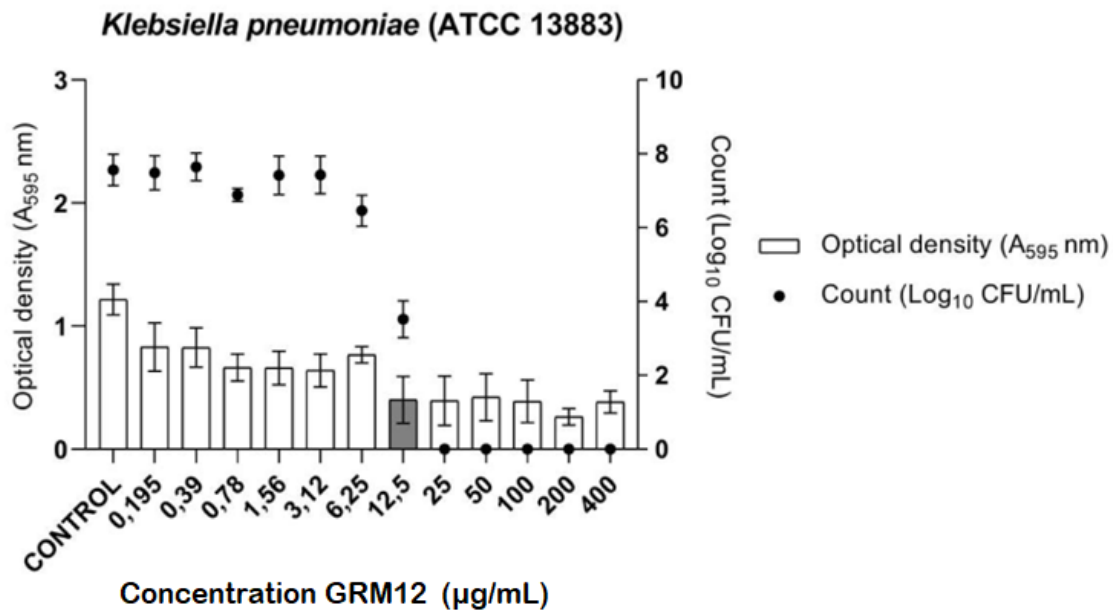
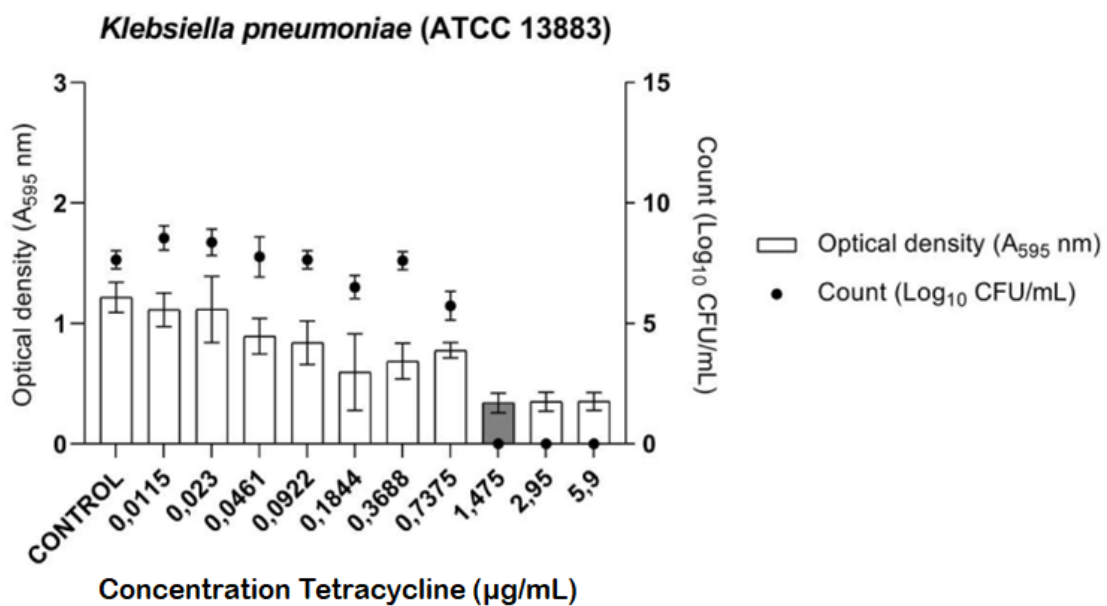


Figura 16. Efeito da tetraciclina sobre o biofilme de *Klebsiella pneumoniae*. A barra em cinza representam o valor MBIC e as linhas representam o log₁₀ UFC/mL.



4.3.4 Cinética de morte

De toda série de curcuminoides testados neste trabalho, o GRM12 foi o que obteve melhor atividade antibacteriana, sendo assim, o análogo foi avaliado no ensaio de curva de tempo de morte contra as bactérias *E. coli* (BAA198), *E. faecium* (ATCC700221), *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *S. aureus* resistente à meticilina (ATCC BAA44) e *S. aureus* suscetível à meticilina (ATCC6538). A base de comparação do GRM12 foi feito com dois fármacos de referência vancomicina e tetraciclina (FLUIT et al., 2005; CHAREST et al., 2005; GERACI et al., 1956; GERACI & WILSON, 1981; GRIFFITH, 1981). De acordo com as figuras abaixo podemos observar o tempo de curva de morte que o curcuminóide GRM12 obteve contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Contra MRSA e MSSA, observou que o número de log UFC mL⁻¹ sofreu uma redução significativa em 24 horas quando comparado ao inóculo. Foi observado que a curva de morte do GRM12 para cepa MSSA iniciou a partir de 4 horas após a exposição e em 24 horas obteve melhor curva de morte comparado à vancomicina. Contra MRSA a influência de redução de morte pelo composto GRM12 teve início no intervalo entre 4 a 8 horas, chegando a agir inicialmente melhor que a vancomicina, contudo no prazo de 24 horas obteve a curva de morte inferior à vancomicina. Contra *E. faecium* a curva de morte iniciou a partir de 4 horas de exposição ao análogo GRM12 chegando ao prazo de 24 horas com curva de morte praticamente igual a tetraciclina.

Nas bactérias Gram-negativas de acordo com a figura 20 para *E. coli* resistente, o composto obteve redução no número de log UFC mL⁻¹ no prazo de 24 horas, principalmente na concentração 2 x o valor CIM, obtendo melhor resultado comparado a curva de morte da tetraciclina.

Contra *K. pneumoniae*, obteve redução no número de log UFC mL⁻¹, contudo não zerando morte celular, mas obtendo a curva de morte paralela com a tetraciclina.

Portanto de acordo com os resultados, o composto GRM12 foi capaz de inibir consideravelmente as Log UFC mL⁻¹ no período de 24 horas e mantendo uma curva de morte similar ao fármaco de referência. Com isso podemos comprovar que o curcuminóide GRM12 tem uma ação bacteriostática impedindo a proliferação dos microrganismos. Vários estudos já comprovaram a eficiência na curcumina em relação ao seu poder de inibir crescimento bacteriano, com esse resultado só reafirma que essa

ação continua e de forma potencializadora desse análogo (TAJBAKHSI et al., 2008; DILARRI et al.,2021).

Figura 17. Avaliação da cinética de morte do GRM 12 nas concentrações 1x e 2x CIM e a vancomicina para *S. aureus* suscetível a meticilina no período de 24 horas.

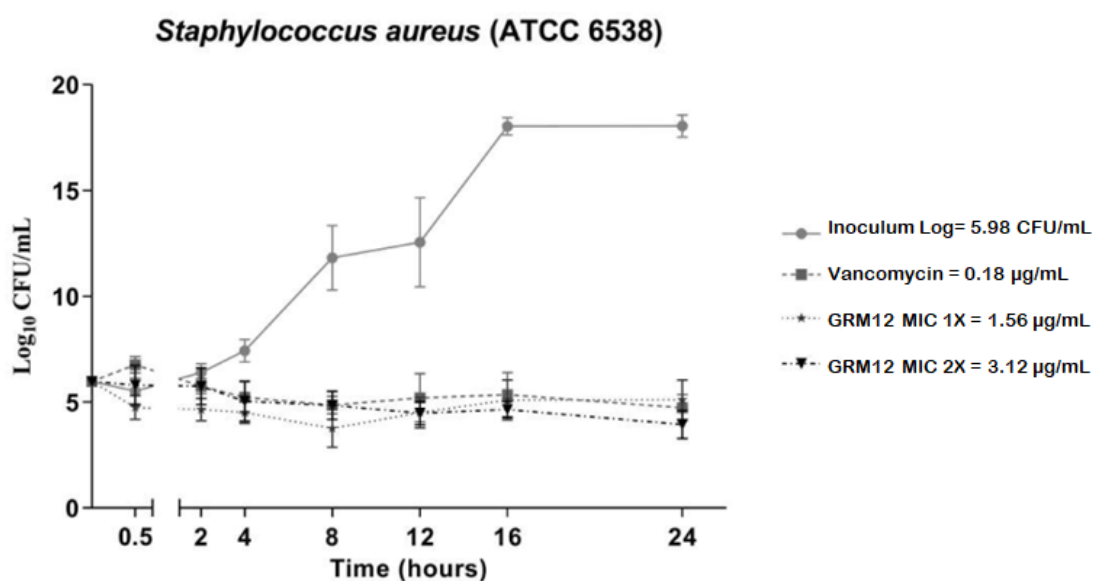


Figura 18. Avaliação da cinética de morte do GRM 12 nas concentrações 1x e 2x CIM e a vancomicina para *S. aureus* resistente a meticilina no período de 24 horas.

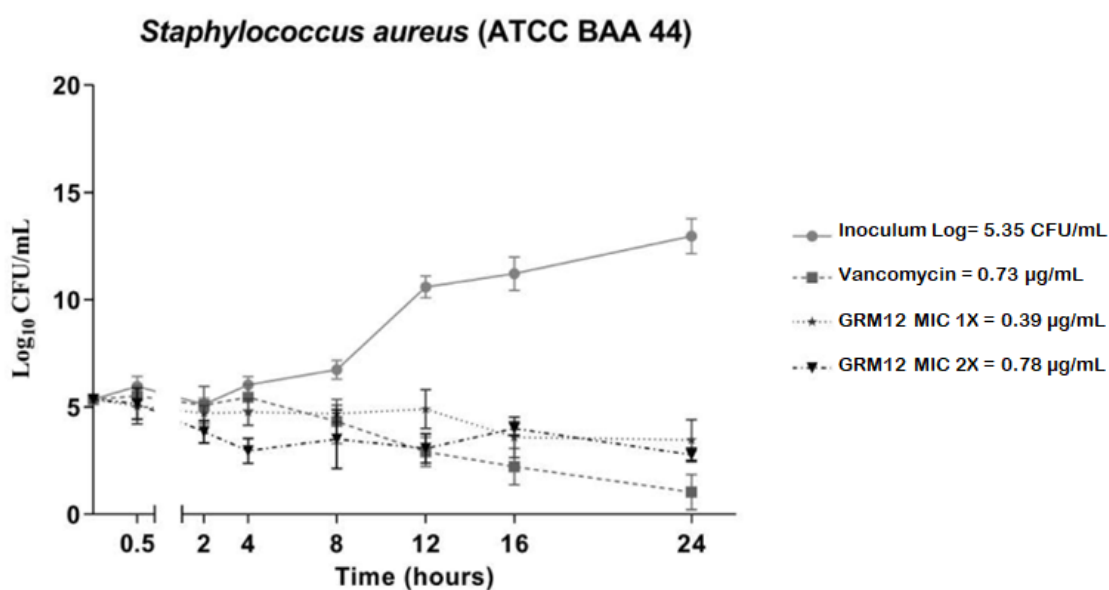


Figura 19. Avaliação da cinética de morte do GRM 12 nas concentrações 1x e 2x CIM e a tetraciclina para *Enterococcus faecium* no período de 24 horas.

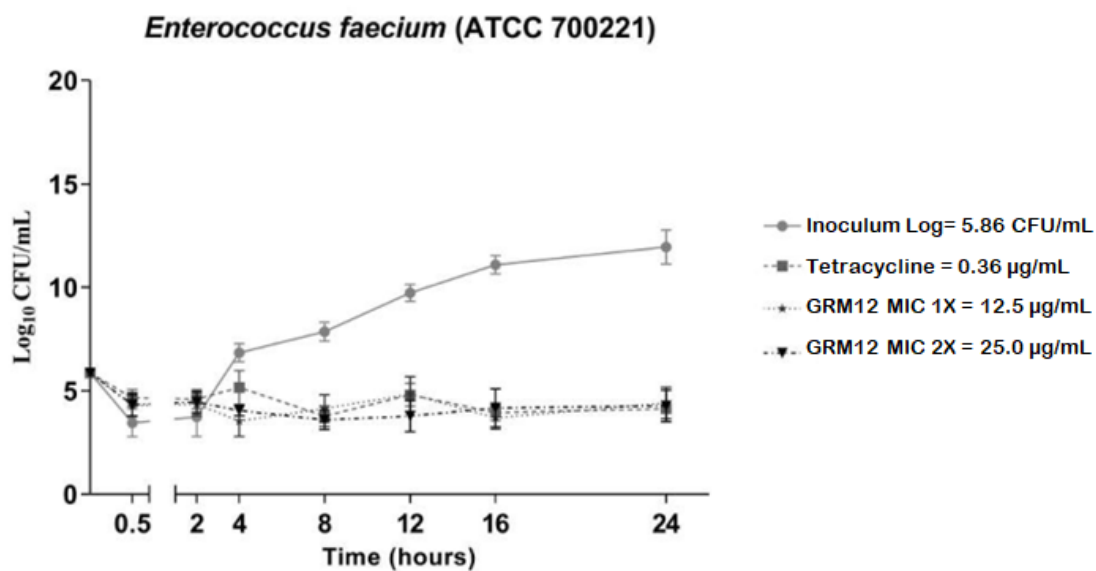


Figura 20. Avaliação da cinética de morte do GRM 12 nas concentrações 1x e 2x CIM e a tetraciclina para *Escherichia coli* no período de 24 horas.

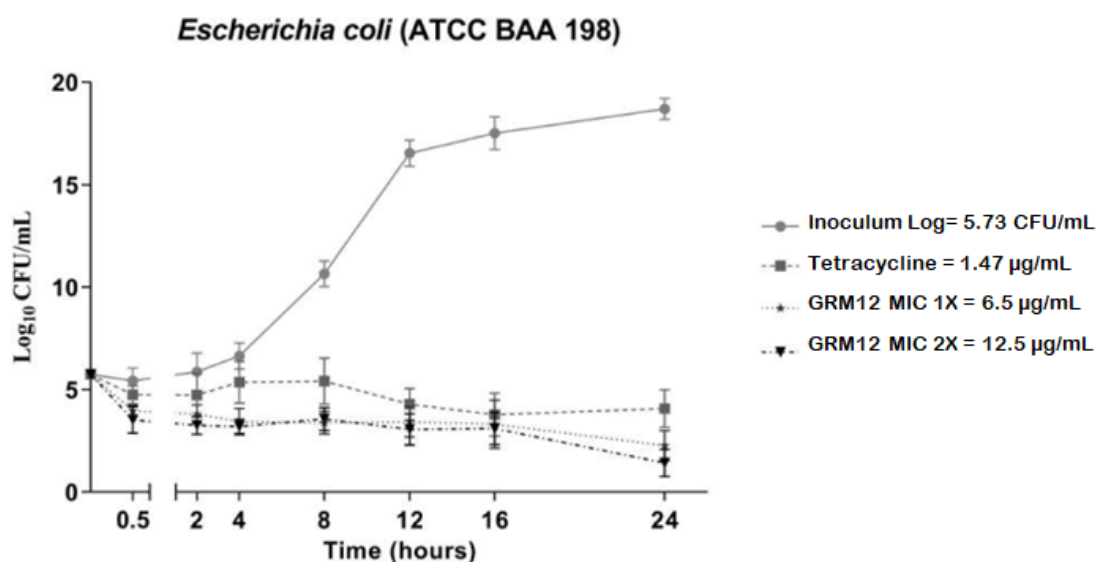
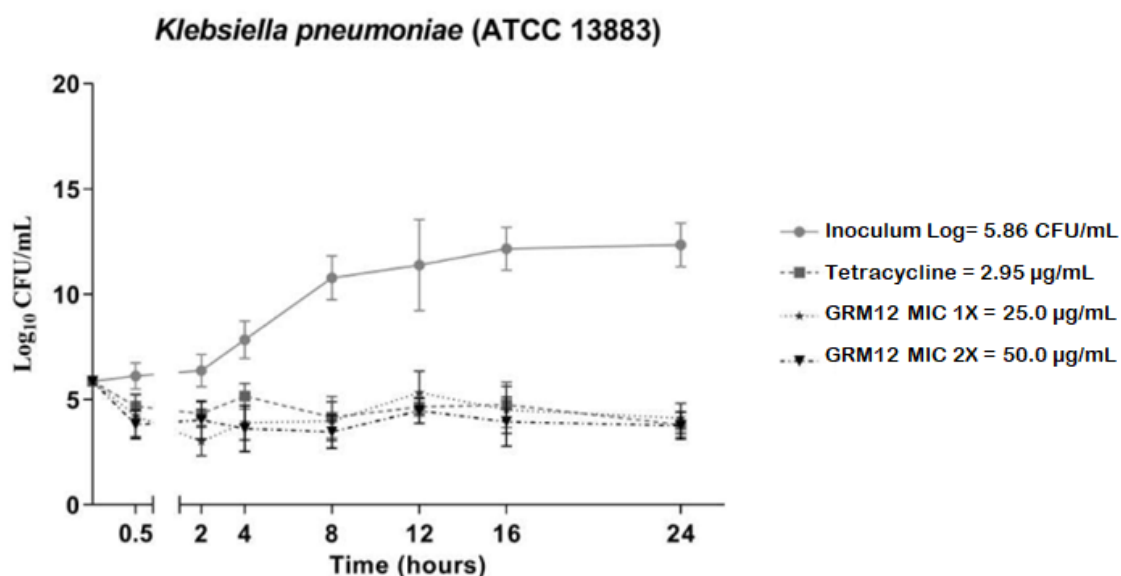


Figura 21. Avaliação da cinética de morte do GRM 12 nas concentrações 1x e 2x CIM e a tetraciclina para *Klebsiella pneumoniae* no período de 24 horas.



4.4 Teste de toxicidade

4.4.1 Ensaio em queratinócitos (HaCaT)

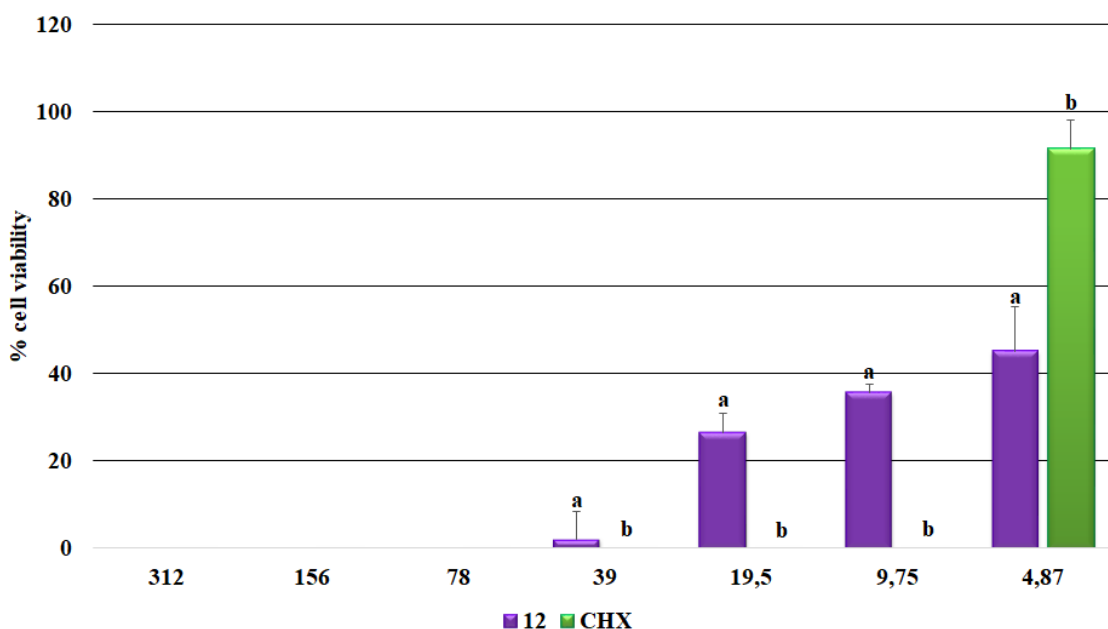
O teste de toxicidade foi realizado contra queratinócitos (HaCaT), que compõem o tecido epitelial (ARCHER et al., 2011). A epiderme e mucosas são regiões de colonização *S. aureus*, um agente infeccioso em humanos (LOWY, 1998). A clorexidina (CHX) é um antisséptico, com ação antifúngica e bactericida utilizado pelos dentistas e o público como enxaguante bucal como forma profilática (BESCOS et al., 2020).

O gráfico 1 mostra a porcentagem de células de queratinócitos humanos viáveis (HaCat) quando expostas ao composto GRM12 e clorexidina (CHX) por 24 horas. Assim podemos observar que houve viabilidade celular nas concentrações 39 a 4,87 µg/mL (123-15 µM).

Nas concentrações de 19,5 µg/mL (61 µM) houve uma viabilidade de 25% e na menor concentração de 4,87 µg/mL (15 µM) mostra 45% de viabilidade celular, 2 vezes maior que a CIM (µM) contra MSSA e contra MRSA 25 vezes maior que a CIM

apresentado no valor de 0,195 µg/mL (0.6 µM). O GRM12 mostrou valores de citotoxicidade menor que a CHX na maioria das concentrações demonstrada neste estudo, somente na menor concentração de 4,87µg/mL (9µM) que a CHX obteve maior viabilidade celular que o GRM12.

Gráfico 1. Ensaio de citotoxicidade em diferentes concentrações do curcuminóide monocetônico GRM12 e clorexidina (CHX) na viabilidade de células de queratinócitos (HaCat). Os resultados são expressos como médias ± DP



Fonte: próprio autor. As letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os compostos, dentro de cada concentração, segundo ANOVA/Tukey ($p < 0,05$)

4.4.2 Totoxicidade contra *Galleria mellonella*

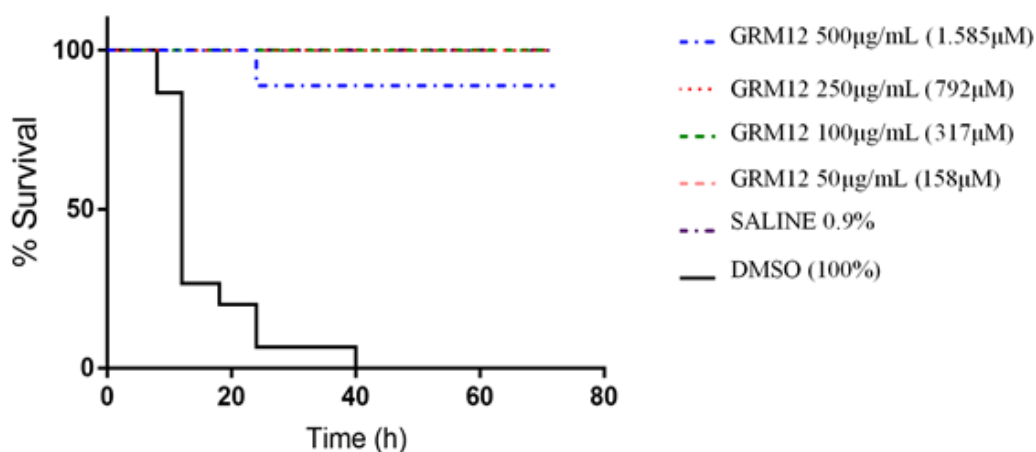
Os nitrocompostos são conhecidos pela sua performance terapêutica e também pela toxicidade, isso se deve ao ciclo redox no qual são gerados vários intermediários radiculares reativos, o que ocasiona efeitos adversos (SMITH et al., 1948; GROSS & SMITH, 1985; MACHEREY & DANSETTE, 2008). Assim, além do teste *in vitro* nos queratinócitos (HaCaT), testamos o seu efeito tóxico *in vivo* nas larvas de *Galleria mellonella*. A investigação da toxicidade aguda do composto GRM12 foi avaliado no ensaio com *Galleria mellonella*, no qual tem sido um modelo confiável para teste *in vivo*

de toxicidade (ALLEGRA et al., 2018). O mecanismo das lavras apresentam similaridade estruturais e funcionais dos mamíferos, abrangendo uma resposta imune inata, sendo aceita como uma forma de análise *in vivo* consolidado (WOJDA, 2017).

Portando o composto GRM12 foi testado em *Galleria mellonella*, a taxa de sobrevivência das larvas após a administração do composto foi observada nos períodos de 0, 24, 48 e 72 horas.

As concentrações testadas foram de 500, 250 e 100 e 50 µg/mL (1.585, 792, 317 e 158µM) que correspondem a 20 mg/Kg/larva, 10 mg/Kg/larva 4 mg/Kg/larva e 2 mg/Kg/larva, respectivamente.

Gráfico 2. Ensaio de toxicidade em diferentes concentrações do curcuminóide monocetônico GRM12 em *Galleria mellonella*



Percentagem de sobrevivência ao longo do tempo de larvas de *Galleria mellonella* injetadas com GRM12 a 500 µg/ml (20 mg/Kg/larvas), GRM12 a 250 µg/ml (10 mg/Kg/larvas), GRM12 a 100 µg/ml (4 mg/Kg/larvas) e GRM12 a 50 µg/ml (2 mg/Kg/larvas). $p < 0,05$, teste log-rank.

A curva de controle foi obtida pela administração sistêmica de solução salina estéril 0,9% e DMSO 100% na hemocela das larvas. Os resultados da análise de toxicidade demonstraram que, nas doses testadas, houve apenas uma morte na maior concentração, indicando que o GRM12 nessas concentrações não demonstrou ser tóxico (Gráfico 2). Em estudo realizado por Velayudhan e colaboradores (2012) foi elucidado que administração a longo prazo da curcumina não causaria qualquer efeito adverso, portanto esse fator pode estar presente em seu análogo GRM12 já que não desmostrou efeito toxicidade em *Galleria mellonella*.

5. CONCLUSÃO

A simplificação molecular da curcumina gerou compostos com potenciais bioativos. Foram sintetizados 14 análogos, dentre estes 13 inéditos na literatura, sendo todos identificados por RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Analisados por CLAE que determinou um coeficiente de partição entre *n*-octanol e água ($\log P_o / w$) obtendo um $\log P$ que variou de 1,55 a 3,36, valores dentro dos padrões permissíveis de permeação e níveis de pureza que variam de 95,9 a 99,0%, comprovando sua eficiência na bioatividade.

Dentre os compostos testados, o análogo GRM12 exibiu potencial de amplo espectro, com ação antibacteriana com valores de CIM entre 3 a 60 μM e contra cepas resistentes 1 a 79 μM , com exceção da *P. aeruginosa* (ATCC 27453) com uma CIM 1.268 μM . Nas predições *in silico* obteve-se resultados e parâmetros físico-químicos dentro dos intervalos preconizados, com classe-alvo para proteases, enzimas apagadoras e quinases, diferenciando seu mecanismo de ação dos antibióticos tradicionais. Em relação a citotoxicidade, o mesmo causou viabilidade celular de 45% na concentração de 15 μM para queratinócitos (HaCaT), já em *G. mellonella* não demonstrou ser tóxico nas concentrações testadas. No ensaio de permeação de membrana o composto GRM12 apresentou 75% de dano a membrana de *S. aureus* (ATCC 29213). Atividade antibiofilme superior a 50% de inibição contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O mesmo obteve cinética de morte igual ou maior aos fármacos vancomicina e tetraciclina.

Dentre a sequência de compostos testados, o GRM01 obteve CIM de 44 μM contra *H. pylori* (ATCC43526), o GRM 03 e GRM 11 apresentaram atividade antibacteriana contra *H. pylori* (ATCC43526) e MRSA (ATCC BAA44) com valores de CIM entre 44 e 177 μM . Portanto a simplificação molecular conduziu curcuminoides monocetônicos fortemente ativos, corroborando o potencial da curcumina como uma protótipo no planejamento de substâncias com competências antibacterianas.

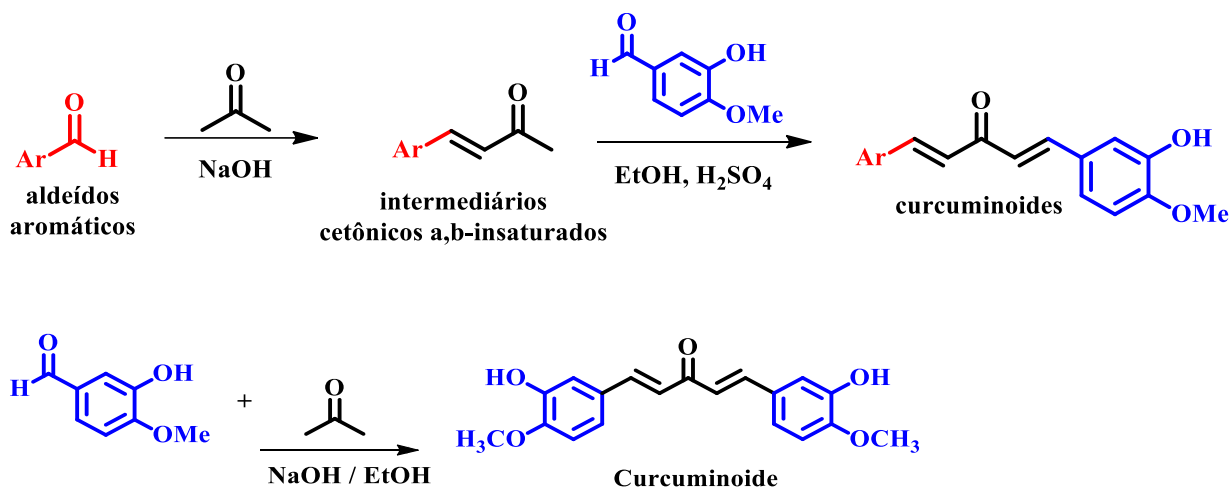
Nosso estudo proporcionou novas alternativas em relação aos antibacterianos, tal como o surgimento de um candidato com aspectos promissores para investigação de seu mecanismo de ação.

6. EXPERIMENTAL

6.1 Químico

Os análogos de curcuminoides monocetônicos foram sintetizados por meio de duas reações de condensação aldólica (Esquema 1) (KUBRA et al., 2014).

Esquema 1. Síntese de Curcuminoides monocetônico e o 3-OH, 4-OMe



A primeira etapa a reação ocorre entre diferentes derivados benzaldeídos comerciais e acetona, na presença de catálise básica, gerando uma variedade de intermediários cetônicos α,β -insaturados. Na segunda etapa, os respectivos intermediários foram submetidos a reação com isovanilina e sob catálise ácida, culminando na obtenção dos curcuminoides monocetônicos (Tabela 7). As reações foram acompanhadas por placas de cromatografia em camada delgada - CCD sob a inspeção de luz 254 e 365 nm para a observação da síntese.

Os curcuminoides GRM 01 a GRM 09 e GRM13- GRM14 foram obtidos através da metodologia tradicional descrita acima, com rendimentos que variam 22% a 91%, os compostos GRM02, GRM10 a GRM12 foram obtidos com pequenas modificações na metodologia convencional.

Na realização dos intermediários 3 e 4-piridila foi agregada uma contribuição segundo Bhambra e colaboradores (2017) que descreveram a utilização dioxano na síntese. Portanto dentro da metodologia convencional adicionou-se dioxano o que

proporcionou pouca formação de subprodutos, maior rendimento e facilitação no processo de purificação.

Mesmo com aplicação do dioxano o substituinte piridila é quimicamente instável, talvez por esse motivo a propensão por rendimentos foram baixos com 22% a 24%.

Na síntese dos curcuminoides finais empregou-se catalise ácida para os produtos piridínicos, ou seja, ácido clorídrico sob atmosfera de N₂. Os produtos piridínicos possuem uma estabilidade química maior que os intermediários, porém seu rendimento de massa na rota sintética é bem baixo comparado aos outros substituintes da série. Para o 3-piridila obtivemos uma produção de 3%, já o 4-piridila rendeu uma massa de 26%.

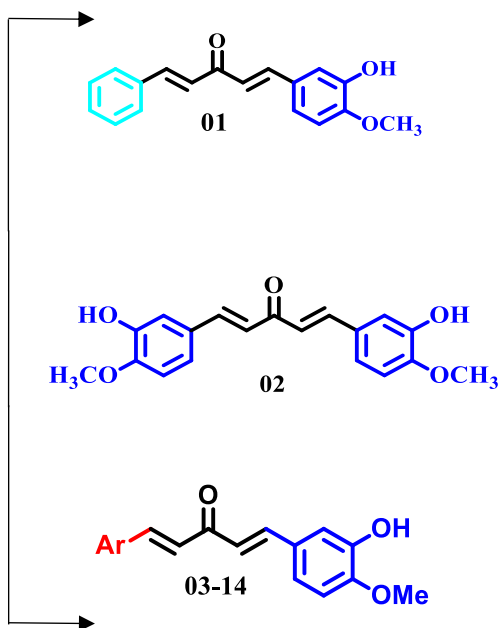
O intermediário do 5-nitro-2-furanila foi sintetizado em catálise ácida. Para tal, realizou-se a troca do catalisador NaOH por ácido acético e ácido sulfúrico em temperatura de 50 °C sob acoplamento em refluxo, após 24 horas o produto foi vertido em gelo picado, filtrado e purificado, com rendimento de 31%.

Na síntese do curcuminóide GRM 12 foi acrescentado o ácido acético em seu meio reacional em substituição ao EtOH, com rendimento de 51% no processo final após purificação.

Na síntese do curcuminóide monossustituído e dissustituído foi por condensação aldólica em meio básico em única etapa. A reação foi realizada em temperatura ambiente no período de 72 horas. Após esse período, o meio reacional foi vertido em gelo e o meio foi acidificado com ácido sulfúrico, precipitado e filtrado (LIN et al., 2006). Para ambos os compostos não observou-se a formação de subprodutos. O rendimento para o curcuminóide monossustituído foi de 96 %, já para o dissustituído foi de 98%.

Tabela 7. Estrutura dos curcuminoides monocetônicos

Curcuminoide	Ar	Rendimento
GRM 01	4-H	91%
GRM 02	3-OH, 4-OMe	98%
GRM 03	3-clorofenila	71%
GRM 04	4-clorofenila	48%
GRM 05	3-nitrofenila	76%
GRM 06	4-nitrofenila	88%
GRM 07	4-trifluormetilfenila	75%
GRM 08	2-furanila	46%
GRM 09	2-tiofenila	85%
GRM 10	3-piridila	3%
GRM 11	4-piridila	12%
GRM 12	5-nitro-2-furanila	51%
GRM 13	1-naftila	62%
GRM 14	2-naftila	70%



As substâncias foram purificadas por extração líquido-líquido e técnicas cromatográficas, como: cromatografia em coluna de gel de sílica e cromatografia em coluna de permeação em gel (LH-20, Sephadex).

O monitoramento das reações e a análise de pureza das amostras foram realizados por cromatografia em camada delgada analítica (CCD) sendo reveladas por meio de inspeção no ultravioleta (254 e 365 nm) e revelada no reagente químico anisaldeído sulfúrico. A obtenção dos intermediários cetônicos α , β -insaturados e seus respectivos curcuminoides finais foram confirmados por meio da análise de seus espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze (RMN de ^{13}C). Os compostos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alto Eficiência - CLAE e espectrometria de massa.

Todos os resultados de espectros e cromatogramas dos compostos foram adicionados no Apêndice. De acordo com a base de dados Scifinder, os análogos GRM 01-14 foram identificados como novas entidades químicas, com exceção GRM02.

As reações foram acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando cromatoplasmas de gel de sílica sob base de alumínio da marca Supelco® como fase estacionária e como fase móvel foram utilizados gradientes de solventes hexano/acetato de etila de acordo com a polaridade das substâncias. As placas foram

reveladas na câmara escura de luz ultravioleta (254 e 365 nm) e dependendo dos analitos também se utilizou o anisaldeído sulfúrico.

6.1.2 Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC-FN) e Cromatografia de gel permeação em Sephadex ® LH20

A cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC-FN) foi um dos processos utilizados na purificação dos análogos. Usando uma fase estacionária, gel de sílica de 100 a 200 (Mesh Sigma Aldrich®) aplicadas em colunas de vidro de variáveis diâmetros e alturas. Para fase móvel foram utilizadas misturas de acetato de etila e hexano e suas porcentagens variam de acordo com a polaridade da substância. Outro método de purificação foi Sephadex LH20 que separa por diferentes pesos moleculares. As amostras foram solubilizadas em DMSO e eluídas em etanol. As frações foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando cromatoplasmas de gel de sílica sob base de alumínio da marca Supelco®. Como fase móvel foram utilizadas misturas de acetato de etila e hexano de acordo com a polaridade das substâncias. As placas foram reveladas na câmara de luz ultravioleta (254 e 365 nm) e revelada no anisaldeído sulfúrico.

6.1.3 Coeficiente de partição (n-octanol/água) medido pelo método Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A determinação do $\log P_{o/w}$ seguindo o padrão de procedimentos descritos nas Diretrizes da OCDE para o Teste de químico (OCDE, 1989). O $\log P$ teórico usado para compostos de referência foi extraído da SwissADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Valores do fator de capacidade (k) de compostos de referência foram calculados de acordo com o tempo de retenção (r_t) segundo a fórmula $k = (r_t - r_{t0})/r_{t0}$, onde r_{t0} é o tempo de retenção de tiouréia. Os compostos de referência utilizados foram acetofenona, ácido cinâmico, benzofenona, timol, tolueno, bifenila, fluoranteno e trifetilamina. Uma curva padrão foi construída para cada eluição isocrática: MeOH:H₂O (70:30, 75:25 ou 80:20) sob fluxo de 1,0 mL/min. O volume de amostra injetado foi de 20,0 µL e o

comprimento de onda foi de 254 nm. A pureza dos compostos foi medida por valores de área de banda.

6.2 Ferramenta computacional (Swiss Institute of Bioinformatics)

Trabalhar com pesquisas para descobertas de fármacos e outras substâncias bioativas demanda tempo e estudo, pois projetar e incluir essas substâncias na sociedade é um processo gradual (HAY et al., 2014; DAHLIN et al., 2015). A utilização de softwares economiza tempo e investimentos econômicos. Assim o Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) exerceu um papel fundamental no desenvolvimento de técnicas de planejamento de fármacos, acompanhada por estudos *in silico* (DAINA; ZOETE, 2017).

O grupo de modelagem molecular da SIB desenvolveu várias ferramentas CADD (Computer-Aided Design and Drafting) com uma metodologia avançada de softwares sofisticados. Ferramenta *in silico* é muito utilizada no processo de desenvolvimento de novos antibacterianos e antimicobacterianos (RAGHU et al., 2020; RAMESH et al., 2020; BAKCHI et al., 2020; ABD-ALWAHAB et al, 2020; ABDULLAHI et al,2020).

Portanto neste trabalho usou-se o site interativo SwissADME (análise de propriedade ADME) e SwissTargetPrediction (Previsão de alvos biomoleculares) para complementar o estudo (GFELLER et al.,2014; DAINA; ZOETE, 2017). O acesso pela plataforma é feito através de acesso livre: <http://www.swissadme.ch/index.php>.

6.3 Procedimentos biológicos

6.3.1 Cepas microbianas padrão e condições de crescimento

Laboratório de Cultura de Células (FOA) – UNESP Câmpus Araçatuba – SP
Profa. Responsável: Dra. Cristiane Duque

Para a avaliação das atividades antimicrobiana dos compostos foram utilizadas as seguintes cepas padrão: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458). As cepas foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de

Janeiro. Os meios de cultura usados para crescimento de cada espécie bacteriana foram os seguintes: Mitis Agar Salivarius Agar (Difco, Kansas City, MO, USA) com 0,2U/mL de bacitracina para *S. mutans*, Brain Heart Infusion Agar – BHIA (Difco) para *E. coli* e *E. faecalis* e Mannitol Salt Agar (BD BBL) para *S. aureus*. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂.

6.3.2 Triagem dos compostos quanto à atividade antibacteriana

Laboratório de Cultura de Células (FOA) – UNESP Câmpus Araçatuba – SP

Profa. Responsável: Dra. Cristiane Duque

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Cada análise descrita a seguir foi realizada em três dias independentes. O controle positivo de cada experimento foi o ciprofloxacina (Sigma-Aldrich, USA) e o controle negativo foi o meio de cultura sem os compostos. Brevemente, curvas de crescimento foram realizadas para cada microrganismo (*S. mutans*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*) com a finalidade de identificar o número de horas necessárias para este atingir sua fase de maior multiplicação celular (fase logarítmica ou exponencial). Os ensaios de CIM foram medidos pelo método de microdiluição, baseados nas normas do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute - M7-A9, 2012) com algumas modificações.

Culturas das espécies bacterianas mencionadas no item 4.2.1 foram repicadas em meio caldo BHI (Difco) por 24h ou mais, dependendo do tempo de crescimento de cada microrganismo, a 37°C. Quando a cultura atingiu a metade da fase logarítmica, as células foram separadas por centrifugação a 5000xg por 5 minutos a 4 °C. Estas foram lavadas e ressuspendidas em tampão fosfato de sódio – PB (10 mM, pH. 6,8). Em seguida, o número de células foi ajustado utilizando-se Mueller-Hinton (MH) caldo 2 x concentrado para obtenção de 1-5 x 10⁵ UFC/mL (Unidades Formadoras de colônias/mL). Os compostos foram diluídos seriadamente em meio de cultura MH e em seguida, inserida a cultura bacteriana com a concentração ajustada.

Após incubação por 24 horas a 37 °C, as placas de microtitulação foram analisadas a 550 nm em um leitor de Microplacas modelo 3550-UV (Biorad do Brasil) após a

aplicação de uma solução de resazurina (Sigma) a 5µg/mL por 3 horas. A CIM foi definida como a menor concentração do composto ou ciprofloxacina que não houve crescimento detectável (coloração azul da viragem da resazurina). Os meios contendo a CIM e duas concentrações maiores foram diluídas seriadamente e plaqueados em MH ágar e incubados a 37°C por 48 horas para todos os microrganismos. A coloração amarela ou alaranjados dos compostos não interferiu na visualização. As colônias foram contadas com auxílio de estereomicroscópio binocular (Labomed, USA) e determinado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) /mL. A CBM foi considerada quando o composto eliminou mais de 99% das bactérias.

6.3.3 Atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (BAA 44) - MRSA e *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina (ATCC 6538) – MSSA

Laboratório de Testes Antimicrobianos, Instituto Ciências Biomédicas – UFU Câmpus Uberlândia - MG

Prof. Responsável: Dr. Carlos Henrique G. Martins

A concentração inibitória mínima (CIM) contra *Staphylococcus aureus* foi definida como a concentração mais baixa do agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para determinar a CIM das bactérias incluídas no estudo, foi realizado o método de microdiluição recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute, com algumas modificações descritas a seguir (CLSI, 2007). As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma®) e diluídas com caldo Brain Heart Infusion (Difco®). Em seguida, doze concentrações dos compostos foram testadas variando de 0,195 a 400 µg / mL em uma microplaca de 96 poços.

A bactéria *S. aureus* (ATCC BAA44) utilizada neste estudo foi obtida na American Type Culture Collection (ATCC). Os inóculos foram ajustados para dar uma concentração de células de 5×10^5 CFU / mL.

As placas contendo as bactérias foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, 30 µL de solução aquosa de resazurina (Sigma®) a 0,02% foram adicionados a cada poço, para revelar o crescimento bacteriano (SARKER et al.,2007). As cores azul

e rosa representam a ausência e a presença de crescimento microbiano, respectivamente. DMSO 5% (v / v) foi empregado como controle negativo. O controle positivo foi com vancomicina (0,0115 a 5,9 µg / mL) contra a cepa resistente e tetraciclina (0,0115 a 5,9 µg / mL) para cepa suscetível. Um inóculo foi incluído para monitorar o crescimento bacteriano. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.3.4 Atividade antibacteriana contra cepa de *H. pylori* (ATCC 43526)

Laboratório de Testes Antimicrobianos, Instituto Ciências Biomédicas – UFU Câmpus Uberlândia - MG

Prof. Responsável: Dr. Carlos Henrique G. Martins

A atividade contra *Helicobacter pylori* foi avaliada de acordo com Spósito e colaboradores, (2019). O ensaio de microdiluição em caldo utilizou meio Mueller Hinton suplementado com 10% de soro fetal bovino. As substâncias foram solubilizadas em DMSO em placas de 96 poços em concentrações variando de 0,195 a 400 µg / mL. A concentração do inóculo foi ajustada para 5×10^5 CFU / mL. As placas foram preparadas em triplicata e incubadas a 37 °C por três dias em uma atmosfera contendo 10% de CO₂. DMSO (Merck - 5% v / v) e tetraciclina (Sigma - 0,0115 a 5,9 µg / mL) foram usados como controle negativo e controle positivo, respectivamente. Uma solução aquosa de resazurina (Sigma) (30 µL, 0,01%) foi adicionada a cada poço para avaliação visual. A presença de coloração rosa indicou a presença de células metabolicamente ativas, enquanto a presença de coloração azul indicou células metabolicamente inviáveis (SAKER et al., 2007). A concentração mais baixa em que foi observada mudança de cor foi considerada como o valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Três experimentos independentes foram realizados.

6.3.5 Atividade antibacteriana contra cepa resistente Gram-positivas e Gram-negativas

Laboratório de Testes Antimicrobianos, Instituto Ciências Biomédicas – UFU Câmpus Uberlândia - MG

Prof. Responsável: Dr. Carlos Henrique G. Martins

A concentração inibitória mínima (CIM) contra espécies bacterianas *Escherichia coli* (BAA198) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Enterococcus faecium* (ATCC 700221) foi determinada em triplicata usando o método de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços, conforme relatado anteriormente, usando resazurina como indicador colorimétrico de viabilidade celular (LEANDRO et al., 2014). O composto foi dissolvido em DMSO a 1 mg/mL, seguido de diluição em infusão de cérebro e coração para atingir as concentrações finais variando de 400,0 a 0,195 µg/mL. O teor final de DMSO foi de 5% (v / v), e esta solução foi utilizada como controle negativo. O inóculo foi ajustado para cada microrganismo para atingir uma suspensão celular de $5,0 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), conforme preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute, com modificações no meio de cultura (CLSI, 2012). Controle de crescimento (poço inoculado) e controle de esterilidade (poço não inoculado livre de agente antimicrobiano) também foram incluídos. A tetraciclina e a vancomicina foram usadas como controle positivos em concentrações variando de 0,0115 µg/mL a 5,9 µg/mL e 0,115 a 59 µg/mL, respectivamente. As microplacas de 96 poços foram seladas com filme plástico e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, 30 µL de solução aquosa de resazurina (0,02%) foi adicionado às microplacas e incubado por 15 minutos a 37 °C. O valor da CIM foi definido como a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo indicado pela mudança de cor da resazurina de azul para rosa.

6.4 Ensaio de permeação em membrana de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)

Departamento de Bioquímica e Microbiologia IB – UNESP Câmpus de Rio Claro

Prof. Responsável: Dr. Henrique Ferreira

A bactéria utilizada neste experimento foi *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e as células foram cultivadas em TSA sólido (caldo de soja triptona) ou caldo TSA a 36 ± 1 °C, agitado a 200 rpm. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizada foi o valor

apresentado na (tabela 4). *S. aureus* a 10^6 UFC mL⁻¹ foram expostos ao composto na CIM por 15 minutos em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL com 100 µL de meio TSA. Em seguida, 900 µL de meio TSA foram adicionados a cada tubo para diluir o composto e interromper ação antibacteriana (DILARRI et al., 2021). Portanto a célula bacteriana foi tratada com o composto GRM 12 utilizando a CIM 2 µg/mL (6µM) por 15 minutos, bem como nisina (controle positivo), um antibiótico que age na membrana bacteriana, tendo como ação a formação de poros (WIEDEMANN et al., 2004). Dois corantes também foram acrescentados o fluorescente iodeto de propídio (PI) que coram células com membranas rompidas (em vermelho) e SYTO9 coram membranas intactas (em azul) (NAVARRO et al., 2020).

As células foram coradas com o kit Live/Dead BacLight (Thermo-Scientific L7012), que é composto por dois corantes de ácido nucleico, sendo o SYTO9 (cora todas as células - Azul) e o iodeto de propídio (PI) (penetra apenas em células com membranas danificadas - Vermelho) (Savietto et al., 2018). As células coradas foram imobilizadas em lâminas revestida-agarose conforme descrito por Martins et al. (2010). O controle negativo (células com membrana intacta) foram as células no meio sem contato de qualquer composto, e o controle positivo (células com ruptura em sua membrana) foram células de *S. aureus* expostas à nisina (SIGMA N5764) (KRÓL et al., 2015). A análise microscópica foi feita com um microscópio Olympus BX-61, equipado com uma câmera monocromática OrcaFlash-2.8, auxiliado pelo software CellSens versão 11.

6.5 Ensaio antibiofilme

Laboratório de Testes Antimicrobianos, Instituto Ciências Biomédicas – UFU Câmpus Uberlândia – MG.

Prof. Responsável: Dr. Carlos Henrique G. Martins

A inibição de GRM12 contra a formação de biofilme contra *Escherichia coli* (BAA198), *Enterococcus faecium* (ATCC 700221), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ATCC BAA 44) e *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina (ATCC 6538) e *Enterococcus faecium* (ATCC 700221), foi avaliada usando a metodologia de microdiluição em caldo proposta por CLSI

(2012). A concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB) foi estabelecida como a concentração que o GRM12 foi capaz de inibir 50% ou mais da formação de biofilme. Os valores de CIMB foram determinados usando dois protocolos, incluindo avaliação de biomassa por leitura de densidade óptica (OD) e determinação de células viáveis de biofilme por contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Duas microplacas foram usadas para cada protocolo. Os ensaios foram realizados em triplicado em três experiências independentes. A concentração de inóculo e o tempo de incubação ideal para este ensaio foram determinados pela padronização da formação de biofilme.

Em microplacas de fundo plano de 96 poços contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com 2% de glicose, diluições seriadas das amostras foram feitas a partir da solução estoque (1600 µg/mL), obtendo-se uma concentração final entre 0,195 a 400 µg/mL. A partir de uma cultura de 24 h em placas de ágar BHI, o inóculo da respectiva bactéria foi preparado em caldo BHI suplementado com 2% de glicose, com turbidez equivalente em espectrofotômetro operando a 625nm, para igualar 0,5 na escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). As suspensões bacterianas foram diluídas até a concentração final de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24h. Subsequentemente, o conteúdo dos poços foi aspirado e as células não aderidas foram removidas por lavagem com um tampão salino tamponado com fosfato (PBS) (pH = 7,2). O biofilme formado foi fixado com metanol por 15 min, seco à temperatura ambiente e corado com solução de cristal violeta (0,2%) por 20 min. Após a remoção do cristal e lavagem dos poços com o tampão PBS, adicionou-se ácido acético a 33% por 30 min para solubilizar o cristal retido no biofilme. A absorbância dos poços foi determinada em espectrofotômetro a 595nm. A determinação do CIMB foi realizada por meio da Equação (2) (WEI et al., 2006; VIEIRA et al., 2018).

$$\text{CIMB} = (A_{595} \text{ do teste} \div A_{595} \text{ do controle não tratado}) \times 100$$

Para a determinação de células viáveis, as placas foram preparadas seguindo a mesma metodologia descrita acima. Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado com tampão PBS para remover as células não aderidas. Em seguida, 200 µL de caldo BHI com 2% de glicose foram adicionados aos poços e a microplaca foi submetida a banho de ultrassom por 15 min. O conteúdo dos poços foi homogeneizado e foram realizadas diluições decimais (100 a 10^{-7}). Em seguida, alíquotas de 50 µL de cada diluição foram semeadas em placas de ágar BHI e incubadas

a 37°C por 24 h. Por fim, as colônias foram contadas e os resultados foram expressos em escala $\log_{10}$ (UFC/mL).

A vancomicina e tetraciclina foram utilizadas como controle positivo e testadas em concentrações variando de 0,0115 a 5,9 $\mu\text{g/mL}$. As células bacterianas foram avaliadas na ausência dos compostos antibacterianos e foram utilizadas como controle negativo. Os dados do ensaio de antibiofilme foram analisados pela análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis unidirecional (ANOVA) com um teste de comparação de pares de Steel-Dwass-Critchlow-Fligner. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$.

6.6 Cinética bacteriana

Laboratório de Testes Antimicrobianos, Instituto Ciências Biomédicas – UFU Câmpus Uberlândia – MG

Prof. Responsável: Dr. Carlos Henrique G. Martins

Os ensaios de curva de tempo de morte foram realizados em triplicata com base em D'Arrigo e colaboradores (2010) contra as bactérias *Escherichia coli* (BAA198), *Enterococcus faecium* (ATCC 700221), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ATCC BAA 44) e *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina (ATCC 6538). O composto GRM 12 foi escolhido para os ensaios de curva de tempo de morte porque apresentou a mais potente atividade antimicrobiana.

Os tubos contendo o GRM12 em concentrações finais de uma e duas vezes a CIM foram inoculados com o microrganismo testado e depois incubados a 37 °C.

As amostras foram retiradas para determinação de cepas viáveis em 0, 0,5, 2, 4, 8, 12, 16 e 24 horas após a incubação, seguida de diluição, quando necessário, em meio fresco estéril.

As amostras diluídas (50 μL) foram espalhadas em placa de ágar de infusão de cérebro e coração, incubadas a 37°C e contadas após 24 h. As curvas de tempo de morte foram construídas traçando $\log_{10}$ UFC mL^{-1} versus tempo.

Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração e para os controles positivos (tetraciclina, 0,36 $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$ e vancomicina, 0,73 $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$) e

negativos (suspensão de bactérias sem adição de compostos). Tetraciclina e vancomicina foram usadas em seu valor de CIM.

6.7 Ensaio toxicidade contra queratinócitos humanos (HaCaT)

Laboratório de Cultura de Células (FOA) – UNESP Câmpus Araçatuba – SP

Profa. Responsável: Dra. Cristiane Duque

Os queratinócitos humanos (HaCaT) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), a penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), e 2 mmol/L de glutamina e incubadas em uma incubadora contendo 5% de CO₂ a 37 °C, sendo subcultivado a cada 2 dias. As células foram semeadas ($1-5 \times 10^5$ células/poço) e pré-incubadas por 24 horas. Após esse período, as células foram tratadas com os compostos diluídos em série (de 312 a 4,87 µg/mL) em microplacas de 96 poços por 24 horas. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e as células foram incubadas com resazurina (70 µM, Sigma Aldrich) no meio de cultura e mantidas por 4h em incubadora. A absorbância foi então lida a 570 nm e 600 nm em um espectrofotômetro (Biotek, Winooski, VT). Os valores foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular considerando o crescimento em (DMEM) como 100% e as médias determinadas para cada grupo.

6.7.1. Ensaio de toxicidade contra *Galleria mellonella*

Laboratório de biociência – Universidade de Cuiabá - MT

Profa. responsável: Dra. Janaina de Cássia Orlandi Sardi

Para verificar a toxicidade do composto GRM 12, realizou-se o ensaio de toxicidade aguda em modelo in vivo com larvas *Galleria mellonella*.

O experimento foi feito de acordo com a metodologia descrita em De Barros e colaboradores (2021). Larvas de *G. mellonella* foram criadas em insetário na Universidade de Cuiabá, sendo utilizadas as larvas em estágio final de instar. Larvas aleatórias com massa entre 200 e 300 mg, sem sinais de melanização (coloração escura),

foram utilizadas em grupos para cada tratamento. As larvas foram mantidas em placas de Petri. Os tratamentos consistiram no composto GRM12 nas concentrações de 500, 250 100 e 50 µg/mL em salina 0,9% estéril e o controle negativo foi feito com salina estéril e o controle de morte em DMSO 100%. Para cada tratamento e controle foram utilizadas 10 larvas e em triplicatas. Com uma seringa de 10 µL (Hamilton, Reno, NV), as larvas receberam a injeção sistêmica de 10 µL na última proleg (pro pata-falsa pata) esquerda. Após a injeção, foram mantidas a 30 °C e sua sobrevivência foi monitorada em intervalos selecionados até 72 horas. As larvas foram consideradas mortas quando ficavam imóveis ao toque e apresentavam alto nível de melanização.

REFERÊNCIA

- ABD-ALWAHAB, M. H.; ALI, K. F.; JWAID, M. M. Synthesis, Antibacterial study and ADME Evaluation of Novel Isonicotinoyl Hydrazide Derivative Containing 1, 3, 4-Oxadiazole Moiety. Al-Mustansiriyah **Journal for Pharmaceutical Sciences** 20(4) – 2020.
- ABDULLAHI, M.; ADENIJI, S. E. In-silico molecular docking and ADME/pharmacokinetic prediction studies of some novel carboxamide derivatives as anti-tubercular agents. **Chemistry Africa**, 3(4), 989-1000 – 2020.
- AFONSO, I. F. **Modelagem molecular e avaliação da relação estrutura-atividade acoplados a estudos farmacocinéticos e toxicológicos in silico de derivados heterocíclicos com atividade antimicrobiana**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ - 2009.
- AGRAWAL, D. K., SAIKIA, D., TIWARI, R., OJHA, S., SHANKER, K., KUMAR, J. K., ... & KHANUJA, S. P. S. Demethoxycurcumin and its semisynthetic analogues as antitubercular agents. **Planta medica**, 74(15), 1828-1831 – 2008.
- ALVES, J. A., ABRÃO, F., SILVA MORAES, T. D., DAMASCENO, J. L., DOS SANTOS MORAES, M. F., SOLA VENEZIANI, R. C., & GOMES MARTINS, C. H. Investigation of Copaifera genus as a new source of antimycobacterial agents. **Future Science OA**, 6(7), FSO587 – 2020.
- ANDRADE, J. T., ALVES, S. L. G., LIMA, W. G., SOUSA, C. D. F., CARMO, L. F., DE SÁ, N. P., ... & FERREIRA, J. M. S. Pharmacologic potential of new nitro-compounds as antimicrobial agents against nosocomial pathogens: design, synthesis, and in vitro effectiveness. **Folia Microbiol** vol. 65(2), 393-405 – 2020.
- ANAND, P., KUNNUMAKKARA, A. B., NEWMAN, R. A., & AGGARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular pharmaceutics**, 4(6), 807-818 – 2007.
- AKIYAMA, K., MIZUNO, S., HIZUKURI, Y., MORI, H., NOGI, T., and AKIYAMA, Y. Roles of the membrane-reentrant β -hairpin-like loop of RseP protease in selective substrate cleavage. **Elife** Vol.4 08928 - 2015.
- AL-TRAHNEH, S. A., EL-ABADELAH, M. M., AL-ABADLEH, M. M., ZANI, F., INCERTI, M., & VICINI, P. A new efficient route to 7-aryl-6-fluoro-8-nitroquinolones as potent antibacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 86, 364-367 – 2014.
- ALLEGRA, E., TITBALL, R. W., CARTER, J., & CHAMPION, O. L. Galleria mellonella larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. **Chemosphere**, 198, 469-472 – 2018.
- ARAÚJO, C. A. C.; e LEON, L. L., Biological activities of Curcuma longa L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 96(5), 723-728 - 2001.
- ARCHER, N. K.; MAZAITIS, M. J.; COSTERTON, J. W.; LEID, J. G.; POWERS, M. E.; SHIRTLIFF, M. E. Staphylococcus aureus biofilms Properties, regulation and roles in human disease. **Virulence - Special Focus Review: Biofilms**, vol. 2, no. 5, 2011.
- ARNOTT, J. A., & PLANEY, S. L. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. **Expert opinion on drug discovery**, 7(10), 863-875 – 2012.
- AYUSSO, G. M. **Síntese e Avaliação de Análogos Monocetônicos de Curcumina como Potenciais Agentes contra a Tuberculose**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, p. 171 - 2019.

BAHAROGLU, Z., & MAZEL, D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. **FEMS microbiology reviews**, 38(6), 1126-1145 – 2014.

BAKCHI, B.; KRISHNA, A. D.; SREECHARAN, E.; GANESH, V. B. J.; NIHARIKA, M.; MAHARSHI, S.; SHAIK, A. B. An Overview on Applications of SwissADME Web Tool in the Design and Development of Anticancer, Antitubercular and Antimicrobial agents: A Medicinal Chemist's Perspective. **Journal of Molecular Structure**, 132712 - 2022.

BALDWIN, P. R.; REEVES, A. Z.; POWELL, K. R.; NAPIER, R. J.; SWIMM, A. I.; SUN, A.; GIESLER, K.; BOMMARIUS, B.; SHINNICK, T. M.; SNYDER, J. P.; LIOTTA, D. D.; KALMAN, D. Monocarbonyl analogs of curcumin inhibit growth of antibiotic sensitive and resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 693-699, 2015.

BÆK, K. T., GRÜNDLING, A., MOGENSEN, R. G., THØGERSEN, L., PETERSEN, A., PAULANDER, W., and FREES, D., β -Lactam resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 is increased by inactivation of the ClpXP protease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 58(8), 4593-4603 – 2014.

BAHAROGLU, Z., MAZEL, D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. **FEMS microbiology reviews**, v. 38, n. 6, pág.1126-1145 - 2014.

BAELL, J. B., HOLLOWAY, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. **Medicinal Chemistry Journal** 53, 2719–2740 - 2010.

BELLIO, P.; BRISDELLI, F.; PERILLI, M.; SABATINI, A.; BOTTONI, C.; SEGATORE, B.; SETACCI, D.; AMICOSANTE, G; and CELENZA, G. Curcumin inhibits the SOS response induced by levofloxacin in Escherichia coli. **Phytomedicine**, 21(4), pp.430-434 – 2014.

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química nova**, v. 25, p. 1172-1180 - 2002.

BARRY, J., FRITZ, M., BRENDER, J. R., SMITH, P. E. S., LEE, D.-K., RAMAMOORTHY, A. Determining the Effects of Lipophilic Drugs on Membrane Structure by Solid-State NMR Spectroscopy: The Case of the Antioxidant Curcumin. **J. Am. Chem. Soc.**, 131, 4490 - 4498 – 2009.

BERNARDO, K., PAKULAT, N., FLEER, S., SCHNAITH, A., UTERMÖHLEN, O., KRUT, O., ... & KRÖNKE, M. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce Staphylococcus aureus virulence factor expression. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, vol. 48(2), 546-555 – 2004.

BERNARDINI, S., TIEZZI, A., LAGHEZZA V. M. and OVIDI, E. Natural products for human health: An historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1926–1950 - 2018.

BESCOS, R.; ASHWORTH, A.; CUTLER, C.; BROOKES, Z. L.; BELFIELD, L.; RODILES, A.; CASAS-AGUSTENCH, P.; FARNHAM, G.; LIDDLE, L.; BURLEIGH, M.; WHITE, D.; EASTON, C.; HICKSON, M. Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, p. 1–8, 2020.

BOCIAN-OSTRZYCKA, K. M., GRZESZCZUK, M. J., BANAS, A. M., JASTRZĄB, K., PISARCZYK, K., KOLARZYK, A., & JAGUSZTYN-KRYNICKA, E. K.Engineering of Helicobacter pylori dimeric oxidoreductase Dsbk (HP0231). **Frontiers in microbiology** vol. 7, 1158 – 2016.

BHAMBRA, A. S., RUPARELIA, K. C., TAN, H. L., TASDEMIR, D., BURRELL-SAWARD, H., YARDLEY, V., & ARROO, R. R. Synthesis and antitrypanosomal activities of novel pyridylchalcones. **European journal of medicinal chemistry**, 128, 213-218 – 2017.

- BRADLEY, S. F. MRSA colonisation (eradicating colonisation in people without active invasive infection, **BMJ clinical evidence**, 2015.
- BRACKMAN, G., & COENYE, T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. **Current pharmaceutical design**, 21(1), 5-11 – 2015.
- BROWN, E.D. and WRIGHT, G.D. Discovery of antibacterial drugs in the age of resistance. **Nature** 529 (7586), 336-343 – 2016.
- CLSI Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard- Seventh Edition , vol.27 Number 2 Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; **Approved Standard-Seventh Edition, Replace**. M11-A6, 27 - 2007.
- COSTA, S. B., CAMPOS, A. C. C., PEREIRA, A. C. M., DE MATTOS-GUARALDI, A. L., JUNIOR, R. H., ROSA, A. C. P., & ASAD, L. M. Adherence to abiotic surface induces SOS response in *Escherichia coli* K-12 strains under aerobic and anaerobic conditions. **Microbiology**, 160(9), 1964-1973 – 2014.
- CUSSOLIM, P. A., & JUNIOR, A. S. Mecanismos de resistência do *Staphylococcus aureus* a antibióticos. **Revista Faculdades do Saber**, vol. 6(12), 831-843 – 2021
- CHANGTAM, C., HONGMANEE, P., & SUKSAMRARN, A. Isoxazole analogs of curcuminoids with highly potent multidrug-resistant antimycobacterial activity. **European journal of medicinal chemistry**, 45(10), 4446-4457 – 2010.
- CHATTERJEE, I., BECKER, P., GRUNDMEIER, M., BISCHOFF, M., SOMERVILLE, G.A., PETERS, G. & HERRMANN, M. *Staphylococcus aureus* ClpC is required for stress resistance, aconitase activity, growth recovery, and death. **Journal of bacteriology**, 187 (13), 4488-4496 – 2005.
- CHAREST, M. G., SIEGEL, D. R., & MYERS, A. G. Synthesis of (–)-tetracycline. *Journal of the American Chemical Society*, 127(23), 8292-8293 – 2005.
- CLATWORTHY, A. E., PIERSON, E., and HUNG, D.T. Visando a virulência: um novo paradigma para a terapia antimicrobiana. **Nat. Química Biol.** 3, 541-548 – 2007.
- CROWE, S. E. Infecção por *Helicobacter pylori*. **New England Journal of Medicine**, 380 (12), 1158-1165 – 2019.
- DAINA, A., ZOETE, V. A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. **ChemMedChem**, v. 11, n. 11, p. 1117 - 2016.
- DAINA, A., MICHIELIN, O., ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13 - 2017.
- DAHLIN, J. L.; INGLESE, J.; and WALTERS, M. A. Mitigating risk in academic preclinical drug discovery. **Nature reviews Drug discovery** 14(4), 279-294 – 2015.
- DE, R. et al. Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1592–1597 - 2009.
- DE LA CALLE, C.; MORATA, L.; COBOS-TRIGUEROS, N.; MARTINEZ, J. A.; CARDOZO, C.; MENSA, J.; AND SORIANO, A. *Staphylococcus aureus* bacteremic pneumonia. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, 35(3), 497-502 - 2016

DENIC, M., TOUATI, E., & DE REUSE, H. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter** vol. 25, e12736 – 2020.

DE KIEVIT TR, GILLIS R, MARX S, BROWN C, IGLEWSKI BH. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. **Applied and environmental microbiology**. Apr 1;67(4):1865-73 – 2001.

DURACKA, M.; LUKAC, N.; KACANIOVA, M.; KANTOR, A.; HLEBA, L.; ONDRUSKA, L.; and TVRDA, E. Antibiotics versus natural biomolecules: The case of in vitro induced bacteriospermia by *enterococcus faecalis* in rabbit semen. **Molecules**, 24(23), 4329 – 2019.

D'ARRIGO, M., GINESTRA, G., MANDALARI, G., FURNERI, P. M., & BISIGNANO, G. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Phytomedicine**, 17(5), 317-322 – 2020.

EGAN, W.J., MERZ, K.M., and BALDWIN, J.J., Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. **J. Med. Chem.** Vol. 433867-3877 - 2000.

EMIOLA, A., GEORGE, J., and ANDREWS, S. S. A complete pathway model for lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. **PloS One** Vol.10 (4), e0121216 – 2015.

ERTL, P., SCHUFFENHAUER, A. Estimation of synthetic accessibility score of drug-like molecules based on molecular complexity and fragment contributions. **Journal of cheminformatics**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2009.

ERMONDI, G., VALLARO, M., & CARON, G. Degradability early developability assessment: face-to-face with molecular properties. **Drug discovery today**, 25(9), 1585-1591 – 2020.

ESTEVE-PUIG, R., BUENO-COSTA, A., & ESTELLER, M. Writers, readers and erasers of RNA modifications in cancer. **Cancer letters**, 474, 127-137 – 2020.

FINCH, R.G., GREENWOOD, D., NORRIS, R. S., WHITLEY R. J. **Antibiotic and Chemotherapy** Book 9ª Edição, Sessão 2 – 2011.

FERNANDES, L. D. S. **Desenvolvimento, caracterização e comparação de formulações para aplicação tópica contendo curcumina: estudos de efetividade e segurança das formulações.** Dissertação (Mestre em ciências farmacêuticas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara – 2017.

FLUIT, A. C., FLORIJS, A., VERHOEF, J., & MILATOVIĆ, D. Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 49(4), 1636-1638 – 2005.

FREES, D., GERTH, U., and INGMER, H. Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, 304(2), 142-149 – 2014.

FLYNN, J.M., NEHER, S.B., KIM, Y.I., SAUER, R.T., & BAKER, T.A. A descoberta proteômica de substratos celulares da protease ClpXP revela cinco classes de sinais de reconhecimento de ClpX. **Molecular cell**. Vol.11 (3), 671-683 – 2003.

FLYNN, J.M., NEHER, S.B., KIM, Y.I., SAUER, R.T., & BAKER, T.A. A descoberta proteômica de substratos celulares da protease ClpXP revela cinco classes de sinais de reconhecimento de ClpX. **Molecular cell**. Vol.11 (3), 671-683 – 2003.

GAYANI, B.; DILHARI, A.; WIJESINGHE, G. K.; KUMARAGE, S.; ABAYAWEEERA, G.; SAMARAKOON, S. R.; and WEERASEKERA, M. M. Effect of natural curcuminoids-intercalated

layered double hydroxide nanohybrid against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterococcus faecalis*: a bactericidal, antibiofilm, and mechanistic study. **MicrobiologyOpen**, 8, 00723 – 2019.

GERACI, J. E., & WILSON, W. R. Vancomycin therapy for infective endocarditis. *Reviews of Infectious Diseases*, 3(Supplement_2), S250-S258 – 1981.

GERACI, J. E., HEILMAN, F. R., NICHOLS, D. R., WELLMAN, W. E., ROSS, G. T., & DOROTHY, R. Some laboratory and clinical experiences with a new antibiotic, vancomycin. In *Proc. Staff, Meetings Mayo Clinic* (Vol. 31, No. 21, pp. 564-82) – 1956.

GÓMEZ-GÓMEZ, J. M.; MANFREDI, C.; ALONSO, J. C.; and BLÁZQUEZ, J. A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *BMC biology*, 5(1), 1-15 – 2007.

GUPTA, S. C.; PRASAD, S.; KIM, J. H.; PATCHVA, S.; WEBB, L. J.; PRIYADARSINI, I. K.; and AGGARWAL, B. B. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. **Natural product reports**, 28(12), 1937-1955 – 2011.

GFELLER, D.; GROSDIDIER, A.; WIRTH, M.; DAINA, A.; MICHIELIN, O.; AND ZOETE, V. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. **Nucleic acids research**, 42(W1), W32-W38 – 2014.

GLASS - World Health Organization, Antimicrobial resistance global report on surveillance – Disponible en <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240027336>> 2021.

GHOSE, A.K., VISWANADHAN, V.N. & WENDOLOSKI, J.J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. **J Comb. Chem.** 1 55–68 - 1999.

GHOSE, A.K., HERBERTZ, T., SALVINO, J.M., & MALLAMO, J.P. Knowledge-based chemoinformatic approaches to drug discovery. **Drug discovery today**, vol.11 (23-24), 1107-1114 – 2006.

GROUNDWATER, P. W.; NARLAWAR, R.; LIAO, V. W. Y.; BHATTACHARYA, A.; SRIVASTAVA, S.; KUNAL, K.; and PANDA, D. A. Carbocyclic curcumin inhibits proliferation of Gram-positive bacteria by targeting FtsZ. **Biochemistry**, 56(3), 514-524 – 2017.

GROSS, P., & SMITH, R. P. Biologic activity of hydroxylamine: a review. *CRC critical reviews in toxicology*, 14(1), 87-99 – 1985.

GRIFFITH, R. S. Introduction to vancomycin. **Reviews of infectious diseases**, 3(Supplement_2), S200-S204 – 1981.

HAMPANNAVAR, G. A.; KARPOORMATH, R.; PALKAR, M. B.; SHAIKH, M. S. An appraisal on recent medicinal perspective of curcumin degradant: Dehydrozingerone (DZG). **Bioorg. Med. Chem.**, v. 24, p. 501–520, 2016.

HAWVER, L. A.; JUNG, S. A.; and NG, W. L. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS microbiology reviews*, 40(5), 738-752 – 2016.

HAY, M.; THOMAS, D. W.; CRAIGHEAD, J. L. Economides, C., & Rosenthal, J. Clinical development success rates for investigational drugs. **Nature biotechnology**, 32(1), 40-51 – 2014.

HEGER, M.; VAN GOLEN, R. F.; BROEKGAAARDEN, M.; MICHEL, M. C. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. **Pharmacol. Rev.**, v. 66, p. 222–307, 2014.

HENCHOZ, Y., BARD, B., GUILLARME, D., CARRUPT, P. A., VEUTHEY, J. L., & MARTEL, S. Analytical tools for the physicochemical profiling of drug candidates to predict absorption/distribution. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 394(3), 707-729 – 2009.

IZUI S, SEKINE S, MAEDA K, KUBONIWA M, TAKADA A, AMANO A, NAGATA H. Antibacterial activity of curcumin against periodontopathic bacteria. **Journal of periodontology**. Jan;87(1):83-90 – 2016.

JENKINS, H. E., TOLMAN, A. W., YUEN, C. M., PARR, J. B., KESHAVJEE, S., PÉREZ-VÉLEZ, C. M., ... & COHEN, T. Incidence of multidrug-resistant tuberculosis disease in children: systematic review and global estimates. **The Lancet**, 383(9928), 1572-1579 – 2014.

KHARAT, M. et al. Physical and chemical stability of curcumin in aqueous solutions and emulsions: Impact of pH, temperature, and molecular environment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 1525–1532, 2017.

KELDER, J., GROOTENHUIS, P. D., BAYADA, D. M., DELBRESSINE, L. P., & PLOEMEN, J. P. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. **Pharmaceutical research**, vol.16(10), 1514-1519 – 1999.

KIRSCH, V. C., FETZER, C., and SIEBER, S. A. Global Inventory of ClpP-and ClpX-Regulated Proteins in Staphylococcus aureus. **Journal of Proteome Research** Vol.20 (1), 867-879 – 2020.

KOBAYASHI, S. D. and DELEO, F. R. (2013). Staphylococcus aureus protein A promotes immune suppression. **MBio**, vol. 4(5), e00764-13 – 2013.

KOCK, H., GERTH, U., and HECKER, M. A peptidase ClpP é o principal determinante do turnover da proteína em massa em Bacillus subtilis. *Journal of bacteriology*, 186 (17), 5856-5864 – 2004.

KOKOULIN, M.S.; FILSHEIN, A.P.; ROMANENKO, L.A.; CHIKALOVETS, I.V.; CHERNIKOV, O.V. Estrutura e bioatividade de α -D-manano sulfatado de bactéria marinha Halomonas halocynthiae KMM 1376(T)' , **Carbohydr. Polím.** 229 , 115556 – 115562 – 2020.

KUBRA, I.R., BETTADAIAH, B.K., MURTHY, P.S., & RAO, L.J.M. Structure-function activity of dehydrozingerone and its derivatives as antioxidant and antimicrobial compounds. **Journal of food science and technology** 51 (2), 245-255 – 2014.

KHAN, A. M.; ABID, O. U. R.; MIR, S. Evaluation of the biological activities of chitosan based Schiff labeled with medicinal plants. **Biopolymers**. v. 111, n. 3, pág. e23338, 2020.

KRAUSZ, A. E.; ADLER, B. L.; CABRAL, V.; NAVATI, M.; DOERNER, J.; CHARAFEDDINE, R. A.; and FRIEDMAN, A. J. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(1), 195-206 – 2015.

LEANDRO, L. F., CARDOSO, M. J. O., SILVA, S. D. C., SOUZA, M. G. M., VENEZIANI, R. C. S., AMBROSIO, S. R., & MARTINS, C. H. G. Antibacterial activity of Pinus elliottii and its major compound, dehydroabietic acid, against multidrug-resistant strains. **Journal of medical microbiology**, 63(12), 1649-1653 – 2014.

LEE, J. K. AND ZHAO, H. Identification and characterization of the flavin:NADH reductase (PrnF) involved in a novel two-component arylamine oxygenase. **J. Bacteriol.**189:8556-8563 – 2007.

LEE, W.-H., ROHANIZADEH, R., LOO, C.-Y. In situ functionalizing calcium phosphate biomaterials with curcumin for the prevention of bacterial biofilm infections. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 206, p. 111938 - 2021.

LEO, A.; HANSCH, C.; ELKINS, D. Partition coefficients and their uses. **Chemical Reviews**, vol. 71, no. 6, p. 525–616 – 1971.

LIPINSKI, C.A., LOMBARDO, F., DOMINY, B.W. & FEENEY, P.J. Abordagens experimentais e computacionais para estimar a solubilidade e permeabilidade em configurações de desenvolvimento e descoberta de drogas. Adv. Medicamento. **Deliv. Rev.** 46. 26 - 2001.

LIN, L., SHI, Q., NYARKO, A. K., BASTOW, K. F., WU, C. C., SU, C. Y., SHIN, Y., CHARLES, C.Y., LEE, K. H. Antitumor agents. 250. Design and synthesis of new curcumin analogues as potential anti-prostate cancer agents. **Journal of medicinal chemistry**, 49(13), 3963-3972 – 2006.

LOVERING, F., BIKKER, J., HUMBLET, C. Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. **Journal of medicinal chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6752-6756 - 2009.

LOWY, F. Staphylococcus aureus infections. **New England Journal of Medicine**, vol. 339, p. 520–532, 1998.

ŁOPUSIEWICZ, Ł.; MACIEJA, S.; BARTKOWIAK, A.; and EL FRAY, M. Antimicrobial, Antibiofilm, and Antioxidant Activity of Functional Poly (Butylene Succinate) Films Modified with Curcumin and Carvacrol. **Materials**, 14(24), 7882 – 2021.

MACHEREY, A. C., & DANSETTE, P. M. Biotransformations leading to toxic metabolites: chemical aspect. **In The practice of medicinal chemistry** (pp. 674-696). Academic press – 2008.

MAHMUD, S., MITA, M.A., BISWAS, S., PAUL, G.K., PROMI, M.M., AFROSE, S., ... & SALEH, A. Estudo de docking e dinâmica molecular para explorar moléculas de ligantes fitoquímicos contra a protease principal do SARS-CoV-2 a partir de extensos conjuntos de dados fitoquímicos. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, 1-11- 2021.

MAJEED, M., BADMAEV, V., & MURRAY, F. Turmeric and the healing curcuminoids: Their amazing antioxidant properties and protective powers. **Keats Pub** – 1996.

MALIK, N., DHIMAN, P., & KHATKAR, A. In-silico design and ADMET studies of natural compounds as inhibitors of xanthine oxidase (XO) enzyme. *Current Drug Metabolism*, 18(6), 577-593 – 2017.

MANNHOLD, R., PODA, G. I., OSTERMANN, C., & TETKO, I. V. Calculation of molecular lipophilicity: State-of-the-art and comparison of log P methods on more than 96,000 compounds. **Journal of pharmaceutical sciences**, 98(3), 861-893 – 2009.

MARINI, E., DI GIULIO, M., MAGI, G., DI LODOVICO, S., CIMARELLI, M. E., BRENCIANI, A., & FACINELLI, B. Curcumin, an antibiotic resistance breaker against a multiresistant clinical isolate of *Mycobacterium abscessus*. **Phytotherapy research**, 32(3), 488-495 – 2018.

MIGUELEZ, J., BOTO, A., MARÍN, R., DÍAS, M. Simplification of antitumoral phenanthroindolizidine alkaloids: Short synthesis of cytotoxic indolizidinone and pyrrolidine analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, p. 540–554 - 2013.

MOGHADAMTOUSI, S. Z., KADIR, H. A., HASSANDARVISH, P., HASSAN, T., ABUBAKAR, S., & ZANDI, K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. **BioMed research international**, pág.12 - 2014.

MORÃO, L. G., POLAQUINI, C. R., KOPACZ, M., TORREZAN, G. S., AYUSSO, G. M., DILARRI, G., CAVALCA, L. B., ZIELINSKA, A. SCHEFFERS, D.J., REGASINI, L.O., FERREIRA, H. A simplified curcumin targets the membrane of *Bacillus subtilis*. **MicrobiologyOpen**, 8(4), e00683. 2019.

MORENO-CINOS, C., GOOSSENS, K., SALADO, G.I., VEKEN, P. V. D., WINTER, H., E AUGUSTYNS, K. ClpP protease, a promising antimicrobial target. **International Journal of Molecular Science** vol.20:2232 – 2019.

MOSLEY CA, LIOTTA DC, SNYDER JP. Highly active anticancer curcumin analogues. **The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease**. 2007:77-103 – 2007.

MUEGGE, I., HEALD, S.L. & BRITTELLI, D. Critérios de seleção simples para matéria química semelhante a drogas. **J. Med. Chem.** 44 1841–1846 - 2001.

MUN, S. H., JOUNG, D. K., KIM, Y. S., KANG, O. H., KIM, S. B., SEO, Y. S., ... & KWON, D. Y. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, vol. 20(8-9), 714-718 - 2013

MUN, S. H., KIM, S. B., KONG, R., CHOI, J. G., KIM, Y. C., D. W. SHIN, D. W., KANG, O. H., KWON, D. Y. Curcumin reverse methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Molecules** 19,18283–18295- 2014.

NAVARRO, M. O. P.; DILARRI, G.; SIMIONATO, A. S.; GRZEGORCZYK, K., DEALIS; M. L.; CANO, B. G.; and ANDRADE, G. Determining the Targets of Fluopsin C Action on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, 11, 1076 – 2020.

NITSCHKE, C. Dengue, West Nile and Zika virus proteases as drug targets. **Biophys Reviews** vol.11, 157-165- 2019.

NIAMSA, N.; and SITTIWET, C. "Antimicrobial activity of *Curcuma longa* aqueous extract. **Journal of Pharmacology and Toxicology** 4, no. 4. 173-177 – 2009.

OLLINGER, J., O'MALLEY, T., KESICKI, E.A., ODINGO, J., & PARISH, T. Validation of the essential ClpP protease in *Mycobacterium tuberculosis* as a novel drug target. **Journal of bacteriology** 194 (3), 663-668 – 2012.

NISHINO, S. F., & SPAIN, J. C. Catabolism of nitroaromatic compounds. In *Pseudomonas* (pp. 575-608). **Springer**, Boston, MA – 2004.

O'SULLIVAN, J., FERREIRA, M. T., GAGNÉ, J. P., SHARMA, A. K., HENDZEL, M. J., MASSON, J. Y., & POIRIER, G. G. (2019). Emerging roles of eraser enzymes in the dynamic control of protein ADP-ribosylation. **Nature communications**, vol.10 (1), 1-14 – 2019.

OECD. OECD117 guideline for testing of chemicals: Partitioning coefficient (n-octanol/water) HPLC method. , p. 1–11, 1989.

PACKIAVATHY, I. A. S. V., PRIYA, S., PANDIAN, S. K., RAVI, A. V. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin – An anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. **Food Chemistry**, Voi.148, Pages 453-460 2014.

PAETZEL, M., KARLA, A., STRYNADKA, N. C., and DALBEY, R. E. Signal peptidases **Chemical reviews**, 102(12), 4549-4580 – 2002.

PALOMINO, J. C. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PARASKEVOPOULOS, G., KRÁTKÝ, M., MANDÍKOVÁ, J., TREJTAR, F., STOLARÍKOVÁ, J., PÁVEK, P., & VINŠOVÁ, J. Novel derivatives of nitro-substituted salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 23(22), 7292-7301 – 2015.

PICCIRILLO, E., AMARAL, A. T. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. **Química Nova**, v. 41, p. 662-677 – 2018.

- PODUNAVAC-KUZMANOVIĆ, S. O.; CVETKOVIĆ, D. D.; BARNA, D. J. The effect of lipophilicity on the antibacterial activity of some 1-benzylbenzimidazole derivatives. **Journal of the Serbian Chemical Society**, vol. 73, no. 10, p. 967–978, 2008.
- POLAQUINI, C. R., MORAO, L. G., NAZARE, A. C., TORREZAN, G. S., DILARRI, G., CAVALCA, L. B., ... & REGASINI, L. O. Antibacterial activity of 3, 3'-dihydroxycurcumin (DHC) is associated with membrane perturbation. **Bioorganic Chemistry**, 90, 103031 – 2019.
- POLAQUINI, C. R., MARQUES, B. C., AYUSSO, G. M., MORAO, L. G., SARDI, J. C., CAMPOS, D. L., ... e REGASINI, L. O. Antibacterial activity of a new monocarbonyl analog of curcumin MAC 4 is associated with divisome disruption. **Bioorganic Chemistry**, 109, 104668 – 2021.
- PAYNE, D.J., GWYNN, M.N., HOLMES, D.J. E POMPLIANO, D.L. Medicamentos para insetos ruins: enfrentando os desafios da descoberta de antibacterianos. **Nat. Rev. Drug Descov.** 6, 29-40 – 2007.
- PRICE, E., KALVASS, J. C., DEGOEY, D., HOSMANE, B., DOKTOR, S. and DESINO, K. Análise global de modelos para prever a absorção humana: QSAR, modelos in vitro e pré-clínicos. **Journal of Medicinal Chemistry** 64 (13), 9389-9403 – 2021.
- RAEVSKY, O.A. Physicochemical Descriptors in Property-Based Drug Design, **Mini Rev. Med. Chem.**, vol. 4,número 10, pp.1041-1052(12) - 2004.
- RITCHIE, T. J., ERTL, P., LEWIS, R. The graphical representation of ADME-related molecule properties for medicinal chemists. **Drug Discovery Today**, vol. 16, n. 1-2, p. 65-72, 2011.
- SARDI, J. D. C. O., POLAQUINI, C. R., FREIRES, I. A., DE CARVALHO GALVAO, L. C., LAZARINI, J. G., TORREZAN, G. S., ... & ROSALEN, P. L. Antibacterial activity of diacetylcurcumin against *Staphylococcus aureus* results in decreased biofilm and cellular adhesion. **Journal of medical microbiology**, 66(6), 816-824 – 2017.
- SANTOS, E. B.; FREITAS, B. D. S. **Docking molecular da proteína Quinase ativada por AMP (AMPK): caracterização in silico das principais propriedades referentes à interação proteína-ligante.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural da Amazônia -AM UFRA - 2018.
- SARKER, S.D., NAHAR, L., KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals *Methods*, 42, pp. 321-324 – 2007.
- SELVAKUMAR, B. e VENKATARAMAN, R. (2010). Synthesis and biological evaluation of some curcumin analogs and their derivatives. **Rasāyan J. Chem**, 3, 260-265, 2010.
- SELVAM, C.; PRABU, S. L.; JORDAN, B. C.; PURUSHOTHAMAN, Y.; UMAMAHESWARI, A.; ZARE, M. S. H.; & THILAGAVATHI, R. Molecular mechanisms of curcumin and its analogs in colon cancer prevention and treatment. **Life sciences**, 239, 117032 – 2019.
- SINGH, A. K., YADAV, P., KARAUlia, P., SINGH, V. K., GUPTA, P., PUTTREVU, S. K., & DASGUPTA, A. Biological evaluation of novel curcumin–pyrazole–mannich derivative active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Future Microbiology**, 12(15), 1349-1362 – 2017.
- SOHN, S. I.; PRIYA, A.; BALASUBRAMANIAM, B.; MUTHURAMALINGAM, P.; SIVASANKAR, C.; SELVARAJ, A.; and PANDIAN, S. Biomedical Applications and Bioavailability of Curcumin - **An Updated Overview. Pharmaceutics**, 13(12), 2102 – 2021.
- SOOD, S., MALHOTRA, M., DAS, B. K., & KAPIL, A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. **Indian journal of medical research**, 128(2), 111 – 2008.

- SPÓSITO, L., ODA, F.B., VIEIRA, J.H., CARVALHO, F.A., RAMOS, R.M.A., CASTRO, R.C., CREVELIM, E.J., CROTTI, A.E.M., SANTOS, A.G., SILVA, P.B., CHORILLI, M., BAUAB, T.M. In vitro and in vivo anti-*Helicobacter pylori* activity of *Casearia sylvestris* leaf derivatives, J. **Ethnopharmacol.** 1–12 233 - 2019.
- SUETH-SANTIAGO, V., MENDES-SILVA, G. P., DECOTÉ-RICARDO, D., E LIMA, M. E. F. D. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, 38 (4), 538-552. 2015.
- SUI Z, SALTO R, LI J, CRAIK C, DE MONTELLANO P. R. Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by curcumin and curcumin boron complexes. **Bioorganic & medicinal chemistry**. Dec 1;1(6):415-22 – 1993.
- SUMRRA, S. H., & CHOCHAN, Z. H. In vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of some triazole Schiff bases and their oxovanadium (IV) complexes. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, 28(6), 1291-1299 – 2013.
- SUN, Y., LEE, C. C., HUNG, W. C., CHEN, F. Y., LEE, M. T., & HUANG, H. W. The bound states of amphiphathic drugs in lipid bilayers: study of curcumin. **Biophysical journal**, vol. 95(5), 2318-2324 – 2008.
- SUN, N.; CHAN, F. Y.; LU, Y. J.; NEVES, M. A.; LUI, H. K.; WANG, Y.; and WONG, K. Y. Rational design of berberine-based FtsZ inhibitors with broad-spectrum antibacterial activity. **PloS one**, 9(5), e97514 – 2014.
- SHARMA, G.; RATURI, K.; DANG, S.; GUPTA, S.; and GABRANI, R. Combinatorial antimicrobial effect of curcumin with selected phytochemicals on *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Asian natural products research**, 16(5), 535-541 – 2014.
- SHAROM, F. J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. **Pharmacogenomics** vol. 9, 105–127 - 2008.
- SMITH, R. M., JOSLYN, D. A., GRUHZIT, O. M., MCLEAN JR, I. W., PENNER, M. A., & EHRLICH, J. Chloromycetin: biological studies. **Journal of bacteriology**, 55(3), 425-448 – 1948.
- SPAIN, J. C. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annual review of microbiology*, 49(1), 523-555 – 1995.
- STRUGEON, E.; TILLOY, V.; PLOY, M. C.; and DA RE, S. The stringent response promotes antibiotic resistance dissemination by regulating integron integrase expression in biofilms. **MBio**, 7(4), e00868-16 – 2016.
- SZAKÁCS, G., VÁRADI, A., OZVEGY-LACZKA, C., SARKADI, B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). **Drug Discovery Today** vol. 13, 379–393 - 2008.
- RAGHU, M. S.; PRADEEP KUMAR, C. B.; PRASAD, K. N. N.; PRASHANTH, M. K.; KUMARSWAMY, Y. K.; CHANDRASEKHAR, S.; and VEERESH, B. MoS₂-Calixarene Catalyzed Synthesis and Molecular Docking Study of 2, 4, 5-Trisubstituted Imidazoles As Potent Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. **ACS Combinatorial Science**, 22(10), 509-518 – 2020.
- RAI, D.; SINGH, J. K.; ROY, N.; and PANDA, D. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. **Biochemical Journal**, 410(1), 147-155 – 2008.
- RAJAGOPAL, M.; WALKER, S. Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. In *Protein and Sugar Export and Assembly in Gram-Positive Bacteria*; Bagnoli, F., Rappuoli, R., Eds.; Current Topics in Microbiology and Immunology; **Springer International Publishing: Cham, Switzerland**. pp. 1–44. ISBN 978-3-319-56014-4 – 2017.

RAJU, R. M., GOLDBERG, A. L., RUBIN, E. J., Bacterial proteolytic complexes as therapeutic targets. **Nature reviews drug Discovery** 11(10), 777-789 – 2012.

RAMESH, D.; JOJI, A.; VIJAYAKUMAR, B. G.; SETHUMADHAVAN, A.; MANI, M.; and KANNAN, T. Indole chalcones: design, synthesis, in vitro and in silico evaluation against *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 198, 112358 – 2020.

RECACHA, E.; MACHUCA, J.; DÍAZ-DÍAZ, S.; GARCÍA-DUQUE, A.; RAMOS-GUELFO, M.; DOCOBO-PÉREZ, F.; and RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M. Suppression of the SOS response modifies spatiotemporal evolution, post-antibiotic effect, bacterial fitness and biofilm formation in quinolone-resistant *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 74(1), 66-73 – 2019.

RESENDE, M. A. Prospecção, análises e design in silico de potenciais inibidores da proteína NS3 do vírus zika – 2022.

RUDRAPPA, T.; and BAIS, H. P. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. **Journal of agricultural and food chemistry**, 56(6), 1955-1962 – 2008.

TAJBAKHS, S.; MOHAMMADI, K.; DEILAMI, I.; ZANDI, K.; FOULADVAND, M.; RAMEDANI, E.; and ASAYESH, G. Antibacterial activity of indium curcumin and indium diacetylcurcumin. *African Journal of Biotechnology*, 7(21) – 2008.

TIAN, S., WANG, J., LI, Y., LI, D., XU, L., & HOU, T. The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research. **Advanced drug delivery reviews**, 86, 2-10 – 2015.

THEODORO, L. H., FERRO-ALVES, M. L., LONGO, M., NUERNBERG, M. A. A., FERREIRA, R. P., ANDREATI, A. & GARCIA, V. G. Curcumin photodynamic effect in the treatment of the induced periodontitis in rats. **Lasers in medical Science** vol. 32(8), 1783-1791 – 2017.

THEODOULOU, F.L., CARRIER, D.J., SCHAEDELER, T.A., BALDWIN, S.A., & BAKER, A. How to move an amphipathic molecule across a lipid bilayer: different mechanisms for different ABC transporters? **Biochemical Society Transactions**, 44 (3), 774-782 – 2016.

THOMFORD, N. E., SENTHEBANE, D. A., ROWE, A., MUNRO, D., SEELE, P., MAROYI, A., and DZOBO, K. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1578 - 2018.

TYAGI, P., SINGH, M., KUMARI, H., KUMARI, A., & MUKHOPADHYAY, K. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. **PloS one**, 10(3), 0121313 – 2015.

VARSHNEY, G. K.; SAINI, R. K.; GUPTA, P. K.; and DAS, K. Effect of curcumin on the diffusion kinetics of a hemicyanine dye, LDS-698, across a lipid bilayer probed by second harmonic spectroscopy. **Langmuir**, 29(9), 2912-2918 – 2013.

VALLIANOU, N. G., EVANGELOPOULOS, A., SCHIZAS, N., & KAZAZIS, C. Potential anticancer properties and mechanisms of action of curcumin. **Anticancer research**, 35(2), 645-651 – 2015.

VAUGHN, A. R., BRANUM, A., & SIVAMANI, R. K. Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on skin health: a systematic review of the clinical evidence. **Phytotherapy Research**, 30(8), 1243-1264 – 2016.

VEBER, D.F., JOHNSON, R.S., CHENG, H-Y, SMITH, B.R., WARD, K.W., KOPPLE, K.D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of DrugCandidates. **J. Med. Chem.**, 45, 2615-2623 - 2002.

VELAYUDHAN, K. C., DIKSHIT, N., & NIZAR, M. A. Ethnobotany of turmeric (*Curcuma longa* L.) – 2012.

VIEIRA, R. G. L., MORAES, T. D. S., SILVA, L. D. O., BIANCHI, T. C., VENEZIANI, R. C. S., AMBRÓSIO, S. R., & MARTINS, C. H. G. In vitro studies of the antibacterial activity of *Copaifera* spp. oleoresins, sodium hypochlorite, and peracetic acid against clinical and environmental isolates recovered from a hemodialysis unit. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, 7(1), 1-13 – 2018.

VOTANO, J.R., PARHAM, M., HALL, L.H. and KIER, L.B. New predictors for several ADME/Tox properties: Aqueous solubility, human oral absorption, and Ames genotoxicity using topological descriptors. **Diversidade molecular** vol.8, 379-391 - 2004.

XU, X. Y., MENG, X., LI, S., GAN, R. Y., LI, Y., LI, H. B. Bioactivity, health benefits, and related molecular mechanisms of curcumin: Current progress, challenges, and perspectives. **Nutrients**, v. 10, p. 1–33, 2018.

ZHANG, C., ZHU, X., LI, F., GAO, F., TU, J., ZHANG, D. Enhanced eradication of *Pseudomonas aeruginosa* bio-films by using ultrasound combined with neutrophil and antibiotics. **Applied Acoustics** v.152, pág.101–109 - 2019.

ZHANG, C.; ZHU, X.; LI, F.; GAO, F.; TU, J.; and ZHANG, D. Enhanced eradication of *Pseudomonas aeruginosa* bio-films by using ultrasound combined with neutrophil and antibiotics. **Applied Acoustics**, 152, 101-109 – 2019.

ZHEN, X., LUNDBORG, CS, ZHANG, M., SUN, X., LI, Y., HU, X., and DONG, H. Clinical and economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a multicentre study in China. **Scientific reports** 10 (1), 1-8 – 2020.

ZHENG, D., HUANG, C., HUANG, H., ZHAO, Y., KHAN, M. R. U., ZHAO, H., & HUANG, L. Antibacterial mechanism of curcumin: A review. **Chemistry & Biodiversity**, 17(8) - 2020.

ZORZI, R. R., JORGE, S. D., PALACE-BERL, F., PASQUALOTO, K. F. M., DE SÁ BORTOLOZZO, L., DE CASTRO SIQUEIRA, A. M., & TAVARES, L. C. Exploring 5-nitrofur derivatives against nosocomial pathogens: synthesis, antimicrobial activity and chemometric analysis. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 22(10), 2844-2854 – 2014.

WANG, J.; ZHOU, X.; LI, W.; DENG, X.; DENG, Y.; AND NIU, X. Curcumin protects mice from *Staphylococcus aureus* pneumonia by interfering with the α -hemolysin self-assembly process. **Scientific Reports** 6, 28254 – 2016.

WANG, S., KIM, M. C., KANG, O. H., & KWON, D. Y. The Mechanism of Bisdemethoxycurcumin Enhances Conventional Antibiotics against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, 21(21), 7945 - 2020.

WANG, Y.J., PAN, M. H., CHENG, A. L., LIN, L. I., HO, Y. S., HSIEH, C.Y., & LIN, J. K. Estabilidade da curcumina em soluções tampão e caracterização dos seus produtos de degradação. **Jornal de análise farmacêutica e biomédica** , 15 (12), 1867-1876 – 1997.

WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect science**, 24(3), 342-357 – 2017.

WEI, G. X., CAMPAGNA, A. N., & BOBEK, L. A. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(6), 1100-1109 – 2006.

WIEDEMANN, I.; BENZ, R.; SAHL, H.G. Lipid II-Mediated Pore Formation by the Peptide Antibiotic Nisin: A Black Lipid Membrane Study. **J. Bacteriol.** 186, 3259–3261 – 2004.

YUN, D.G.; AND LEE, D.G. Antibacterial activity of curcumin via apoptosis-like response in Escherichia coli. **Microbiologia Aplicada e Biotecnologia**. 100 (12), 5505 – 5514 - 2016.

Capítulo III

APÊNDICE I

1. Dados de espectroscopia

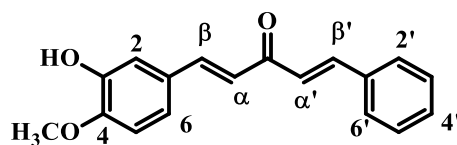
Os pontos de fusão dos compostos foram determinados através do aparelho de ponto capilar com termômetro. O espectro UV-Vis e a pureza dos compostos foram registrados por análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE para determinação de $\log Po/w$.

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker® Avance III Espectrômetros de 14,095 T (600 MHz). Os compostos foram solubilizados em acetona hexadeuterada e dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO- d_6). Os parâmetros de RMN são representados como deslocamentos químicos (em ppm), acoplamento constantes (J em Hz) e multiplicidades: s = singleto; br s = singleto largo; d = duplete; m = multiplete; dd = duplete de dupletos; e ddd = duplete de duplete de dupletos.

A pureza dos compostos foi medida por valores de área de banda, que variaram de 95,9 a 99,0%. Os pontos de fusão dos compostos variaram de 82 a 223 °C. O UV-Vis os espectros indicaram valores de $\lambda_{\max}$. Os espectros de RMN de H^1 apresentaram um par de dupletos com constantes de acoplamento características de ligação dupla carbono-carbono com configuração *trans* ($J \approx 15$ -16 Hz). Os espectros de RMN de ^{13}C exibiram sinais características de carbonilas de cetonas α,β insaturadas ($\delta \approx 189$ ppm).

A espectrometria de massas mediu a analítica física e identificação das moléculas de interesse por meio da medição da sua massa e da caracterização de sua estrutura química.

Figura 1. Espectro de RMN ^1H do composto GRM01



(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-phenylpenta-1,4-dien-3-one

Solido amarelo

Rendimento: 86%

Ponto de fusão: 157-158 °C

RMN de ^1H (600 MHz; acetona- d_6), δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz):

3,93 (s; 3H; 4-OCH₃), 7,04 (d; J = 8,4 Hz; 1H; H-5), 7,15 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- α), 7,22 (dd; J = 1,8 e 8,4 Hz; 1H; H-6), 7,30 (d; J = 1,8 Hz; 1H; H-2), 7,31 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- α'), 7,45–7,48 (m; 3H; H-3', H-4' e H-5'), 7,72 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- β), 7,77 (dd; J = 2,4 e 7,2 Hz; 2H; H-2' e H-6'), 7,79 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- β').

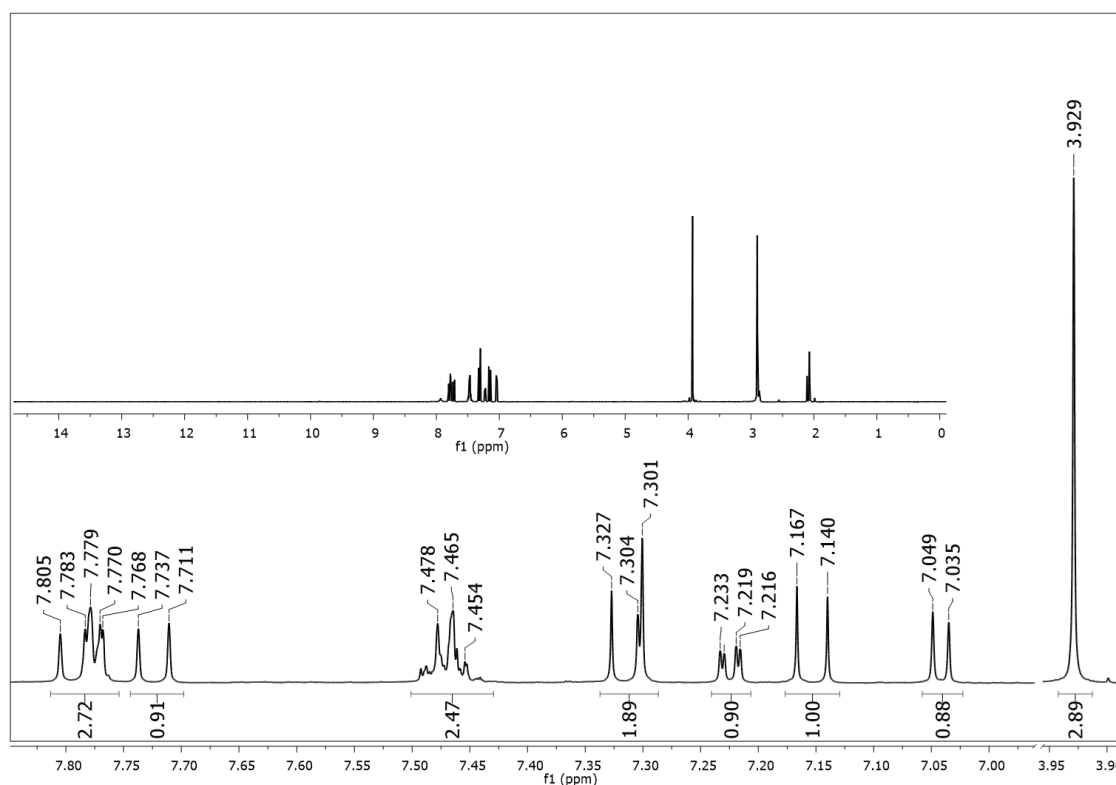


Figura 2. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM01

RMN de ^{13}C (150 MHz; acetona- d_6), δ_{C} em ppm: 55,4 (4-OCH₃), 111,4 (C-2), 113,7 (C-5), 122,0 (C-6), 123,5 (C- α), 125,9 (C- α'), 128,3 (C-2' e C-6'), 128,3 (C-1), 128,9 (C-3' e C-5'), 130,2 (C-4'), 135,3 (C-1'), 141,9 (C- β), 142,9 (C- β'), 147,0 (C-3), 149,9 (C-4), 187,9 (C=O).

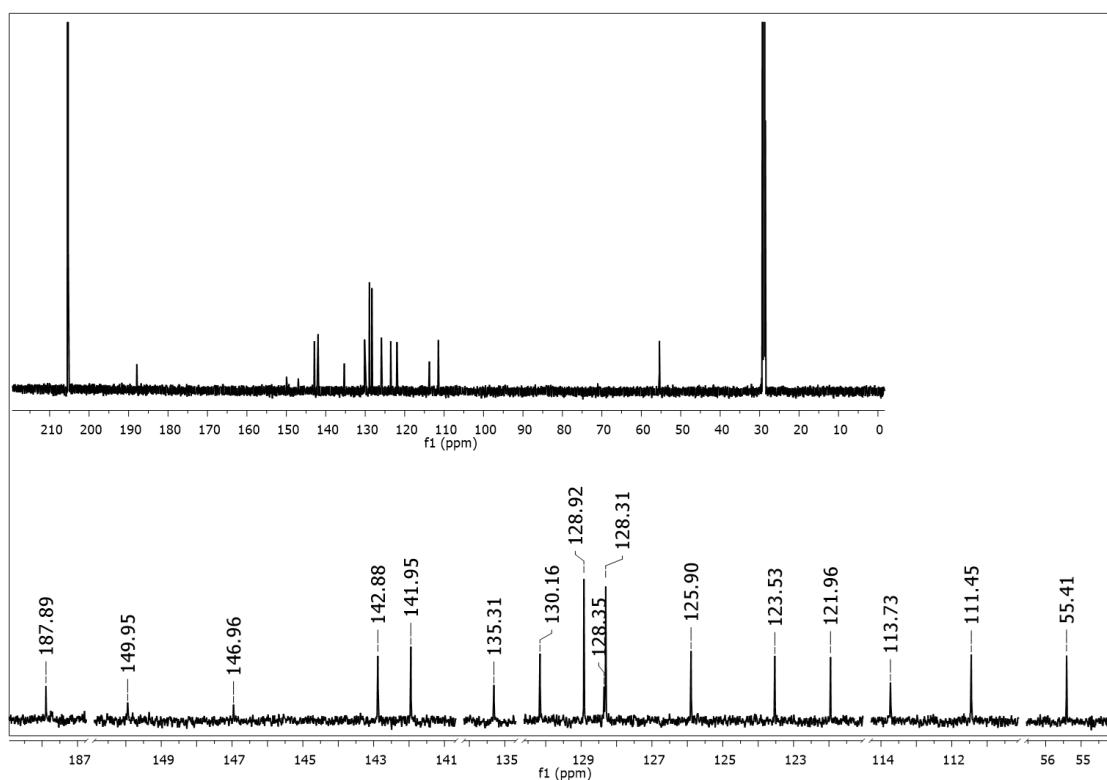
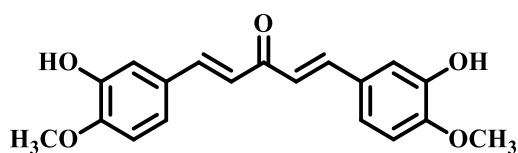


Figura 3. Espectro de RMN ^1H do composto GRM02



(1E,4E)-1,5-bis(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one

Sólido amarelo

Rendimento: 98%

RMN de ^1H (600 MHz; DMSO- d_6), δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz): 3,83 (s; 6H; 4-OCH₃ e 4'-OCH₃), 6,99 (d; $J = 7,8$ Hz; 2H; H-5 e H-5'), 7,07 (d; $J = 16,2$ Hz; 2H; H- α e H- α'), 7,21–7,18 (m; 4H; H-6', H-6, H-2' e H-2), 7,61 (d; $J = 15,6$ Hz; 2H; H- β e H- β'), 9,20 (s; 2H; 3-OH e 3'-OH).

Prof. Luis Octavio, amostra Glaciele de Moraes, GRM02 (5 mg) em DMSO- d_6 25,0 °C

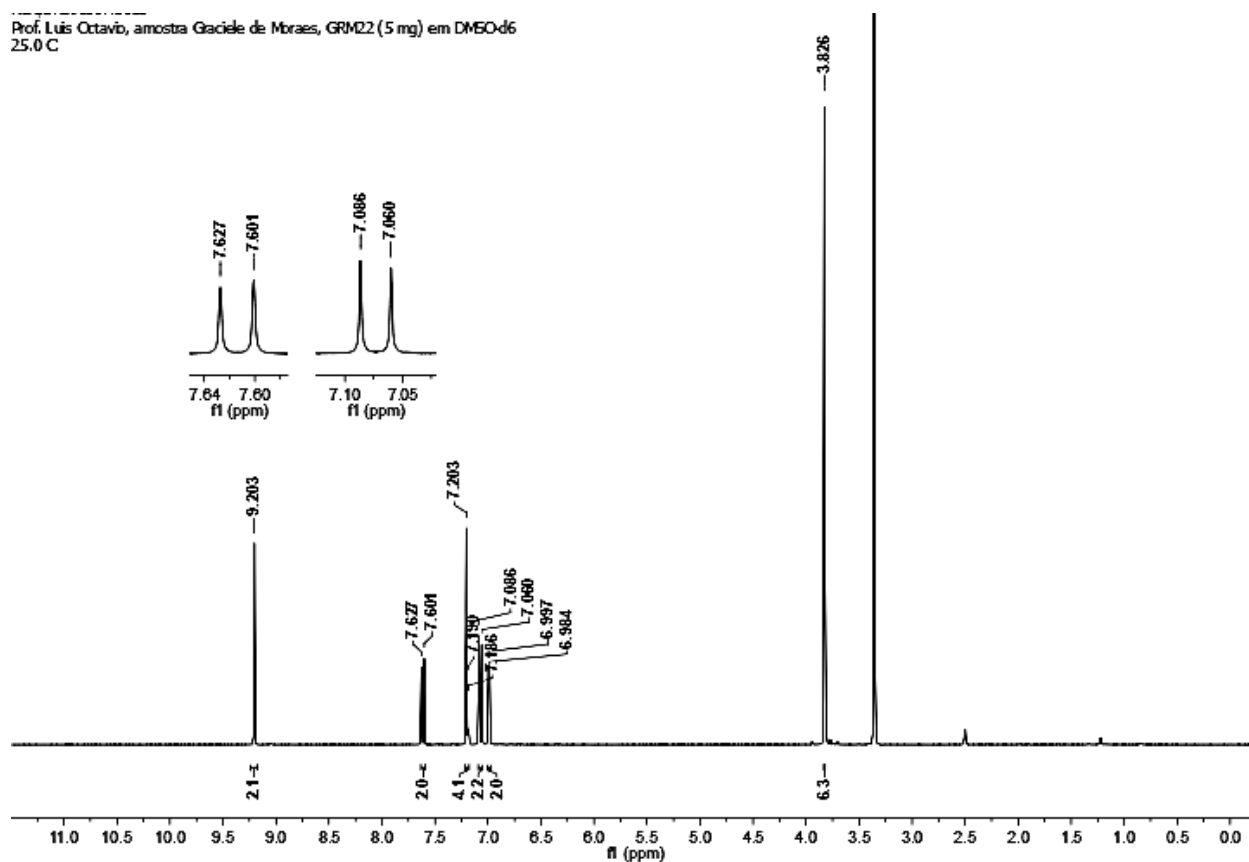


Figura 4. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM02

RMN de ^{13}C (150 MHz; DMSO- d_6), δ_c em ppm: 55,9 (4'-OCH₃ e 4-OCH₃), 112,2 (C-5' e C-5), 114,5 (C-2' e C-2), 122,0 (C-6' e C-6), 123,7 (C- α' e C- α), 127,8 (C-1' e C-1), 142,9 (C- β' e C- β), 146,9 (C-3' e C-3), 150,4 (C-4' e C-4), 188,4 (C=O).

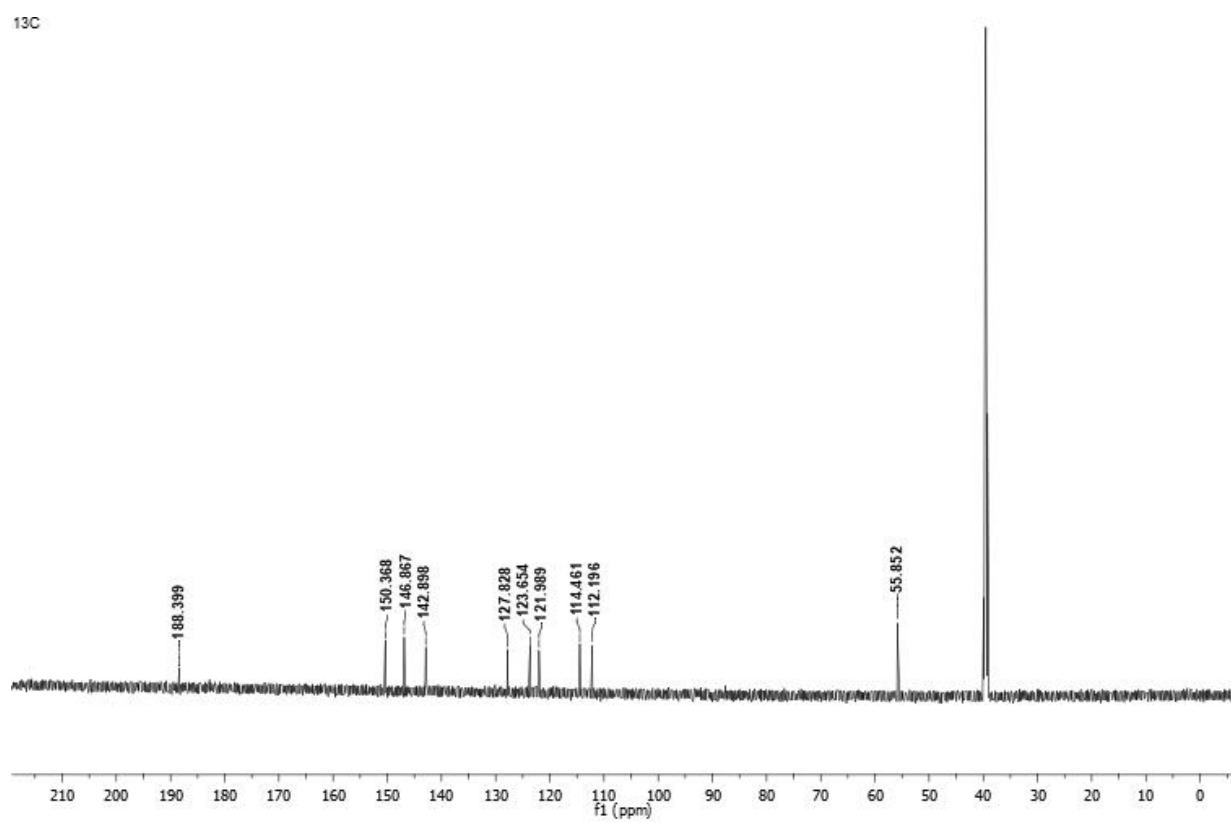
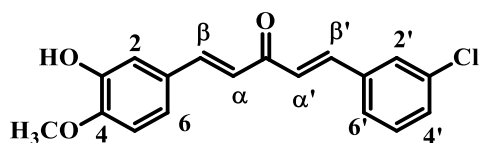


Figura 5. Espectro de RMN ^1H do composto GRM03



(1E,4E)-1-(3-chlorophenyl)-5-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one

Solido amarelo

Rendimento: 71%

Ponto de fusão: 121–123 °C

RMN de ^1H (600 MHz; DMSO- d_6), δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz): 3,83 (s; 3H; 4-OCH₃), 7,01 (d; J = 9,0 Hz; 1H; H-5), 7,02 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- α), 7,21 (td; J = 2,4 e 4,4 Hz; 2H; H-2 e H-6), 7,47 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- α'), 7,48 (m; 2H; H-4' e H-5'), 7,68 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- β), 7,73 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- β'), 7,74 (d; J = 8,4 Hz; 1H; H-2'), 7,92 (s; 1H; H-6'), 9,26 (s; 1H; OH).

Prof. Luis Octavio, amostra Gaciele de Moraes, GRM02 (0,005 mg ???) em DMSO- d_6 25,0 °C

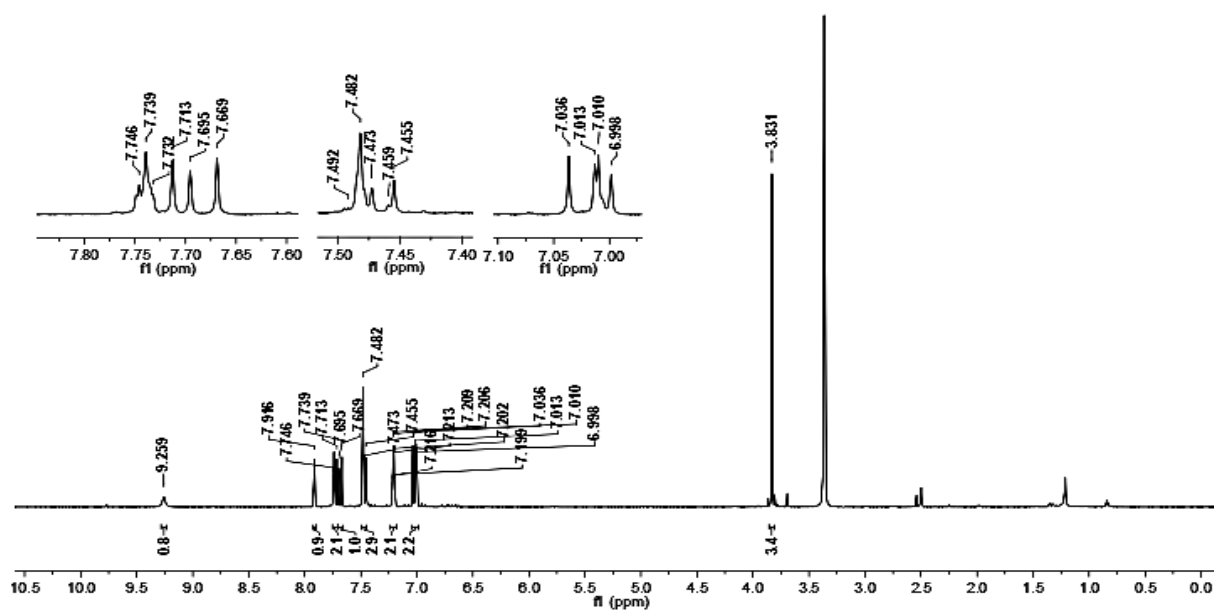


Figura 6. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM03

RMN de ^{13}C (150 MHz; DMSO- d_6), δ_{C} em ppm: 55,7 (4-OCH $_3$), 112,1 (C-5), 114,4 (C-2), 121,9 (C-6), 123,7 (C- α), 126,9 (C- α'), 127,3 (C-2'), 127,6 (C-6'), 127,8 (C-1), 129,9 (C-4'), 130,8 (C-5'), 133,8 (C-3'), 137,2 (C-1'), 140,4 (C- β), 143,8 (C- β'), 146,8 (C-3), 150,4 (C-4), 188,3 (C=O).

RarSDRa24652.10596

Prof. Luis Octavio, amostra Gabriela R de Moraes, GRM02 (9 mg) em DMSO- d_6
25,0 C
 ^{13}C

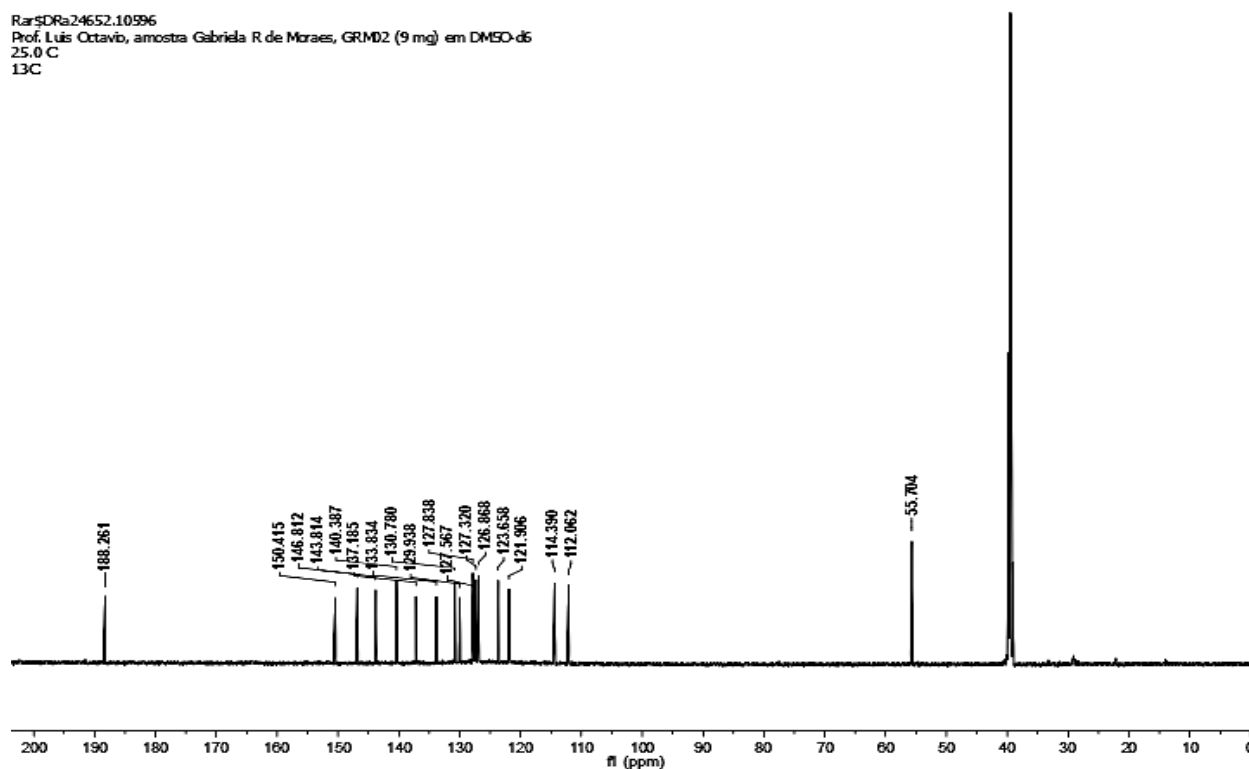
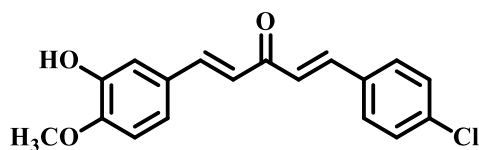


Figura 7. Espectro de RMN ^1H do composto GRM04



(1E,4E)-1-(4-chlorophenyl)-5-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one

Sólido amarelo

Rendimento: 48%

Ponto de fusão: 120–122 °C

RMN de ^1H (600 MHz; DMSO- d_6), δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz): 3,83 (s; 3H; 4-OCH₃), 7,00 (d; J = 8,4 Hz; 1H; H-5), 7,05 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- α), 7,20 (dd; J = 2,4 e 7,2 Hz; 2H; H-2 e H-6), 7,39 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- α'), 7,52 (d; J = 8,4 Hz; 2H; H-3' e H-5'), 7,70 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- β), 7,71 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- β'), 7,82 (d; J = 8,4 Hz; 2H; H-2' e H-6'), 9,24 (s; 1H; OH).

Prof. Luis Octavio, amostra Gaciele de Moraes, GRM04 (0,005 mg ?) em DMSO- d_6
25,0 °C

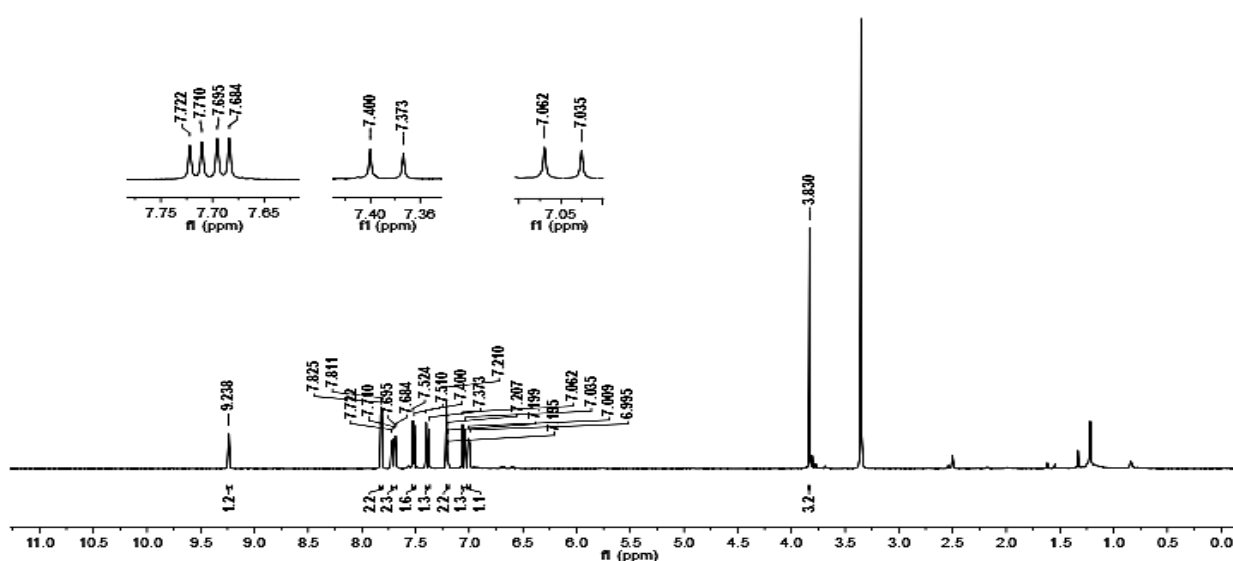


Figura 8. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM04

RMN de ^{13}C (150 MHz; DMSO- d_6), δ_{C} em ppm: 55,8 (4-OCH₃), 112,1 (C-5), 114,4 (C-2), 122,0 (C-6), 123,5 (C- α), 126,4 (C- α'), 127,6 (C-1), 129,1 (C-3' e C-5'), 130,3 (C-2' e C-6'), 133,9 (C-1'), 134,9 (C-4'), 140,7 (C- β), 143,7 (C- β'), 146,8 (C-3), 150,4 (C-4), 188,3 (C=O).

Prof. Luis Octavio, amostra Graciele Moraes, GRM04 (14 mg) em DMSO- d_6
25,0 C
 ^{13}C

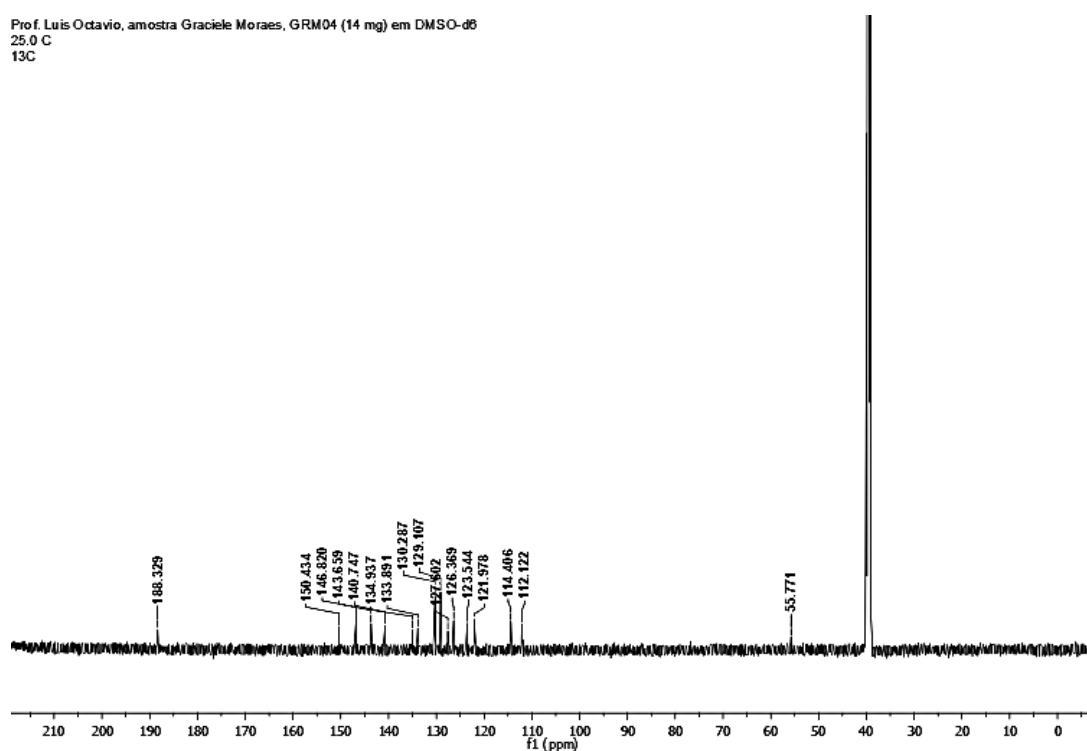
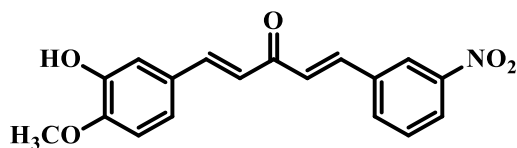


Figura 9. Espectro de RMN ^1H do composto GRM05



(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(3-nitrophenyl)penta-1,4-dien-3-one

Solido amarelo

Rendimento: 76%

Ponto de fusão: 179–181°C

RMN de ^1H (600 MHz; DMSO- d_6), δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz): 3,84 (s; 3H; 4-OCH $_3$), 7,01 (d; J = 9,0 Hz; 1H; H-5), 7,08 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- α), 7,22 (dd; J = 2,0 e 5,4 Hz; 2H; H-2 e H-6), 7,57 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- α'), 7,74 (m; 1H; H-5'), 7,74 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- β), 7,84 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- β'), 8,25 (m; 2H; H-2' e H-4'), 8,63 (m; 1H; H-6'), 9,26 (s; 1H; OH).

Prof. Luis Octavio, amostra Graciele de Moraes, GRM06 (0,005 mg ?) em DMSO- d_6 25,0 C

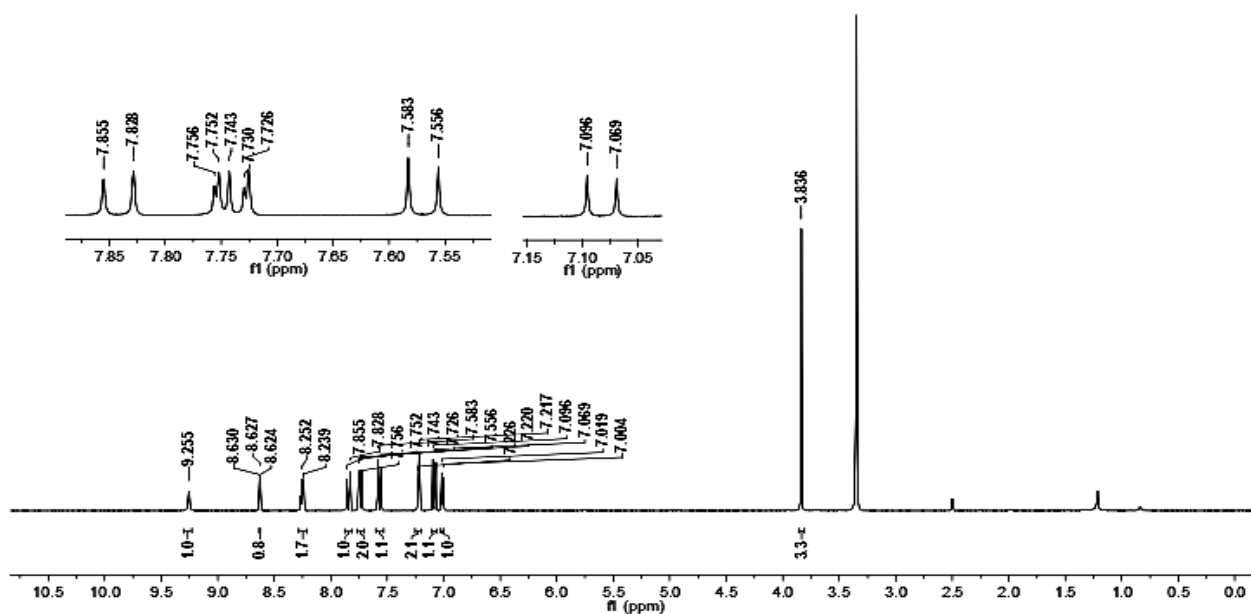


Figura 10. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM05

RMN de ^{13}C (150 MHz; $\text{DMSO}-d_6$), δ_{C} em ppm: 55,9 (4-OCH₃), 112,2 (C-5), 114,5 (C-2), 122,2 (C-2'), 123,0 (C-6), 123,5 (C-4'), 124,7 (C- α'), 127,6 (C- α), 128,2 (C-1), 130,6 (C-5'), 134,6 (C-6'), 136,9 (C-1'), 139,8 (C- β), 144,2 (C- β'), 146,9 (C-3), 148,6 (C-4'), 150,6 (C-4), 188,4 (C=O).

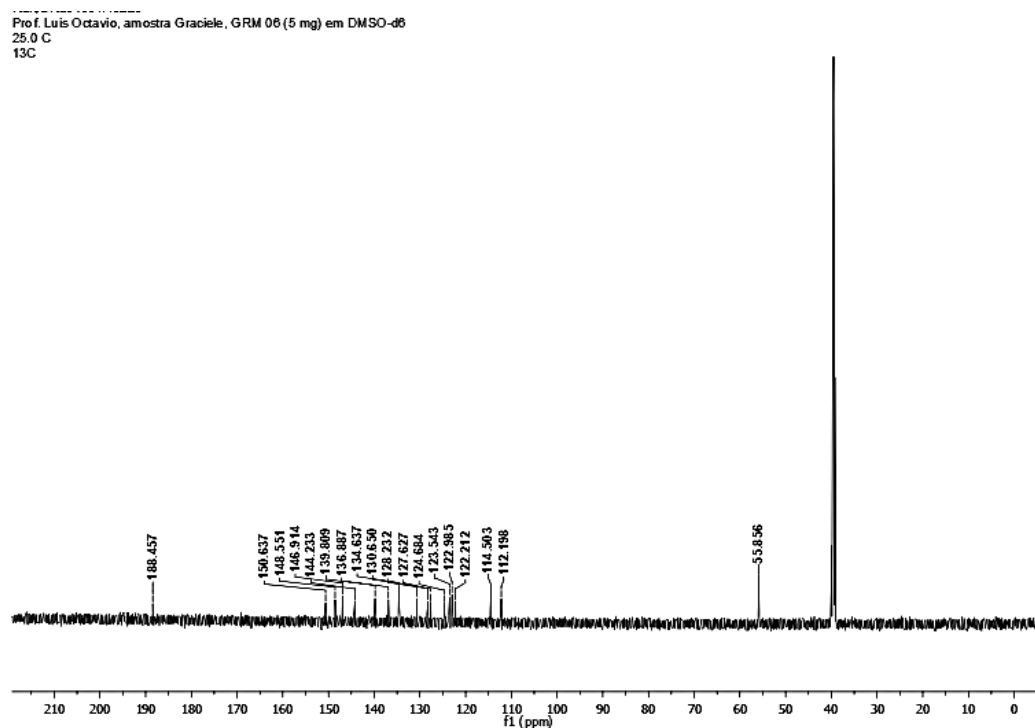
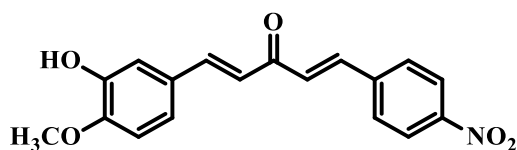


Figura 11. Espectro de RMN ^1H do composto GRM06



(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(4-nitrophenyl)penta-1,4-dien-3-one

Solido amarelo

Rendimento: 88%

Ponto de fusão: 151–153 °C

RMN de ^1H (600 MHz; DMSO- d_6), δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz): 3,83 (s; 3H; 4-OCH $_3$), 7,01 (d; J = 9,0 Hz; 1H; H-5), 7,06 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- α), 7,20 (d; J = 7,2 Hz; 2H; H-2 e H-6), 7,56 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- α'), 7,74 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- β), 7,79 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- β'), 8,05 (m; 2H; H-3' e H-5'), 8,27 (m; 2H; H-3' e H-5'), 9,29 (s; 1H; OH).

Prof. Luis Octavio, amostra Gaciele Moraes, GRM08 (5 mg) em DMSO- d_6 25,0 °C

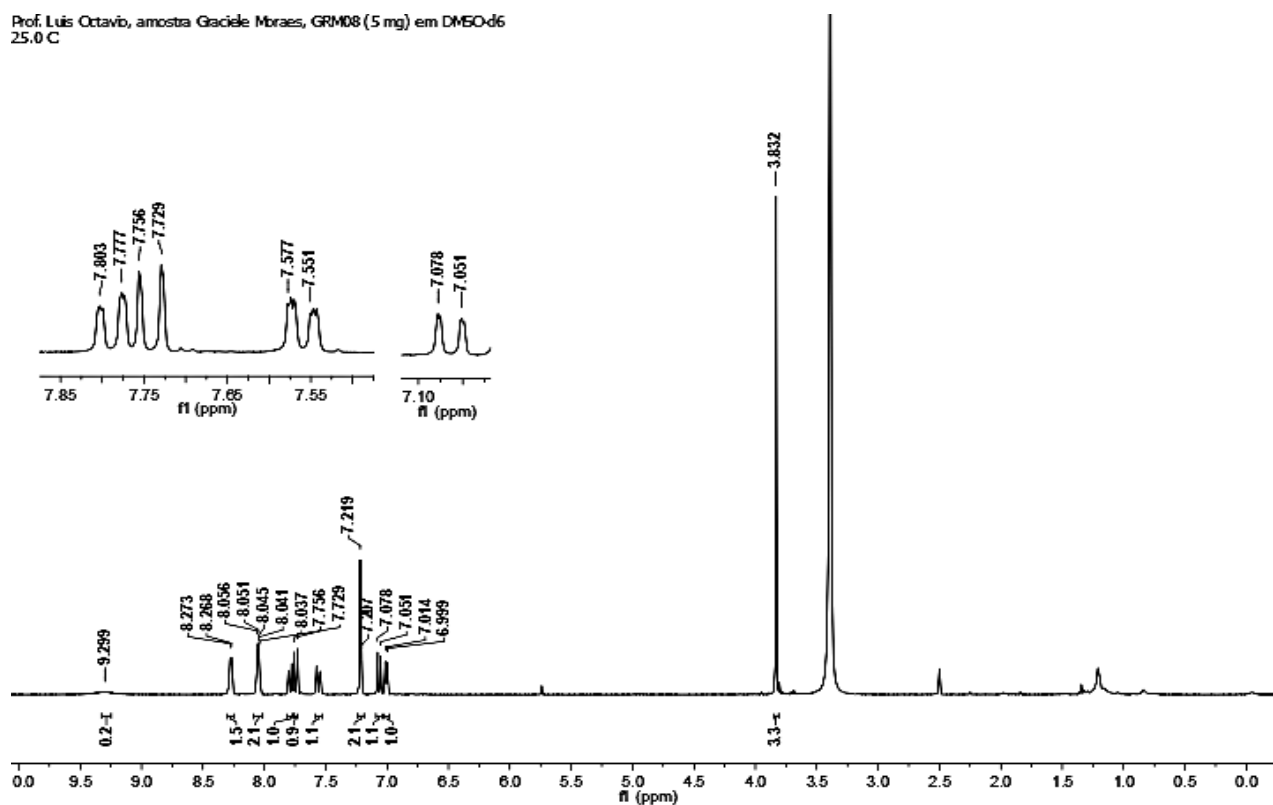


Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM06

RMN de ^{13}C (150 MHz; DMSO- d_6), δ_{C} em ppm: 55,7 (4-OCH₃), 112,1 (C-5), 114,4 (C-2), 122,0 (C-6), 123,5 (C- α), 124,0 (C-3' e C-5'), 127,5 (C- α'), 129,3 (C-1), 129,3 (C-2' e C-6'), 139,3 (C-1'), 141,5 (C- β), 144,3 (C- β'), 146,8 (C-3), 148,0 (C-4'), 150,5 (C-4), 188,1 (C=O).

Prof. Luis Octavio, amostra Gabriela R de Moraes, GRM08 (8 mg) em DMSO- d_6
25.0 C
 ^{13}C

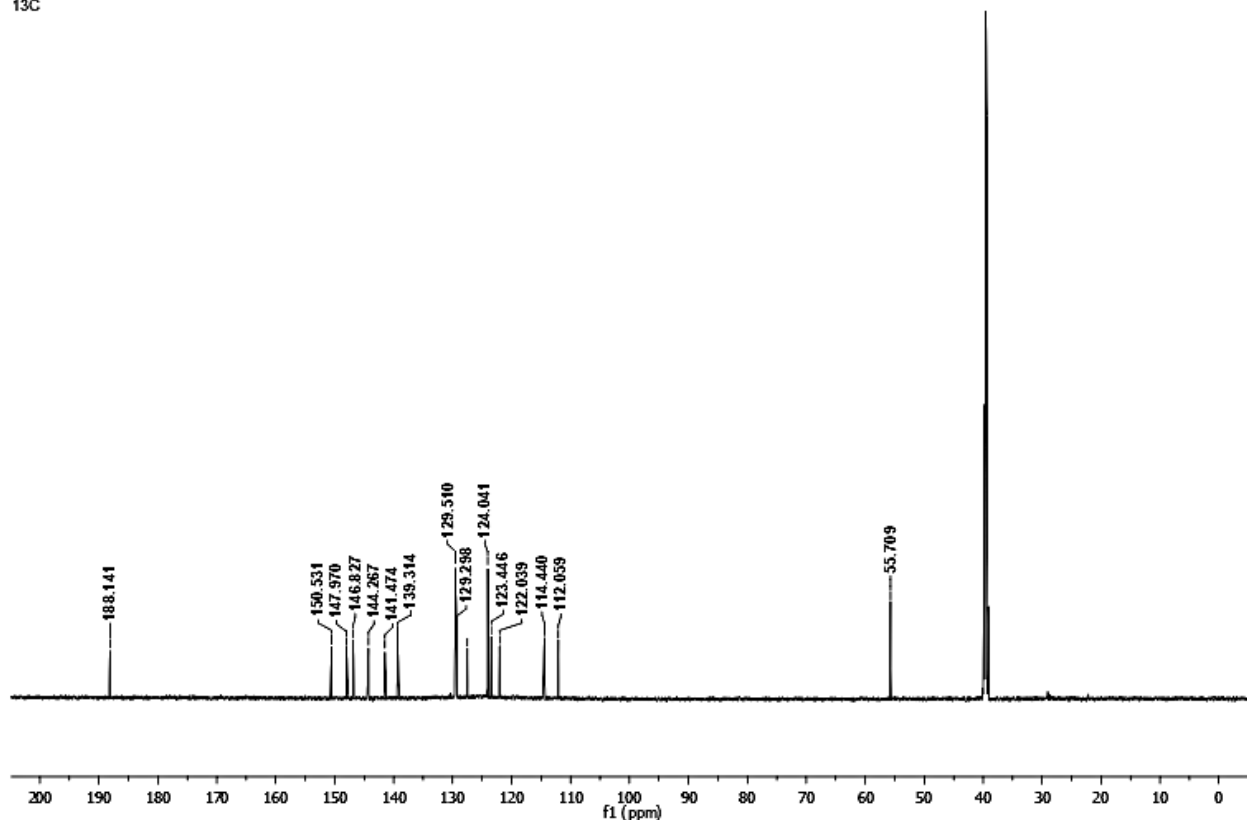
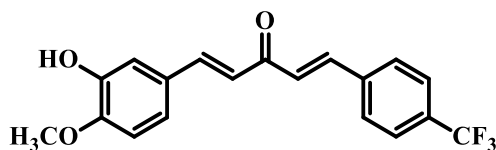


Figura 13. Espectro de RMN ^1H do composto GRM07



(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)penta-1,4-dien-3-one

Sólido amarelo

Rendimento: 75%

Ponto de fusão: 168–170°C

RMN de ^1H (600 MHz; DMSO- d_6), δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz): 3,83 (s; 3H; 4-OCH $_3$), 7,01 (d; J = 9,0 Hz; 1H; H-5), 7,08 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- α), 7,22 (d; J = 7,2 Hz; 2H; H-2 e H-6), 7,50 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- α'), 7,73 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- β), 7,78 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- β'), 7,80 (d; J = 8,4 Hz; 1H; H-3' e H-5'), 8,00 (d; J = 7,8 Hz; 2H; H-2' e H-6'), 9,26 (s; 1H; OH).

Prof. Luis Octavio, amostra Gaciele de Moraes, GRM10 (0,005 mg ???) em DMSO- d_6 25,0 C

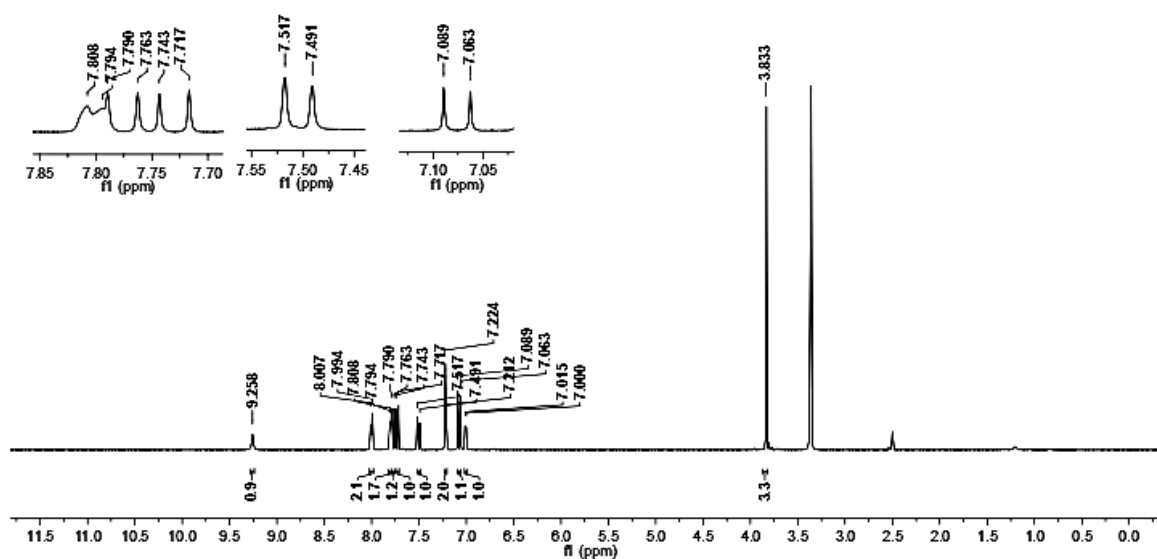


Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM07

RMN de ^{13}C (150 MHz; DMSO- d_6), δ_{C} em ppm: 55,9 (4-OCH₃), 112,2 (C-5), 114,5 (C-2), 122,3 (C-6), 123,6 (C- α), 126,0 (C-3', C-5' e 4-CF₃), 127,6 (C- α'), 128,2 (C-1), 129,3 (C-2' e C-6'), 139,1 (C-4'), 140,3 (C-1'), 144,3 (C- β), 146,8 (C- β'), 150,7 (C-4), 188,6 (C=O).

Pro f. Luis Octavio, amostra Graciele, GRM 10 (5 mg) em DMSO- d_6
25.0 C
13C

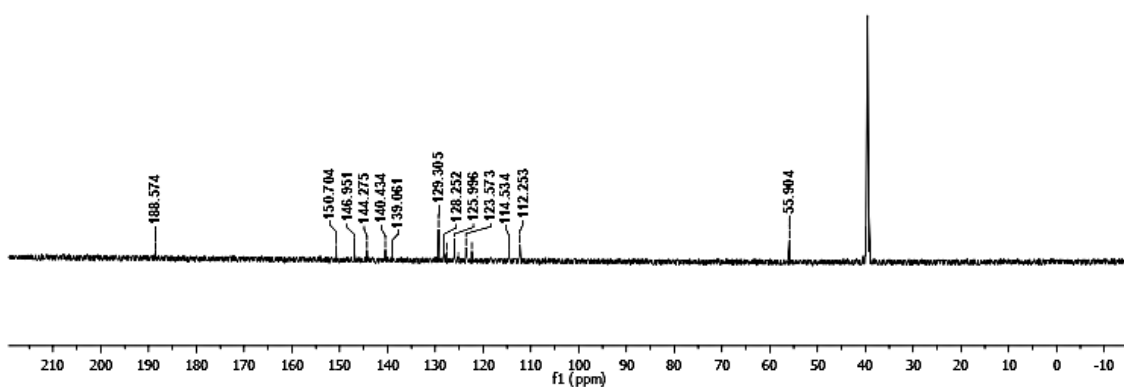
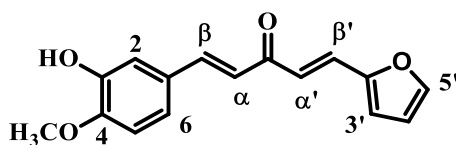


Figura 15. Espectro de RMN ^1H do composto GRM08



(1E,4E)-1-(furan-2-yl)-5-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one

Sólido alaranjado

Rendimento: 46%

RMN de ^1H (600 MHz; DMSO- d_6), δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz): 3,82 (s; 3H; 4-OCH₃), 6,67 (dd; J = 1,8 e 3,0 Hz; 1H; H-4'), 6,98 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- α'), 6,99 (dd; J = 3,7 e 7,2 Hz; 2H; H-5 e H-3'), 7,07 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- α), 7,20 (td; J = 2,0 e 4,4 Hz; 2H; H-2 e H-6), 7,56 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- β), 7,59 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- β'), 7,88 (s; 1H; H-5'), 9,22 (s; 1H; OH).

Prof. Luis Octavio, amostra: Gaciele Moraes, GRM12 (4 mg) em DMSO- d_6 25,0 C

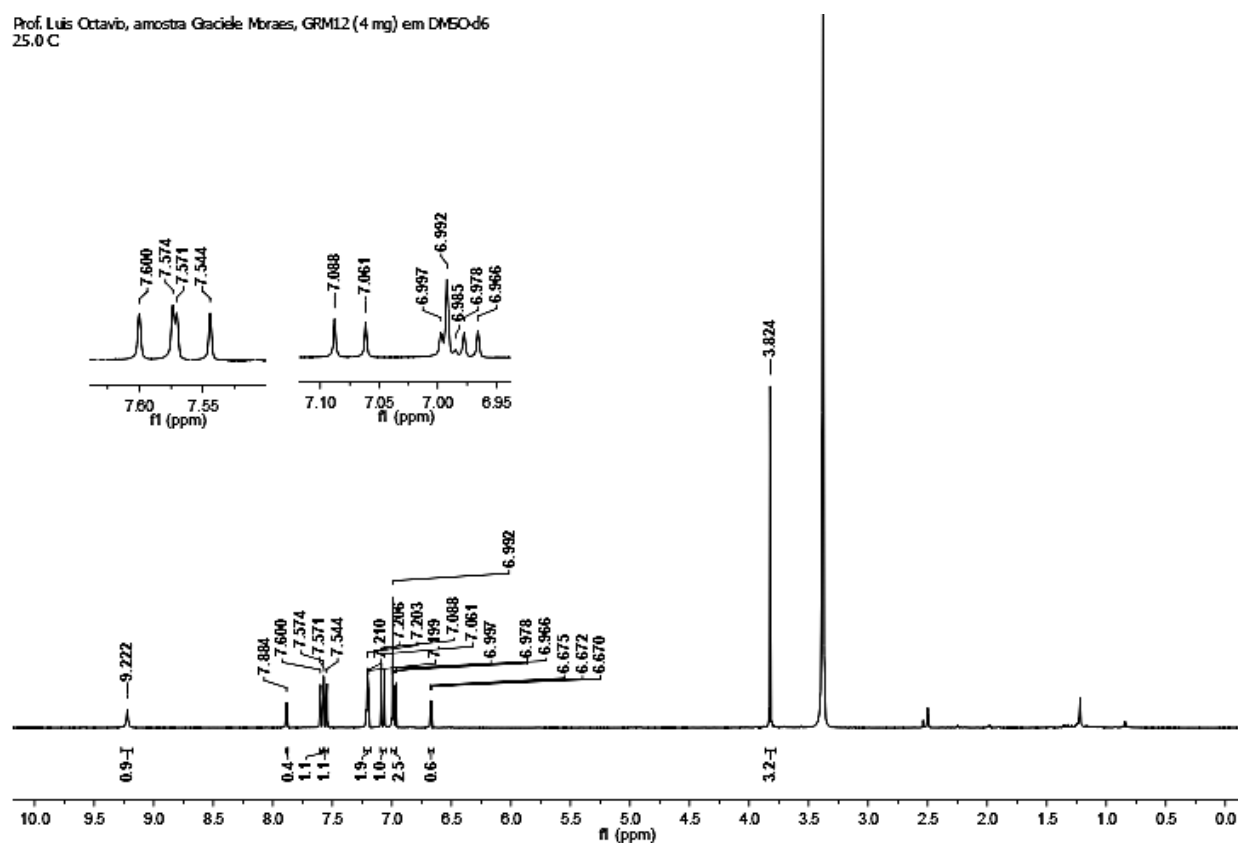


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM08

RMN de ^{13}C (150 MHz; Acetone- d_6), δ_{C} em ppm: 56,2 (4-OCH₃), 112,3 (C-5), 113,5 (C-4'), 114,6 (C-3'), 116,5 (C-2), 122,8 (C-6), 124,0 (C- α), 124,4 (C-1), 129,2 (C- α'), 129,3 (C- β'), 143,6 (C- β), 146,1 (C-5'), 147,8 (C-3), 150,8 (C-4), 152,5 (C-2'), 188,2 (C=O).

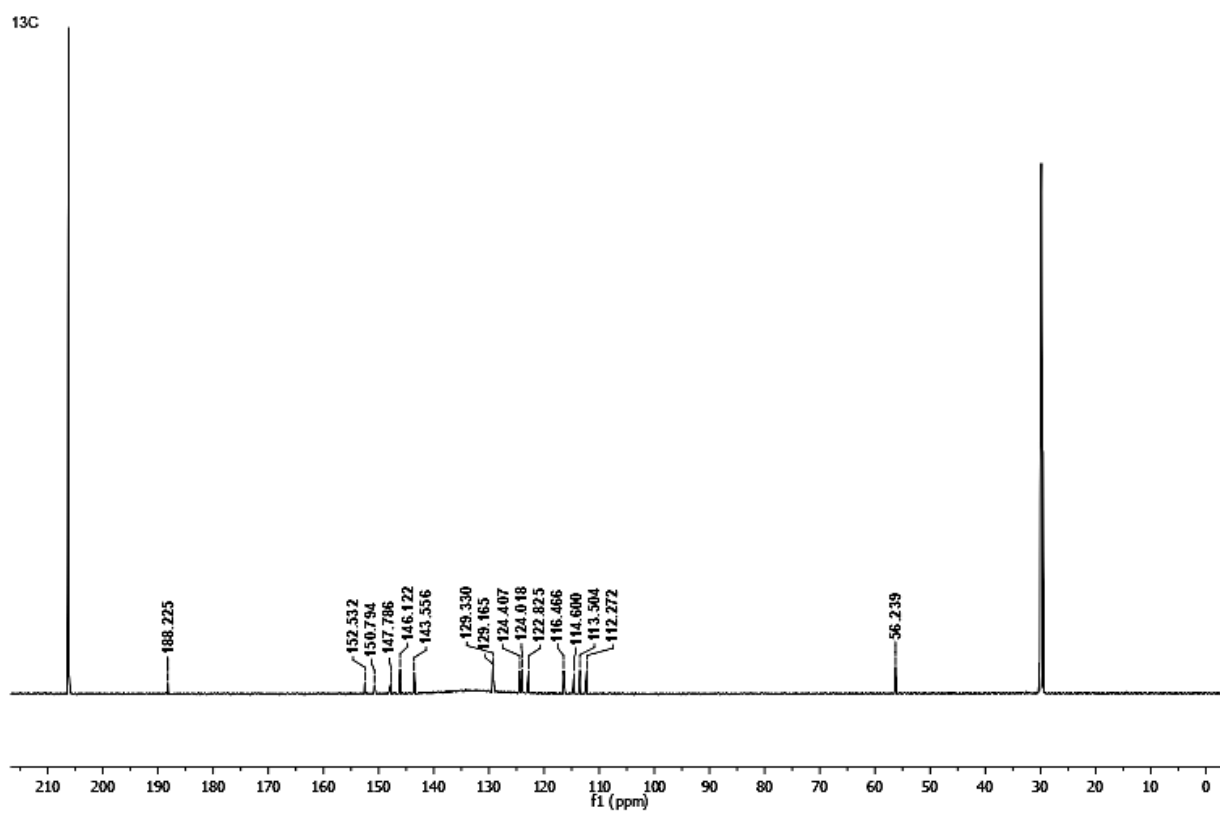
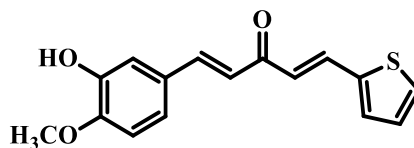


Figura 17. Espectro de RMN ^1H do composto GRM09



(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(thiophen-2-yl)penta-1,4-dien-3-one

Sólido amarelo

Rendimento: 85%

Ponto de fusão: 93–95 °C

RMN de ^1H (600 MHz; DMSO- d_6), δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz): 3,83 (s; 3H; 4-OCH₃), 6,98 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- α'), 6,99 (d; J = 8,4 Hz; 1H; H-5), 7,10 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- α), 7,18 (dd; J = 4,2 e 4,8 Hz; 1H; H-4'), 7,21 (m; 2H; H-2 e H-6), 7,59 (d; J = 4,2 Hz; 1H; H-3'), 7,60 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- β), 7,75 (d; J = 5,4 Hz, 1H; H-5'), 7,92 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- β'), 9,24 (s; 1H; OH).

Prof. Luis Octavio, amostra Gláucia Moraes, GRM14 (5 mg) em DMSO- d_6
25,0 °C

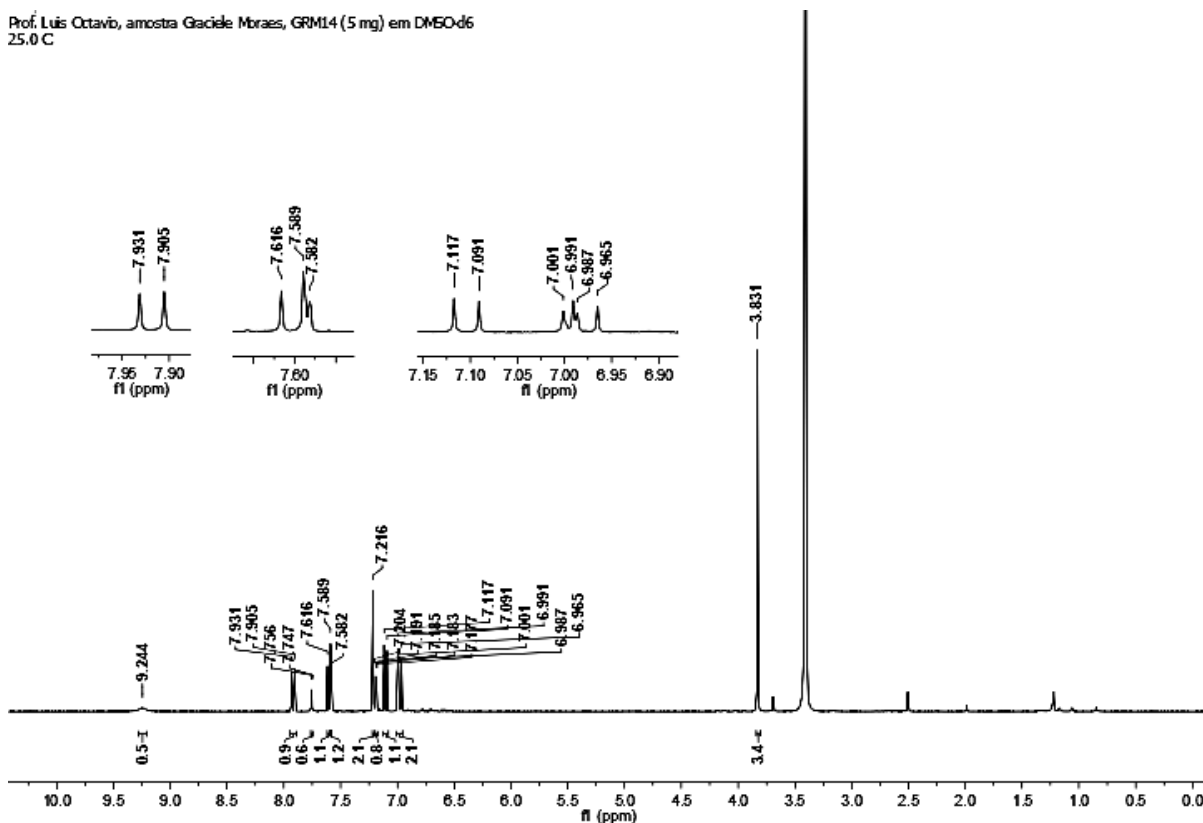


Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM09

RMN de ^{13}C (150 MHz; Acetone- d_6), δ_{C} em ppm: 56,2 (4-OCH₃), 112,3 (C-5), 114,6 (C-2), 122,8 (C-6), 124,2 (C- α'), 125,6 (C- α), 129,2 (C-1), 129,3 (C-4'), 129,7 (C-3'), 132,6 (C-5'), 135,5 (C- β'), 141,2 (C-2'), 143,5 (C- β), 147,8 (C-3), 150,8 (C-4), 188,1 (C=O).

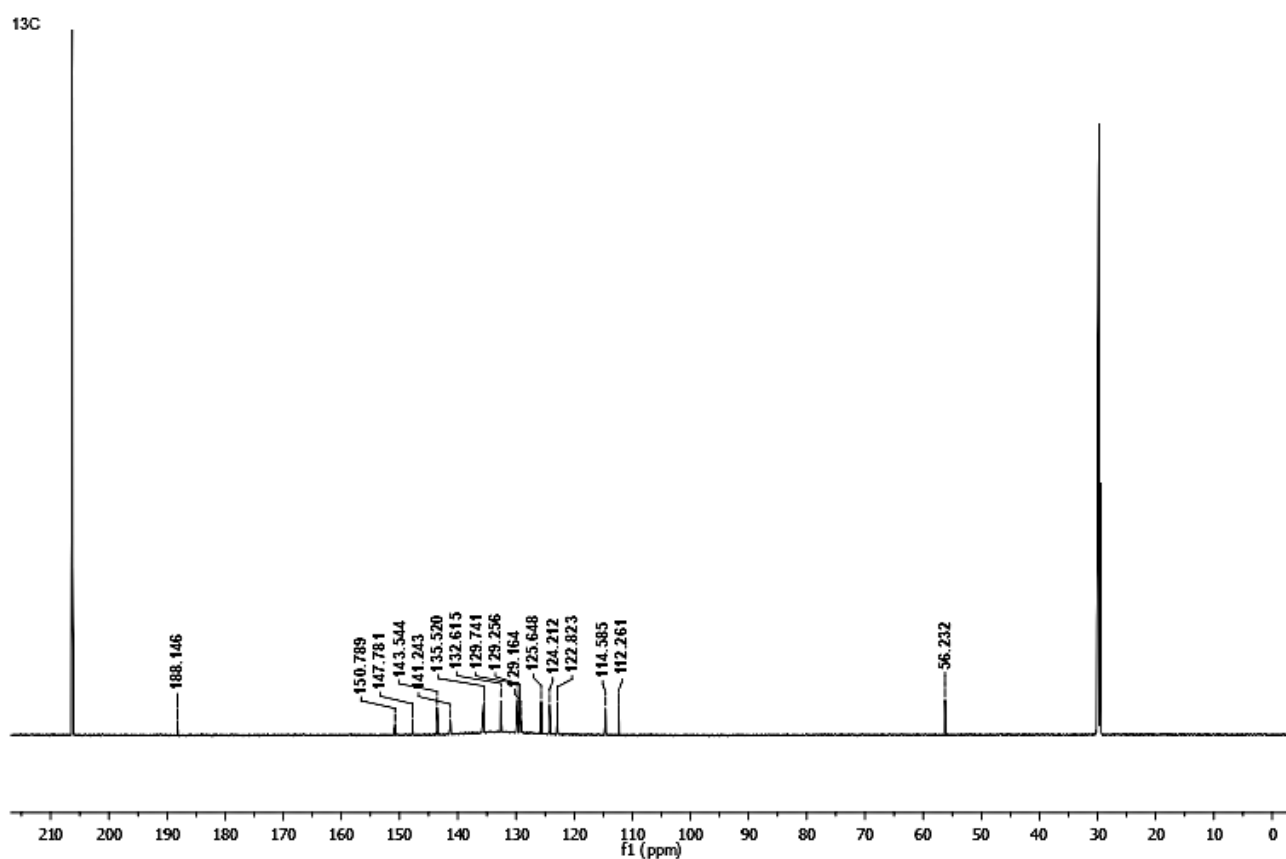
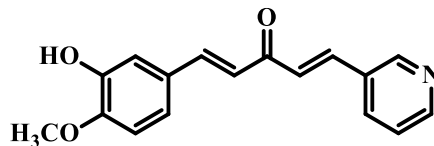


Figura 19. Espectro de RMN ^1H do composto GRM10



(1E,4E) -1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(pyridin-3-yl)penta-1,4-dien-3-one

Sólido amarelo

Rendimento: 3%

RMN de ^1H (600 MHz; DMSO- d_6), δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz): 3,83 (s; H; 4-OCH₃), 7,00 (d; $J = 8,4$ Hz; 1H; H-5), 7,05 (d; $J = 16,2$ Hz; 1H; H- α'), 7,20–7,22 (m; 2H; H-2 e H-6), 7,48 (dd; $J = 4,5$ e $4,8$ Hz; 1H; H-5'), 7,51 (d; $J = 16,2$ Hz; 1H; H- α), 7,72 (d; $J = 16,2$ Hz; 1H; H- β), 7,74 (d; $J = 16,2$ Hz; 1H; H- β'), 8,23 (d; $J = 7,8$ Hz; 1H; H-4'), 8,60 (s; 1H; H-6'), 8,94 (s; 1H; H-2'), 9,24 (s; 1H; OH).

Prof. Luis Octavio, amostra Gracieli de Moraes, GRM16 (6,0 mg) em DMSO- d_6 25,0 °C

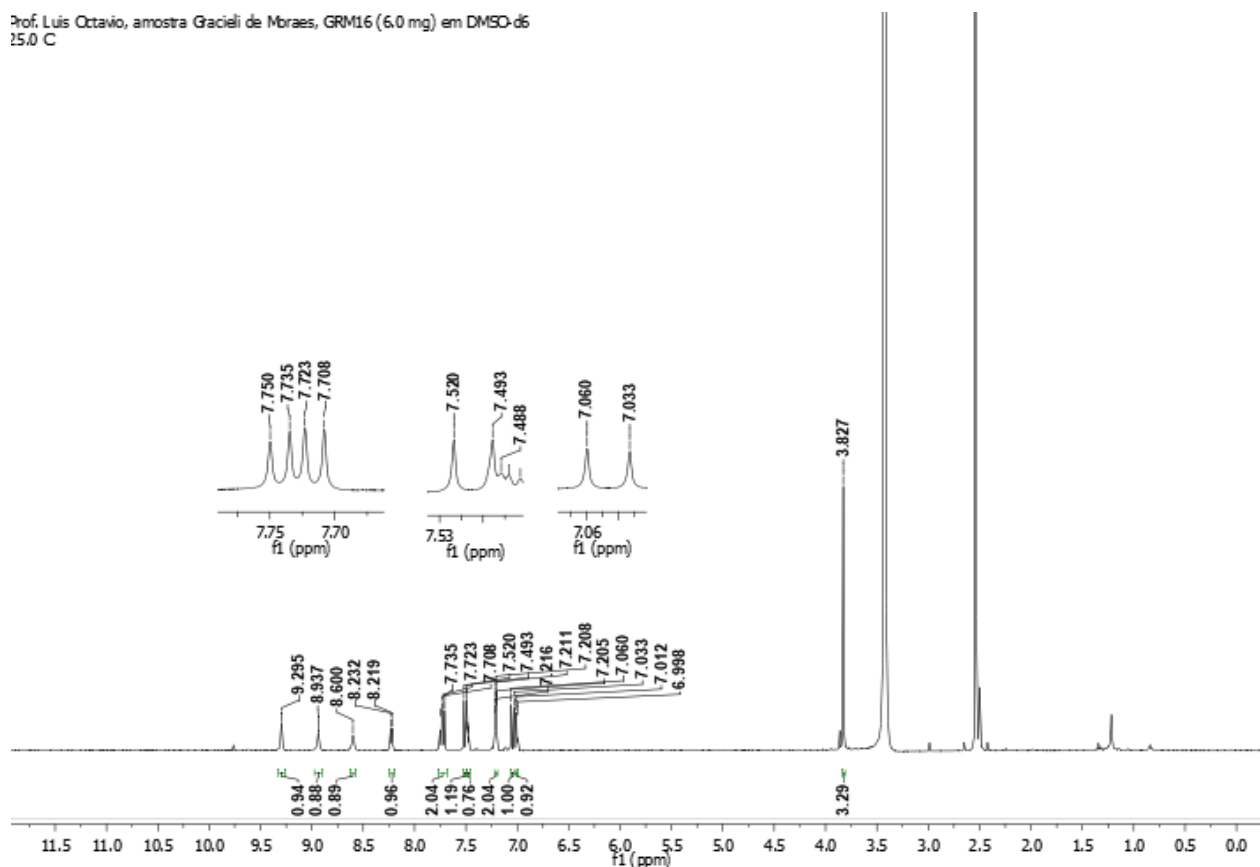
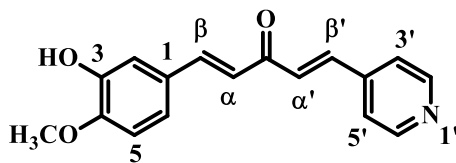


Figura 20. Espectro de RMN ^1H do composto GRM11



(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)penta-1,4-dien-3-one

Sólido amarelo

Rendimento: 12%

Ponto de fusão: 201–203°C

RMN de ^1H (600 MHz; Acetone- d_6), δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz): 3,91 (s; H; 4-OCH₃), 7,03 (d; J = 8,4 Hz; 1H; H-5), 7,12 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- α), 7,21 (dd; J = 1,8 e 8,1 Hz; 1H; H-2), 7,28 (d; J = 1,8 Hz; 1H; H-6), 7,51 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- α'), 7,66 (dd; J = 1,8 e 4,5 Hz; 2H; H-3' e H-5'), 7,69 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- β'), 7,75 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- β), 8,65 (dd; J = 1,8 e 4,2 Hz; 2H; H-2' e H-6').

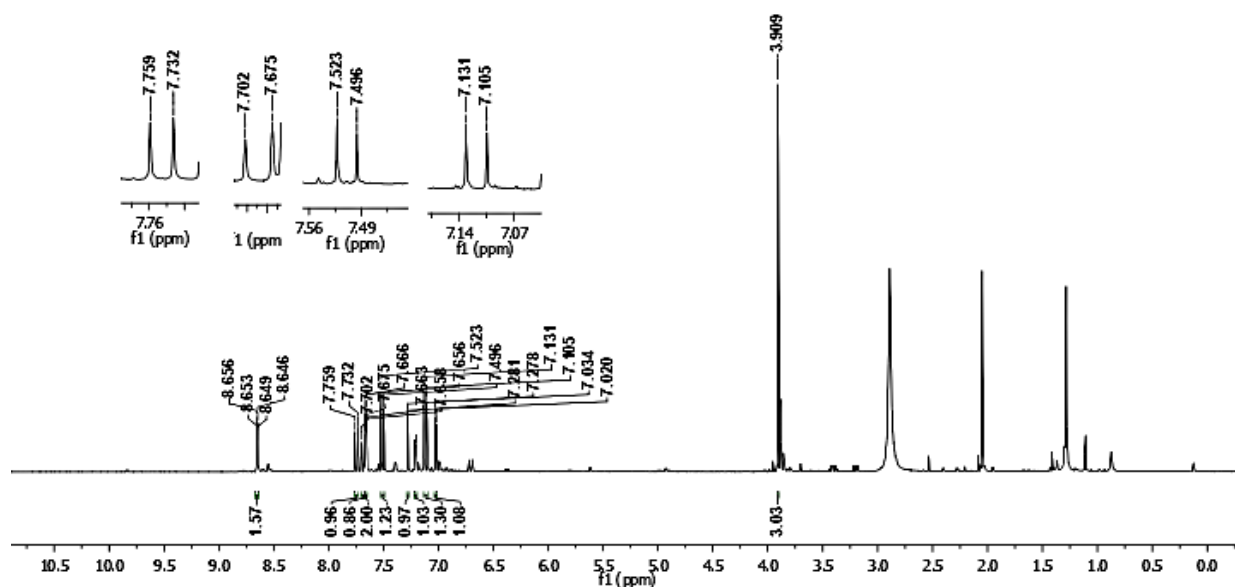


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM11

RMN de ^{13}C (150 MHz; Acetone- d_6), δ_{C} em ppm: 56,3 (4-OCH₃), 112,3 (C-5), 114,6 (C-2), 122,9 (C-3' e C-5'), 123,0 (C-6), 124,2 (C- α), 129,0 (C-1), 130,4 (C- α') 139,9 (C- β'), 143,3 (C- β), 144,7 (C-4'), 147,9 (C-3), 150,7 (C-4), 151,0 (C-), 151,4 (C-2' e C-6'), 188,6 (C=O).

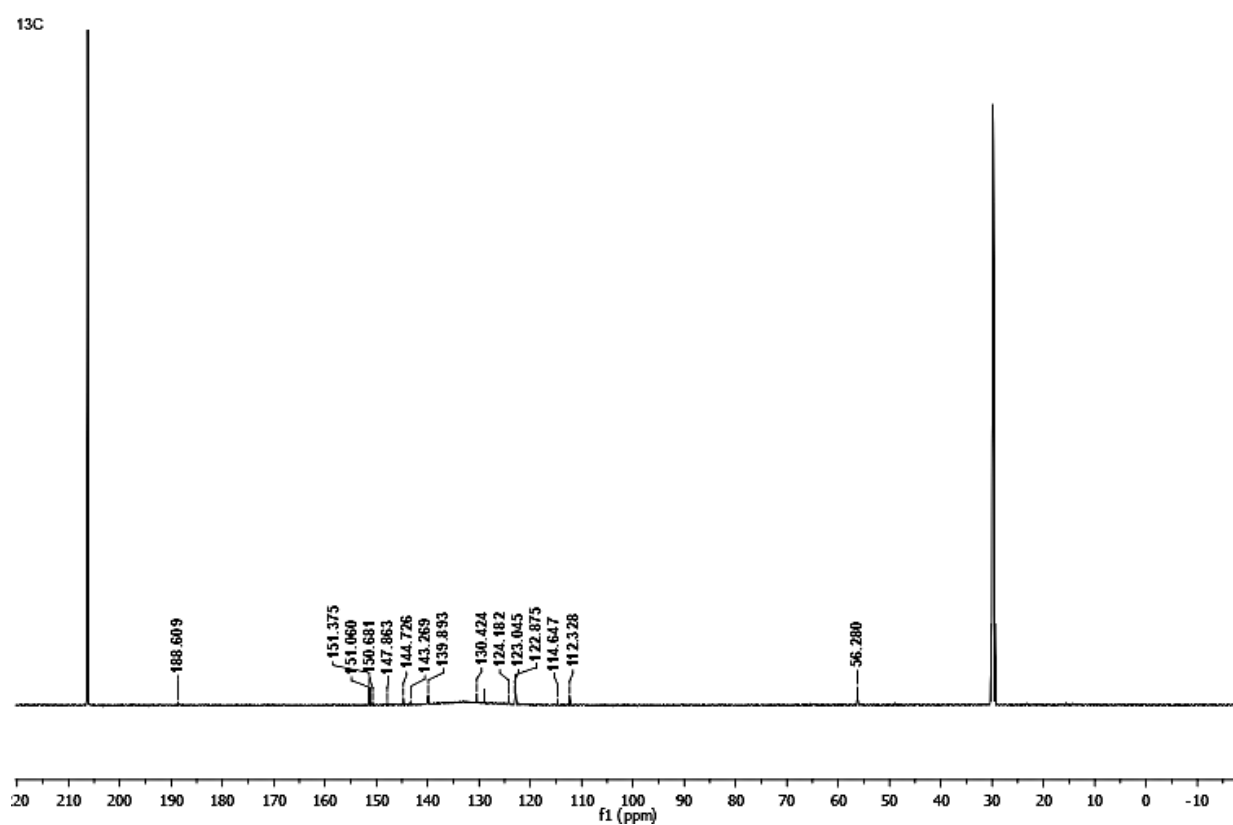
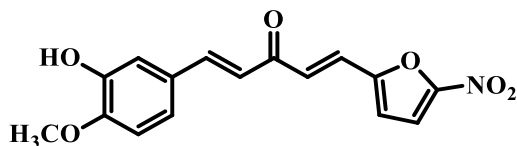


Figura 22. Espectro de RMN ^1H do composto GRM12



(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(5-nitrofuran-2-yl)penta-1,4-dien-3-one

Solido avermelhado

Rendimento: 51%

Ponto de fusão: 82–84°C

RMN de ^1H (600 MHz; DMSO- d_6), δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz): 3,83 (s; 3H; 4-OCH₃), 7,00 (d; J = 8,4 Hz; 1H; H-5), 7,15 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- α'), 7,22–7,25 (m; 2H; H-2 e H-6), 7,32 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- α), 7,33 (d; J = 4,8 Hz; 1H; H-3'), 7,60 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- β), 7,66 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- β'), 7,79 (s; 1H; H-4'), 9,24 (s; 1H; OH).

Prof. Luis Octavio, amostra Gaciele de Moraes, GRM20 (4 mg) em DMSO- d_6 25,0 C

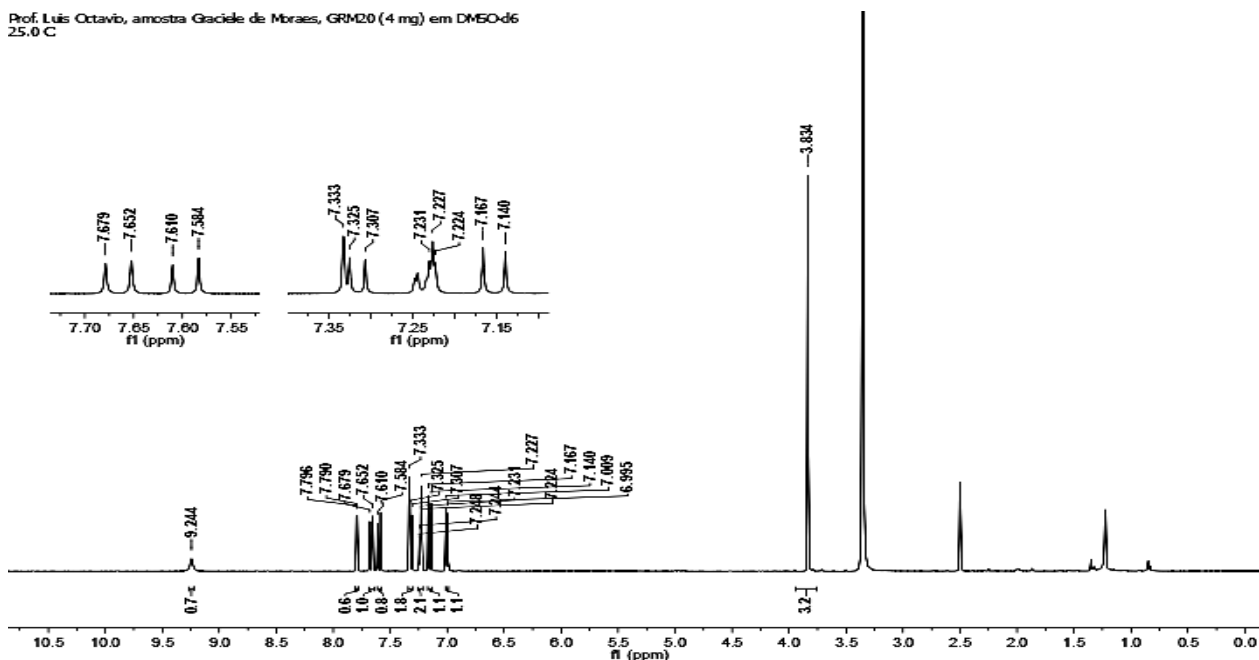


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM12

RMN de ^{13}C (150 MHz; DMSO- d_6), δ_c em ppm: 56,1 (4-OCH₃), 112,4 (C-5), 114,7 (C-2), 115,2 (C-4'), 117,8 (C-3'), 122,9 (C-6), 123,4 (C- α), 127,4 (C-1), 127,7 (C- α'), 129,1 (C- β'), 145,0 (C- β), 147,1 (C-3), 152,0 (C-4), 152,3 (C-5'), 153,7 (C-1'), 187,9 (C=O).

Prof. Luis Octavio, amostra Graciele de Moraes, GRM20 (11 mg) em DMSO- d_6
25.0 C
13C

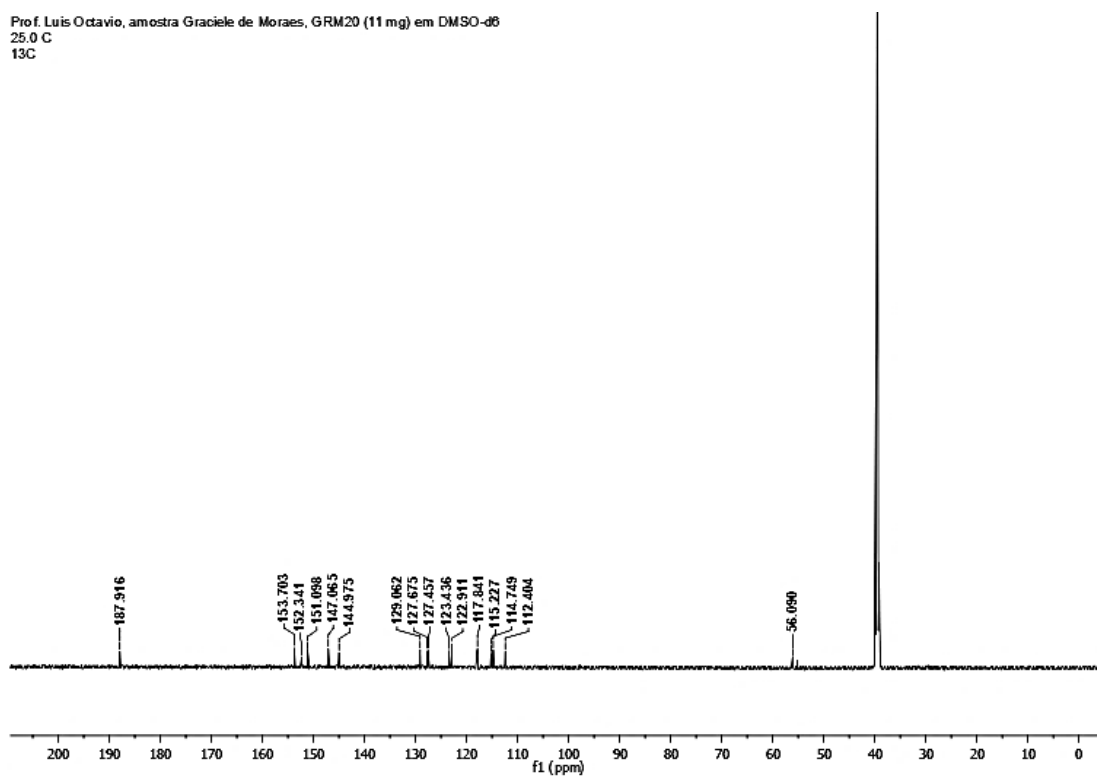
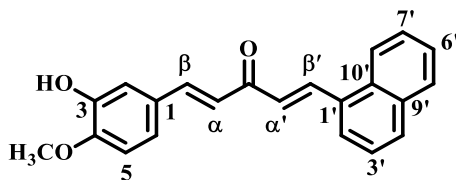


Figura 24. Espectro de RMN ^1H do composto GRM13



(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(naphthalen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one

Sólido Amarelo

Rendimento: 62%

RMN de ^1H (600 MHz; CDCl_3), δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz): 3,94 (s; H; 4- OCH_3), 5,78 (s; 1H; 3-OH), 6,88 (d; $J = 8,4$ Hz; 1H; H-5), 6,99 (d; $J = 16,2$ Hz; 1H; H- α), 7,14 (dd; $J = 1,8$ e $8,4$ Hz; 1H; H-6), 7,16 (d; $J = 15,6$ Hz; 1H; H- α'), 7,27 (d; $J = 1,8$ Hz; 1H; H-2), 7,50–7,56 (m; 2H; H-6' e H-7'), 7,58–7,61 (m; 1H; H-3'), 7,71 (d; $J = 15,6$ Hz; 1H; H- β'), 7,85–7,92 (m; 3H; H-2', H-4', H-8'), 8,26 (d; $J = 2,4$ Hz; 1H; H-1'), 8,57 (d; $J = 15,6$ Hz; 1H; H- β).

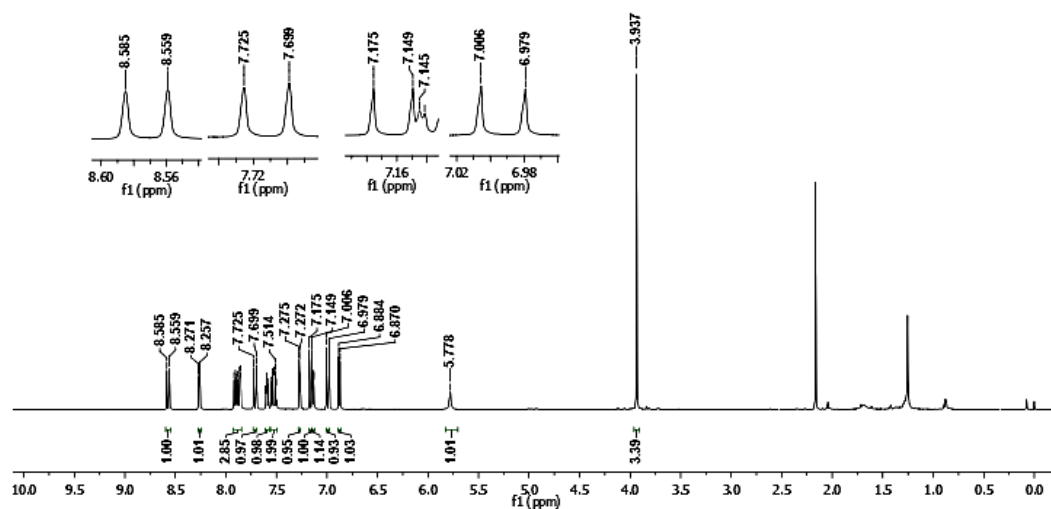


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM13

RMN de ^{13}C (150 MHz; CDCl_3), δ_{C} em ppm: 56,2 (4- OCH_3), 110,8 (C-5), 113,3 (C-2), 122,8 (C-6), 123,6 (C-2'), 124,2 (C- α'), 125,2 (C- α), 125,6 (C-8'), 126,4 (C-6'), 127,1 (C-7'), 128,2 (C-3'), 128,6 (C-1), 128,9 (C-4'), 130,8 (C-5'), 131,9 (C-10'), 132,5 (C-9'), 133,9 (C-1'), 139,9 (C- β'), 143,7 (C- β), 146,1 (C-3), 149,0 (C-4), 188,9 (C=O).

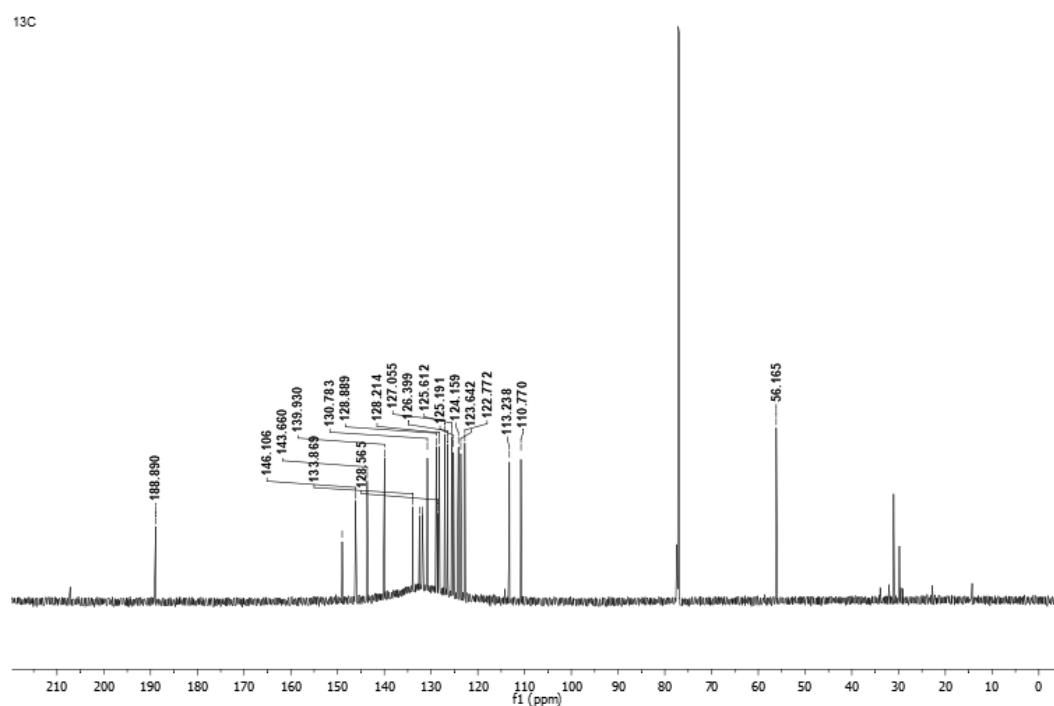
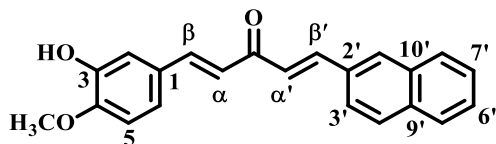


Figura 26. Espectro de RMN ^1H do composto GRM14



(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(naphthalen-2-yl)penta-1,4-dien-3-one

Sólido amarelo

Rendimento: 70%

RMN de ^1H (600 MHz; Acetone- d_6), δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz): 3,91 (s; H; 4-OCH $_3$), 7,03 (d; J = 8,4 Hz; 1H; H-5), 7,18 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- α), 7,22 (dd; J = 2,4 e 8,4 Hz; 1H; H-6), 7,30 (d; J = 2,4 Hz; 1H; H-2), 7,42 (d; J = 16,2 Hz; 1H; H- α'), 7,55–7,59 (m; 2H; H-6' e H-7'), 7,74 (d; J = 15,6 Hz; 1H; H- β), 7,92–7,99 (m; 5H; H-3', H-4', H-5', H-8' e H- β'), 8,21 (s; 1H; H-1').

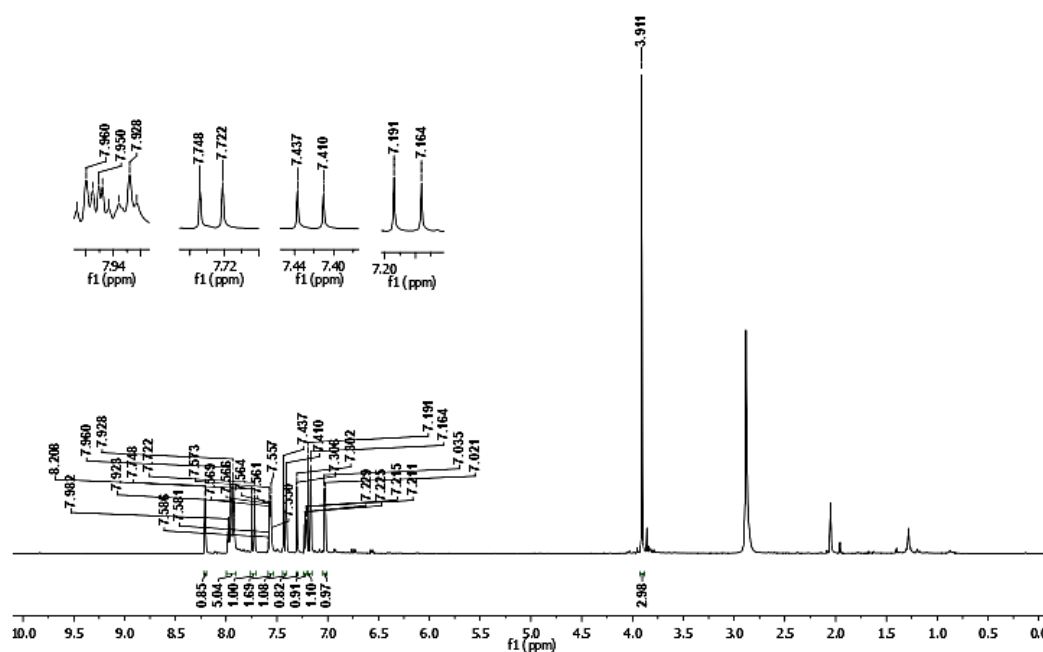


Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C do composto GRM14

RMN de ^{13}C (150 MHz; Acetone- d_6), δ_{C} em ppm: 56,3 (4-OCH₃), 112,3 (C-5), 114,8 (C-2), 122,8 (C-6), 124,5 (C- α'), 124,7 (C- α), 127,1 (C-3'), 127,6 (C-6'), 128,1 (C-7'), 128,6 (C-1), 129,3 (C-5'), 129,4 (C-1'), 129,5 (C-4'), 131,1 (C-8'), 133,8 (C-9'), 134,5 (C-2'), 135,2 (C-10'), 142,9 (C- β'), 143,8 (C- β), 147,9 (C-3), 150,9 (C-4), 188,8 (C=O).

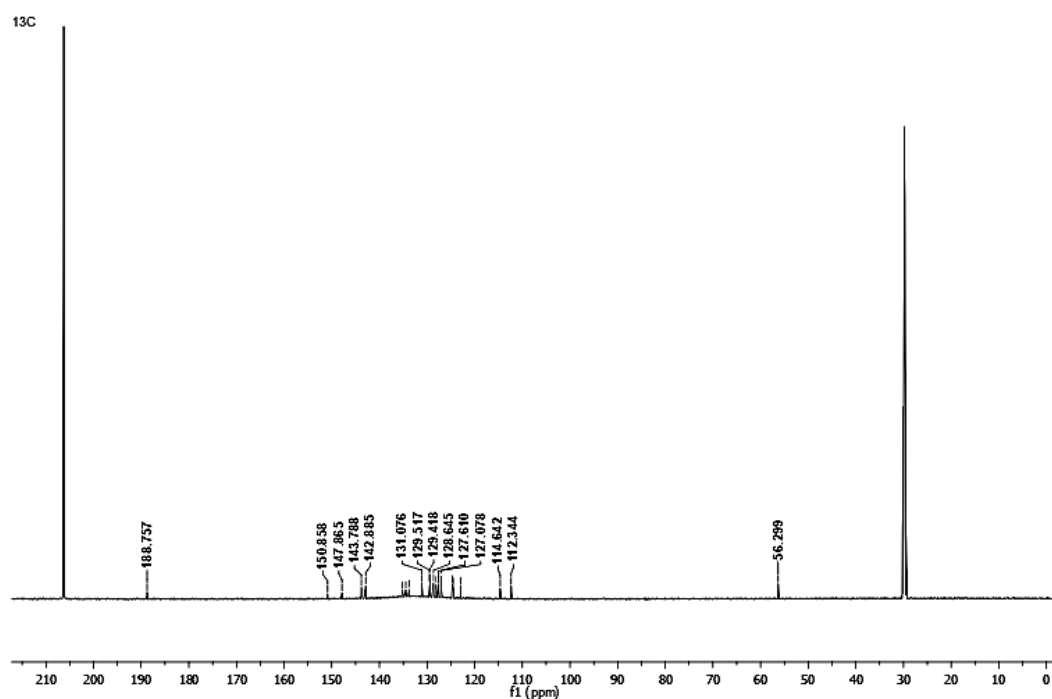


Figura 28. Cromatograma de CLAE da GRM01 a 254nm

Análise de pureza por CLAE

Equipamento: *Agilent 1220 Infinity LC e do software: Agilent Chemstation*

Local: *Bioen, Ibilce*

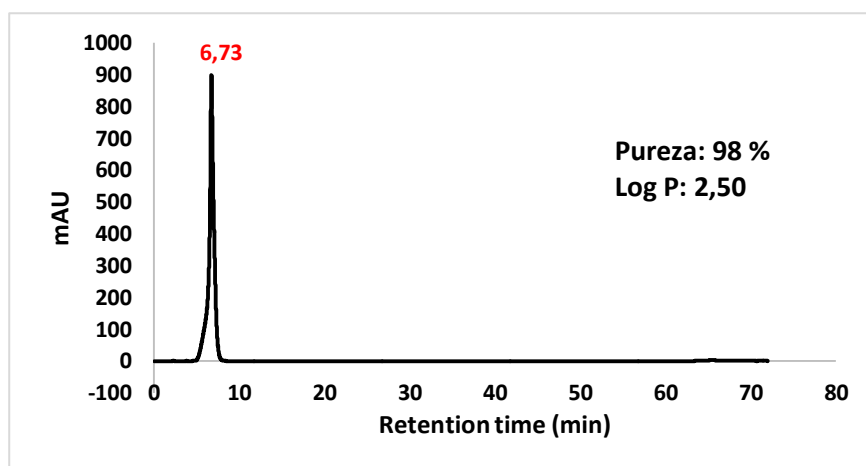
Volume de injeção: *20 µL*

Fase móvel: *metanol:água (75:25) com 0,5% de ácido acético*

Tempo de corrida: *60 minutos*

Cromatograma

(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-phenylpenta-1,4-dien-3-one



Espectro UV-Vis

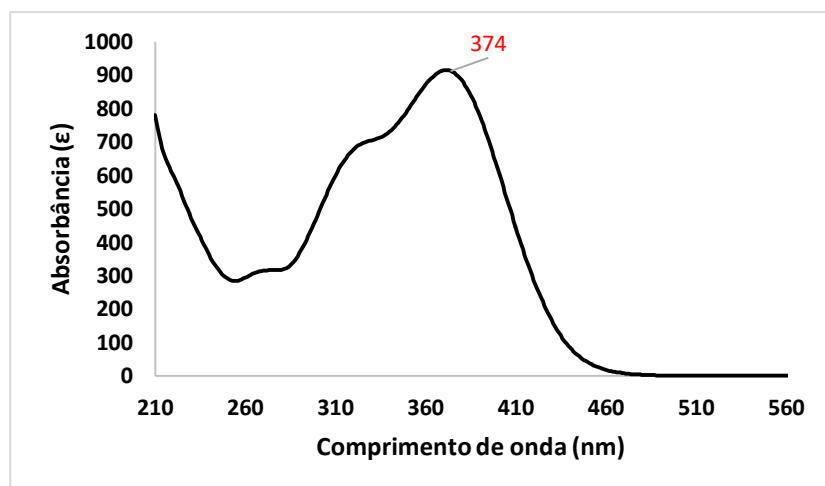


Figura 29. Cromatograma de CLAE da GRM02 a 254 nm

Análise de pureza por CLAE

Equipamento: *Agilent 1220 Infinity LC e do software: Agilent Chemstation*

Local: *Bioen, Ibilce*

Volume de injeção: *20 μ L*

Fase móvel: *metanol:água (75:25) com 0,5% de ácido acético*

Tempo de corrida: *60 minutos*

(1E,4E)-1,5-bis(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one

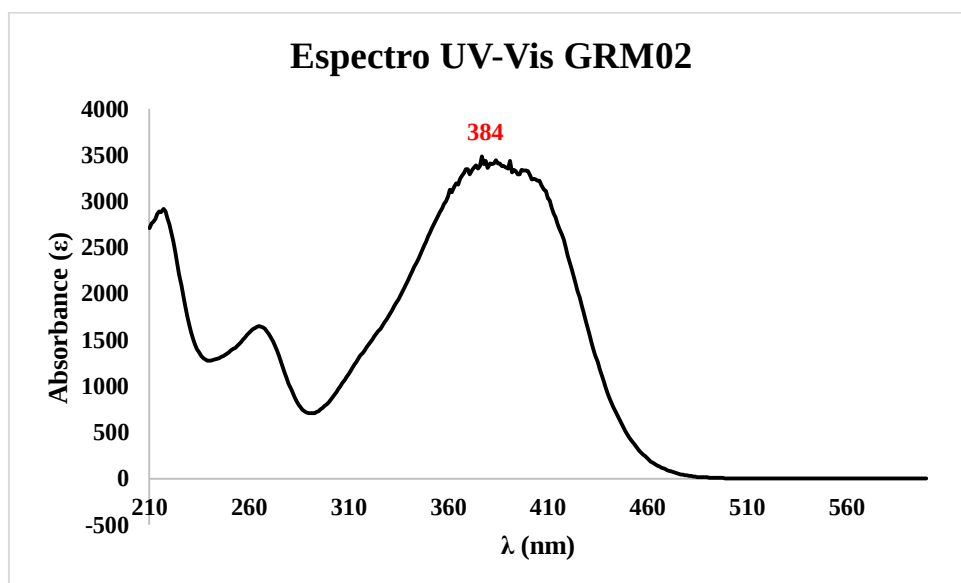
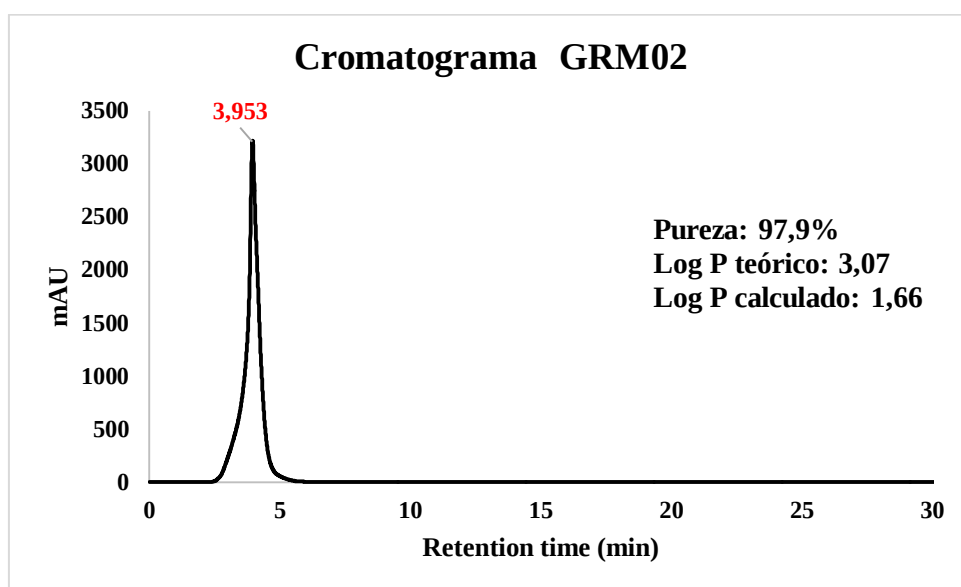


Figura 30. Cromatograma de CLAE da GRM03 a 254 nm

Análise de pureza por CLAE

Equipamento: *Agilent 1220 Infinity LC e do software: Agilent Chemstation*

Local: *Bioen, Ibilce*

Volume de injeção: *20 μ L*

Fase móvel: *metanol:água (75:25) com 0,5% de ácido acético*

Tempo de corrida: *60 minutos*

(1E,4E)-1-(3-chlorophenyl)-5-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one

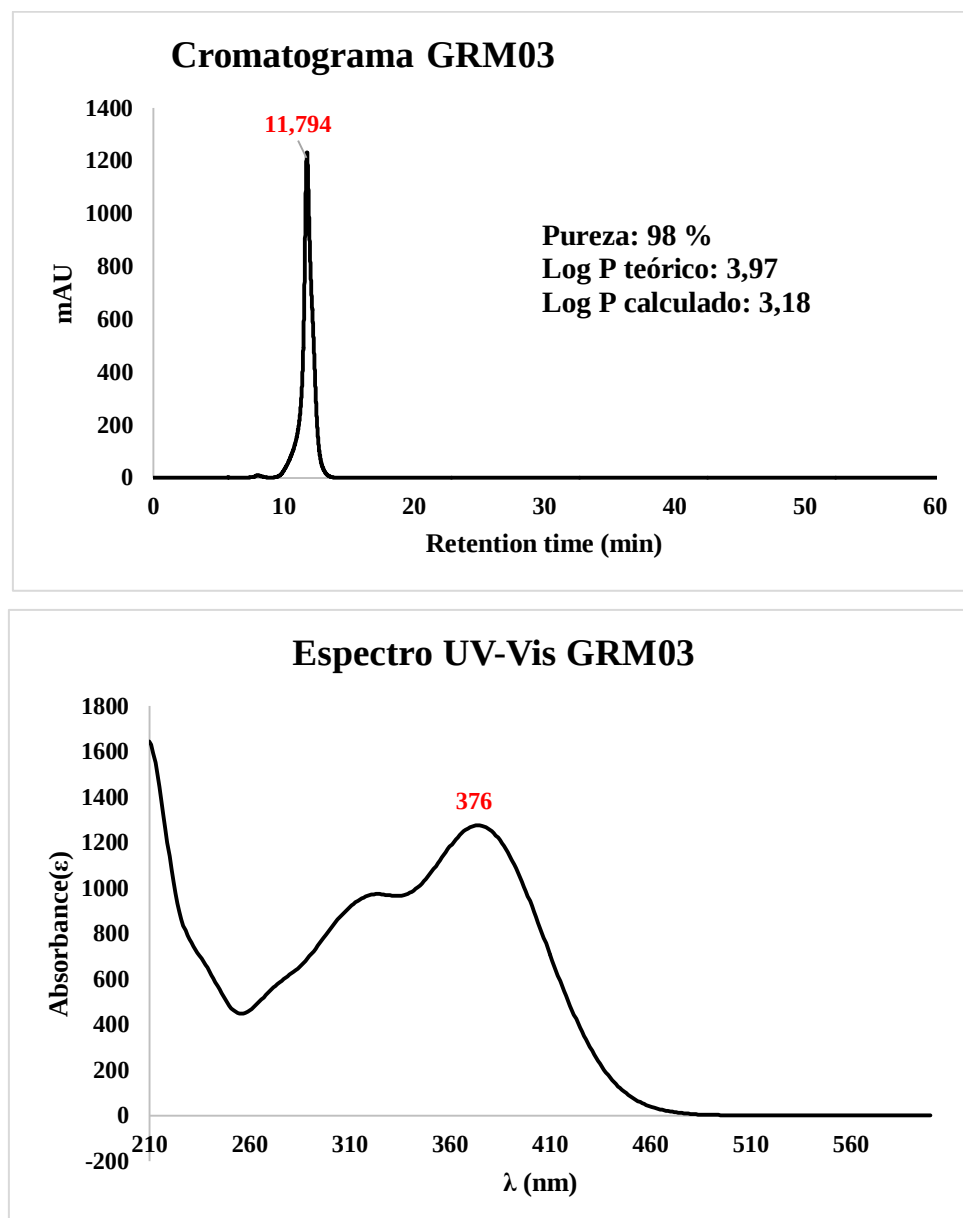


Figura 31. Cromatograma de CLAE da GRM04 a 254 nm

Análise de pureza por CLAE

Equipamento: *Agilent 1220 Infinity LC e do software: Agilent Chemstation*

Local: *Bioen, Ibilce*

Volume de injeção: *20 μ L*

Fase móvel: *metanol:água (75:25) com 0,5% de ácido acético*

Tempo de corrida: *60 minutos*

(1E,4E)-1-(4-chlorophenyl)-5-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one

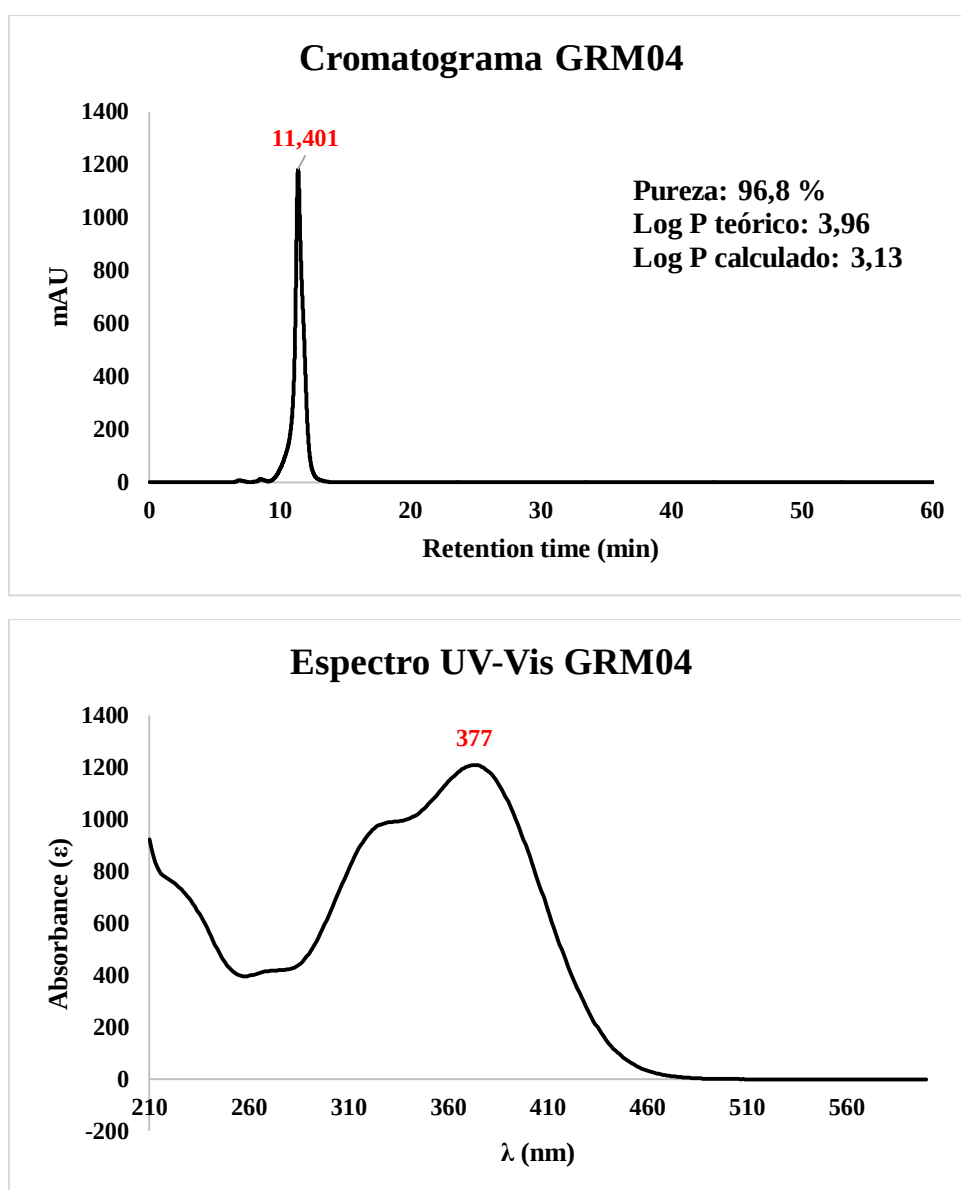


Figura 32. Cromatograma de CLAE da GRM05 a 254nm

Análise de pureza por CLAE

Equipamento: *Agilent 1220 Infinity LC e do software: Agilent Chemstation*

Local: *Bioen, Ibilce*

Volume de injeção: 20 μ L

Fase móvel: *metanol:água (70:30) com 0,5% de ácido acético*

Tempo de corrida: 60 minutos

(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(3-nitrophenyl)penta-1,4-dien-3-one

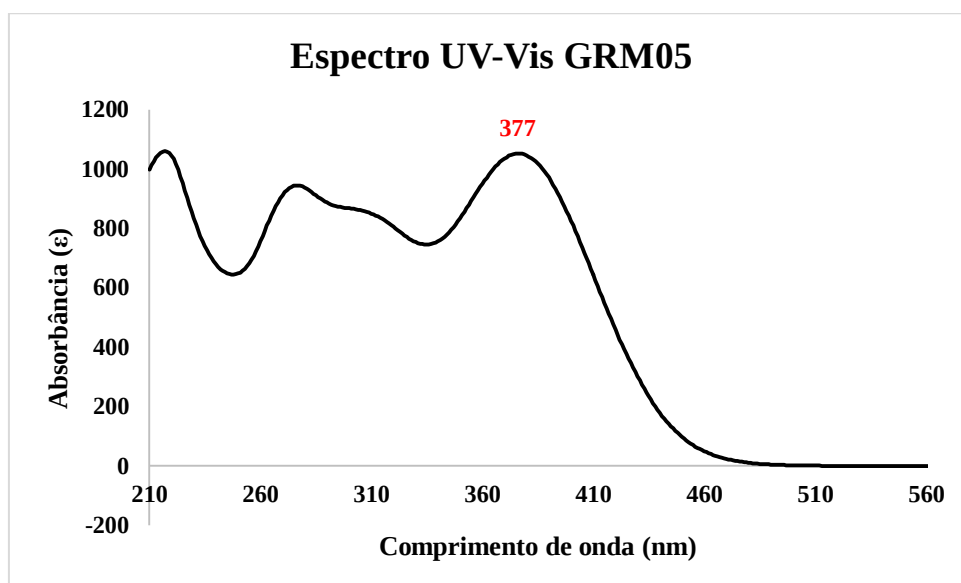
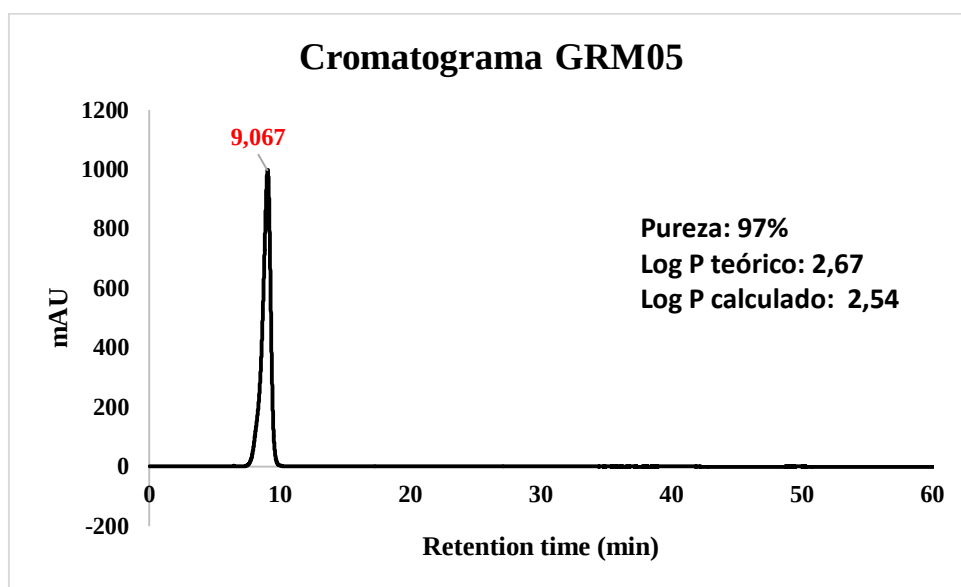


Figura 33. Cromatograma de CLAE da GRM06 a 254nm

Análise de pureza por CLAE

Equipamento: *Agilent 1220 Infinity LC* e do software: *Agilent Chemstation*

Local: *Bioen, Ibilce*

Volume de injeção: 20 μ L

Fase móvel: *metanol:água (70:30) com 0,5% de ácido acético*

Tempo de corrida: 60 minutos

(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(4-nitrophenyl)penta-1,4-dien-3-one

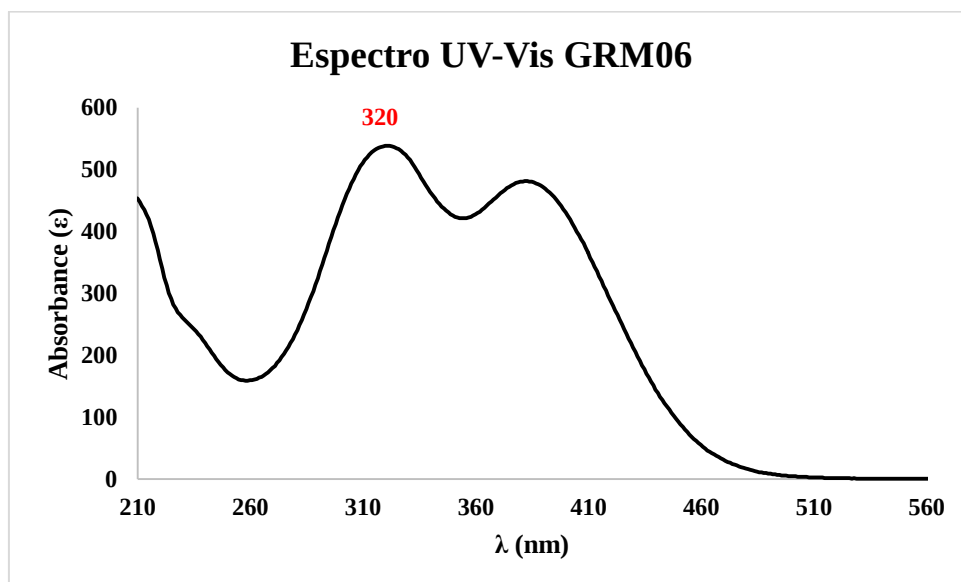
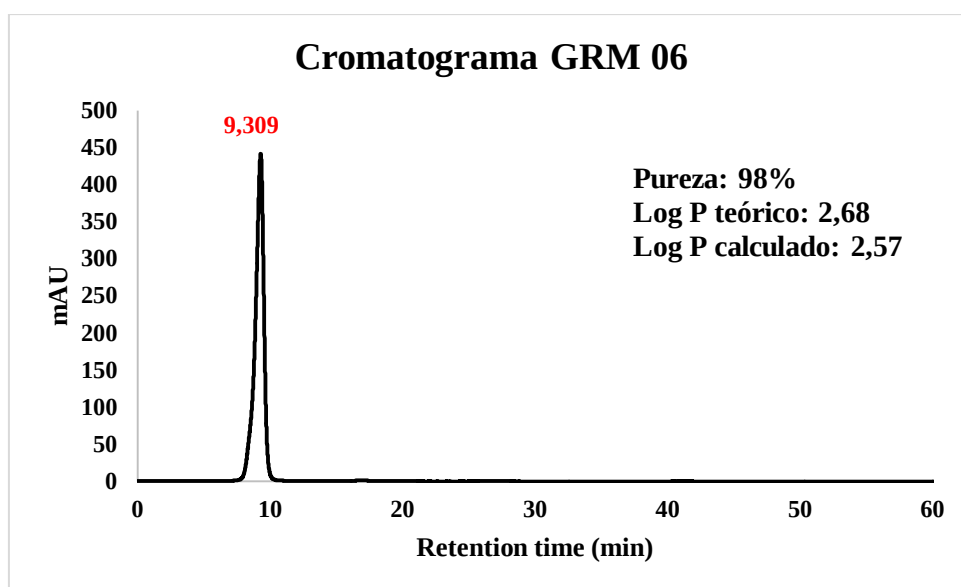


Figura 34. Cromatograma de CLAE da GRM07 a 254nm

Análise de pureza por CLAE

Equipamento: *Agilent 1220 Infinity LC e do software: Agilent Chemstation*

Local: *Bioen, Ibilce*

Volume de injeção: *20 μ L*

Fase móvel: *metanol:água (80:20) com 0,5% de ácido acético*

Tempo de corrida: *60 minutos*

(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)penta-1,4-dien 3-one

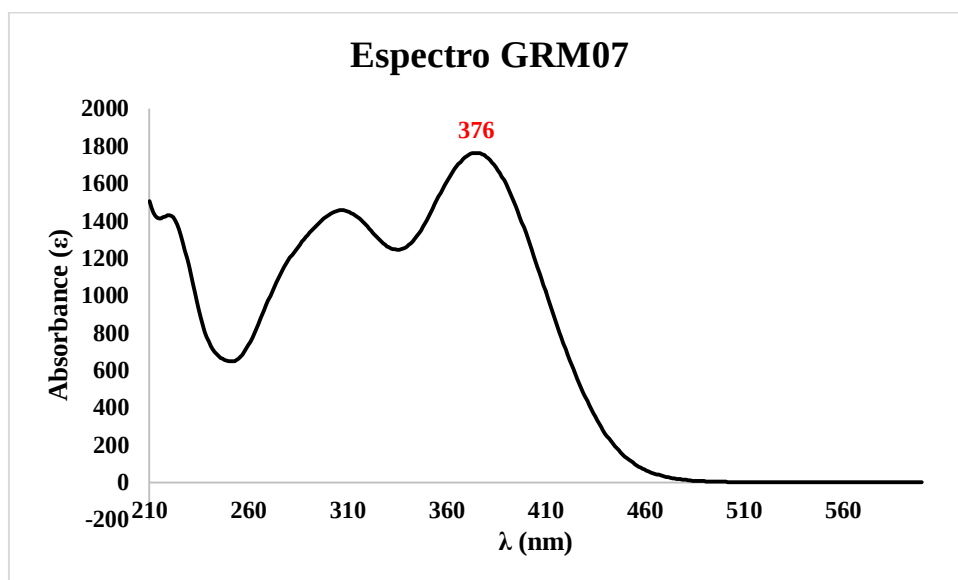
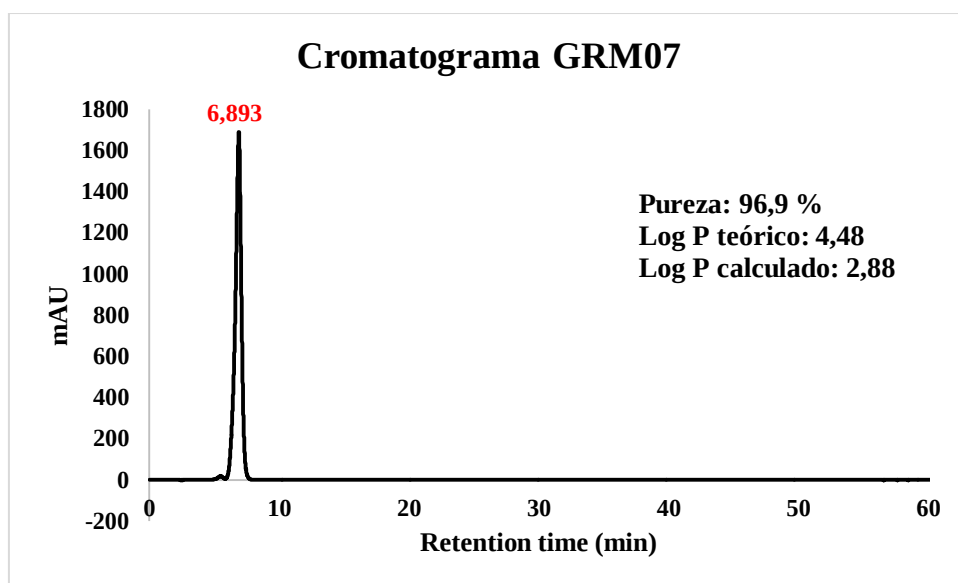


Figura 35. Cromatograma de CLAE da GRM08 a 254 nm

Análise de pureza por CLAE

Equipamento: *Agilent 1220 Infinity LC e do software: Agilent Chemstation*

Local: *Bioen, Ibilce*

Volume de injeção: 20 μ L

Fase móvel: *metanol:água (70:30) com 0,5% de ácido acético*

Tempo de corrida: 60 minutos

(1E,4E)-1-(furan-2-yl)-5-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one

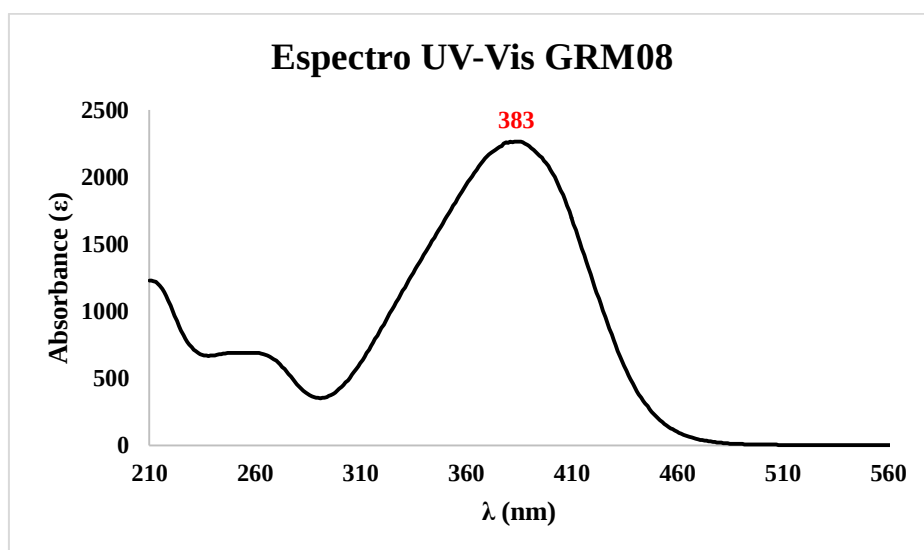
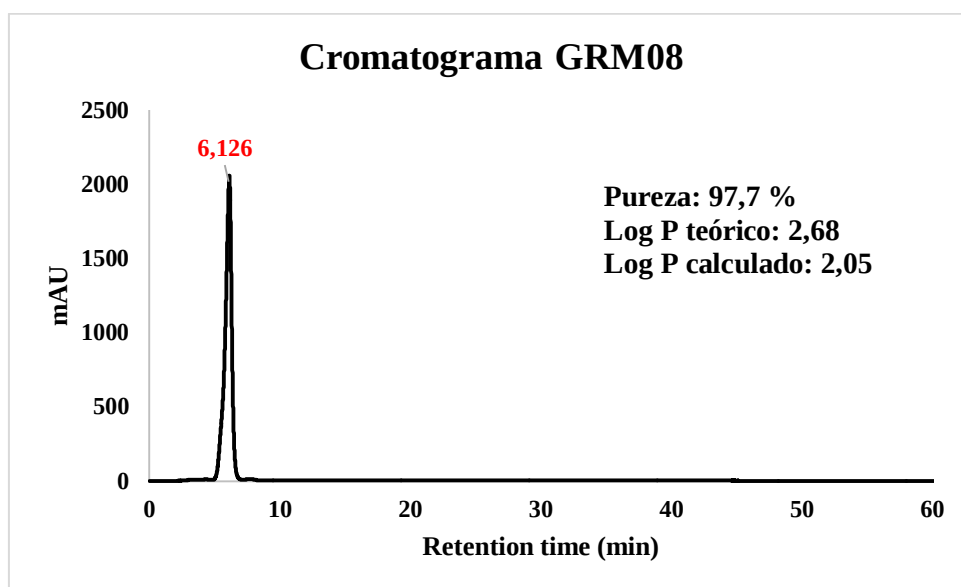


Figura 36. Cromatograma de CLAE da GRM09 a 254nm

Análise de pureza por CLAE

Equipamento: *Agilent 1220 Infinity LC e do software: Agilent Chemstation*

Local: *Bioen, Ibilce*

Volume de injeção: *20 μ L*

Fase móvel: *metanol:água (75:25) com 0,5% de ácido acético*

Tempo de corrida: *60 minutos*

(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(thiophen-2-yl)penta-1,4-dien-3-one

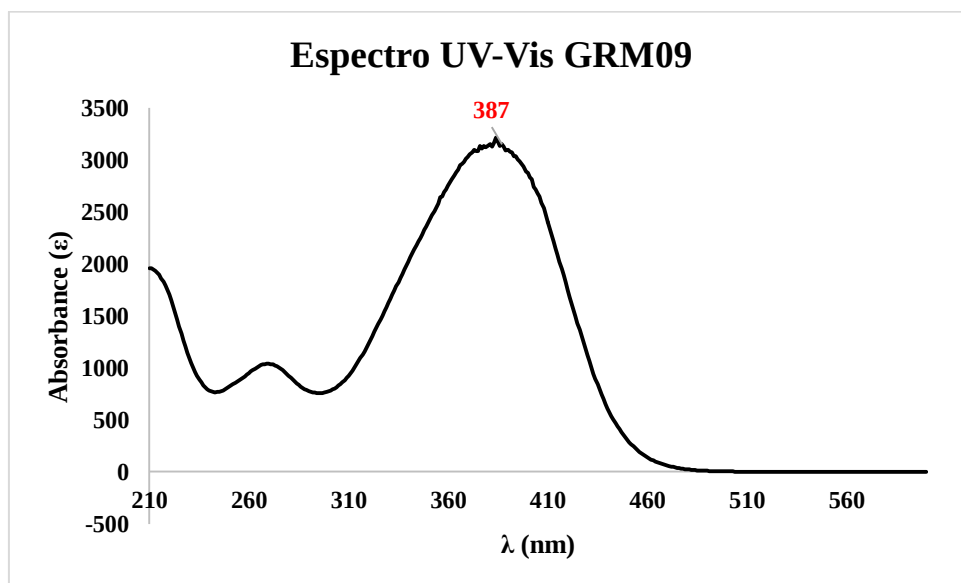
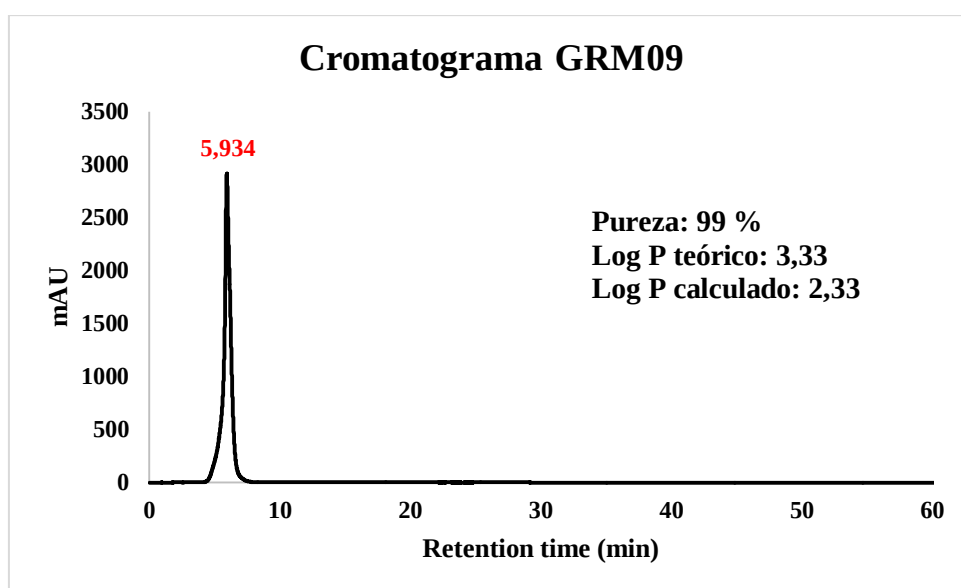


Figura 37. Cromatograma de CLAE da GRM11 a 254 nm

Análise de pureza por CLAE

Equipamento: *Agilent 1220 Infinity LC e do software: Agilent Chemstation*

Local: *Bioen, Ibilce*

Volume de injeção: *20 μ L*

Fase móvel: *metanol:água (70:30) sem dopagem com ácido*

Tempo de corrida: *60 minutos*

(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)penta-1,4-dien-3-one

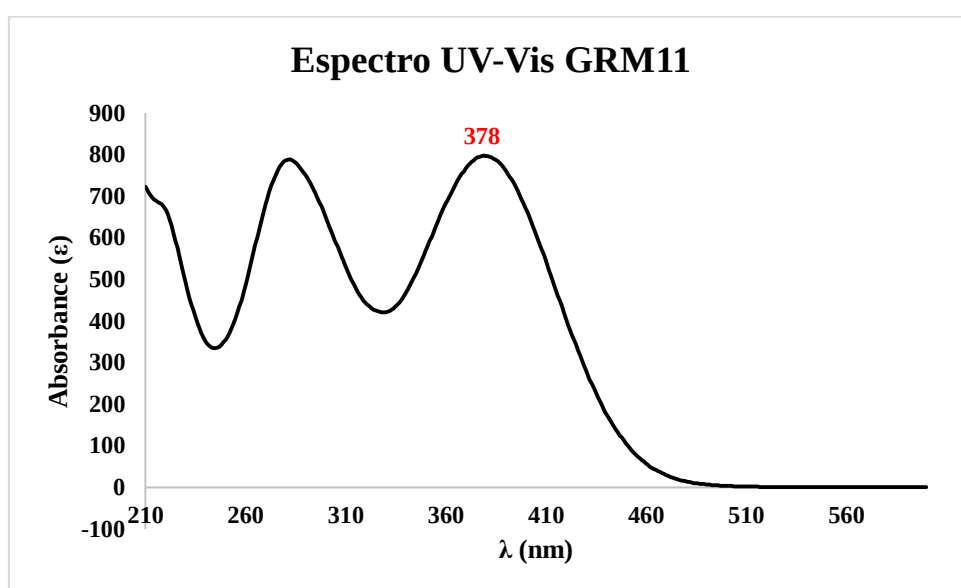
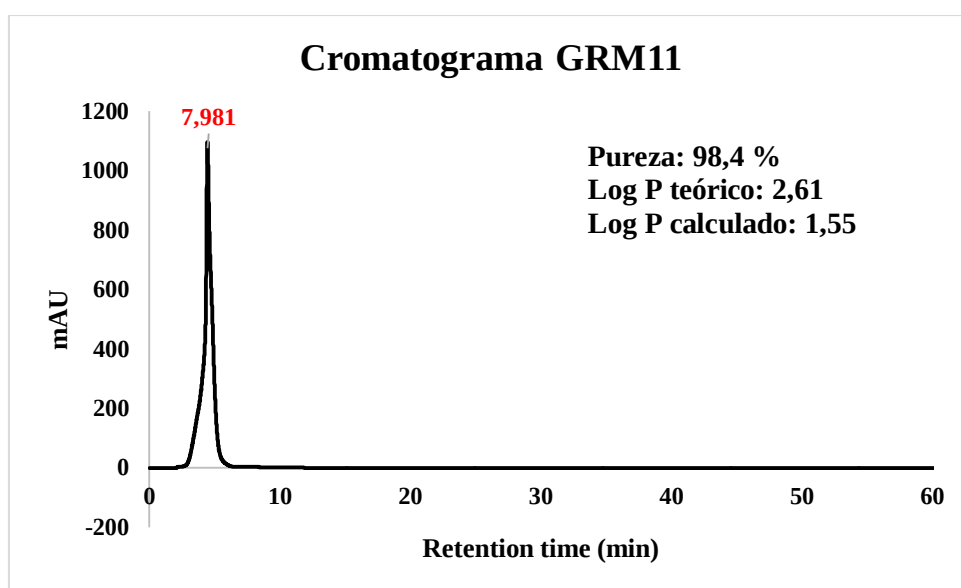


Figura 38: Cromatograma de CLAE da GRM12 a 254nm

Análise de pureza por CLAE

Equipamento: *Agilent 1220 Infinity LC e do software: Agilent Chemstation*

Local: *Bioen, Ibilce*

Volume de injeção: *20 μ L*

Fase móvel: *metanol:água (70:30) com 0,5% de ácido acético*

Tempo de corrida: *60 minutos*

(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(5-nitrofuran-2-yl)penta-1,4-dien-3-one

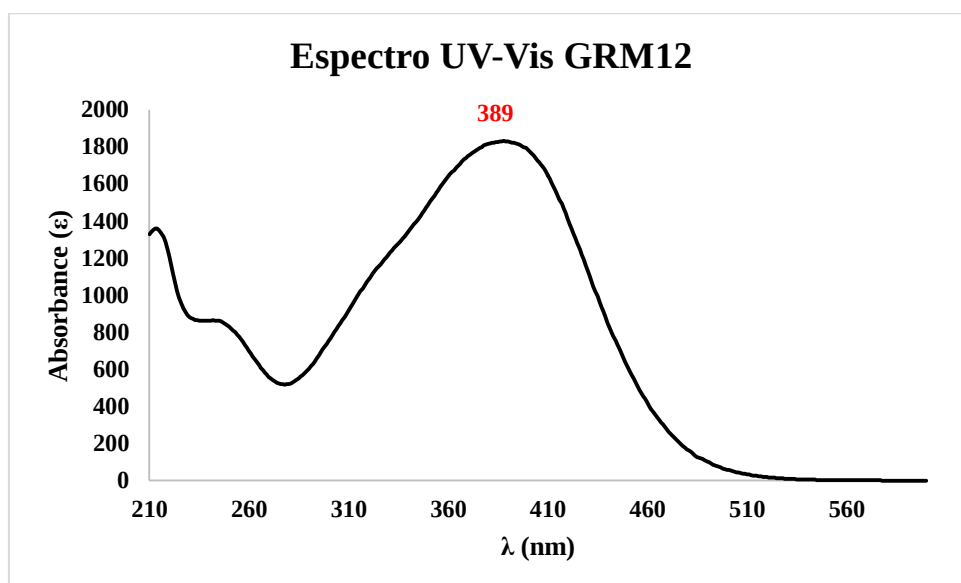
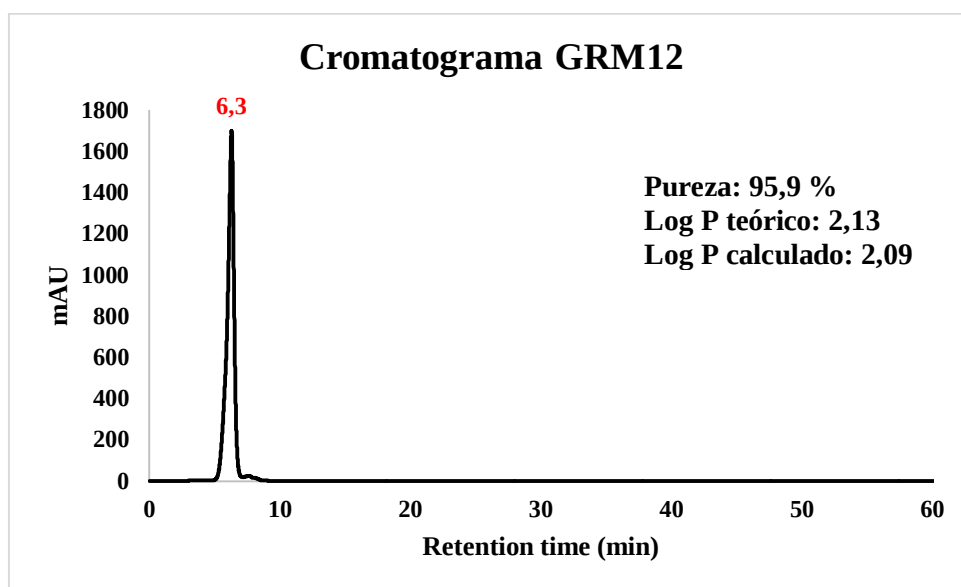


Figura 39. Cromatograma de CLAE da GRM13 a 254nm

Análise de pureza por CLAE

Equipamento: *Agilent 1220 Infinity LC e do software: Agilent Chemstation*

Local: *Bioen, Ibilce*

Volume de injeção: 20 μ L

Fase móvel: *metanol:água (70:30) com 0,5% de ácido acético*

Tempo de corrida: 60 minutos

(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(naphthalen-1-yl)penta-1,4-dien-3-one

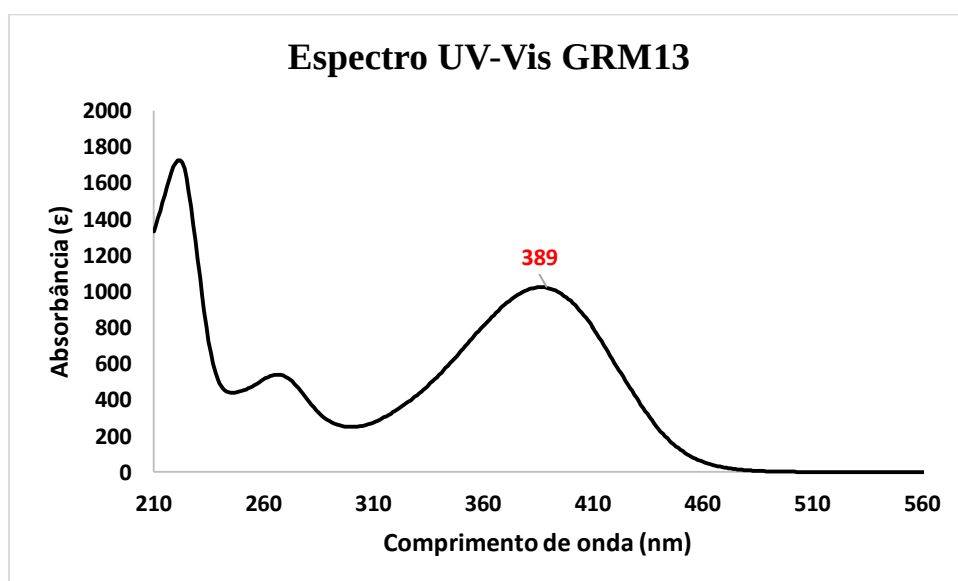
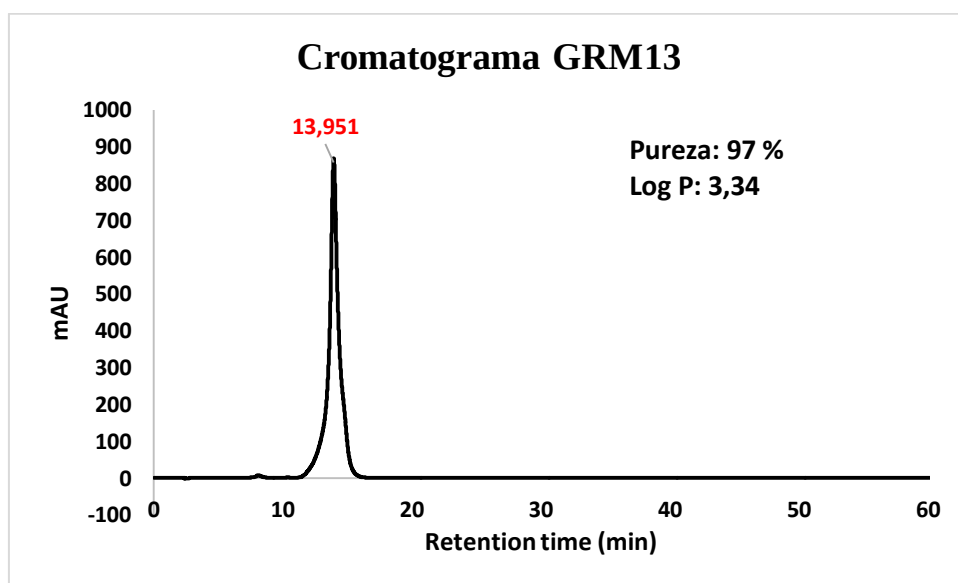


Figura 40. Cromatograma de CLAE da GRM14 a 254nm

Análise de pureza por CLAE

Equipamento: *Agilent 1220 Infinity LC e do software: Agilent Chemstation*

Local: *Bioen, Ibilce*

Volume de injeção: *20 μ L*

Fase móvel: *metanol:água (70:30) com 0,5% de ácido acético*

Tempo de corrida: *60 minutos*

(1E,4E)-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-5-(naphthalen-2-yl)penta-1,4-dien-3-one

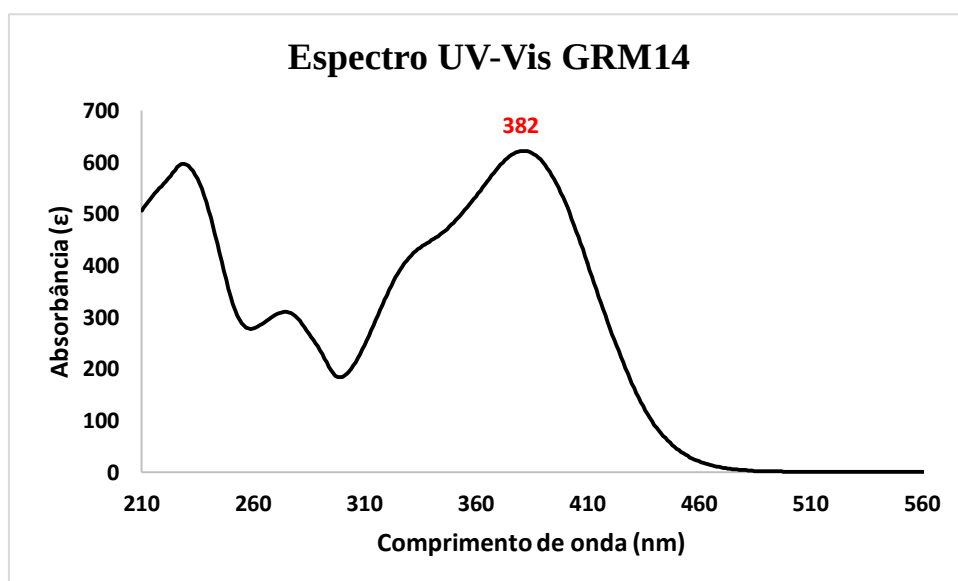
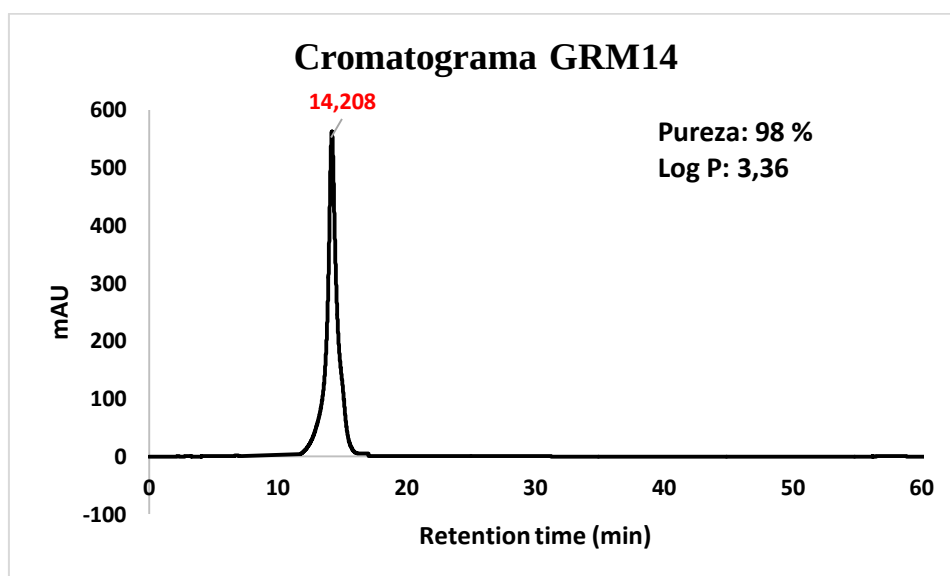


Figura 41. Espectrometria de massa GRM 01

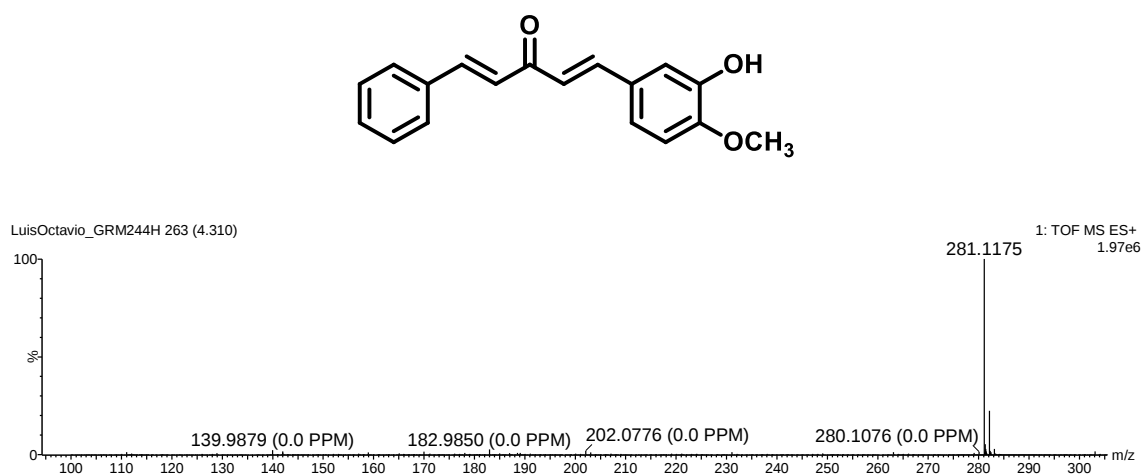


Figura 42. Espectrometria de massa GRM 02

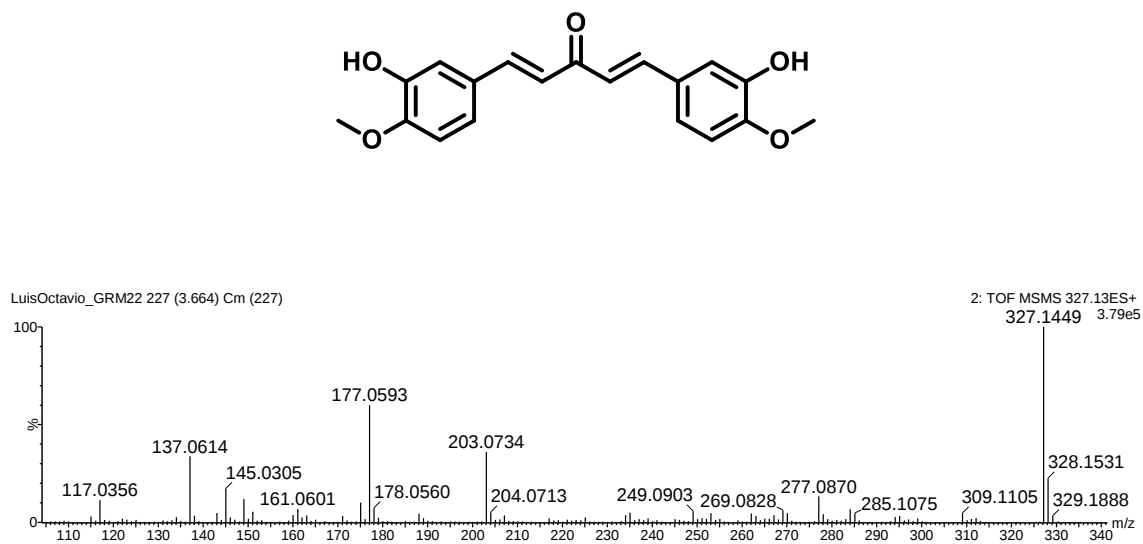


Figura 43. Espectrometria de massa GRM 03

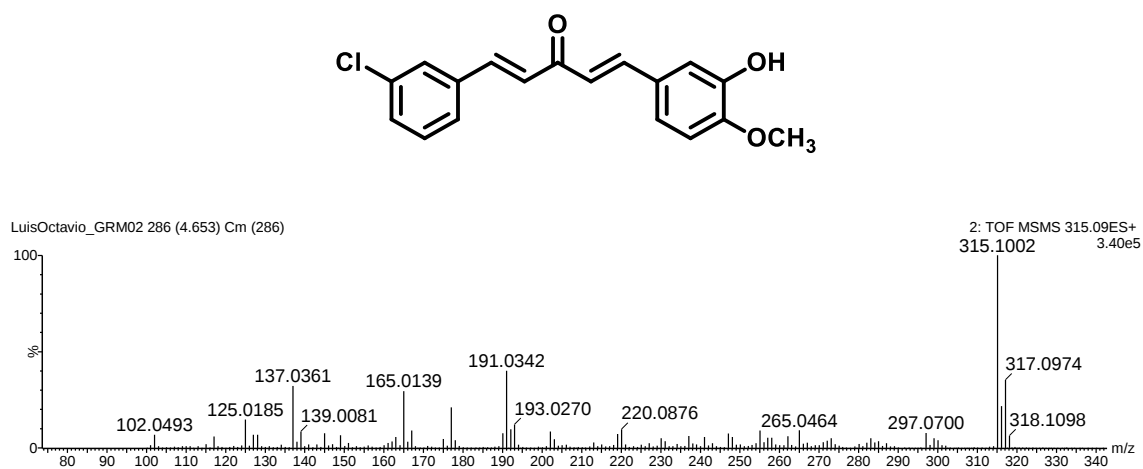


Figura 44. Espectrometria de massa GRM 04

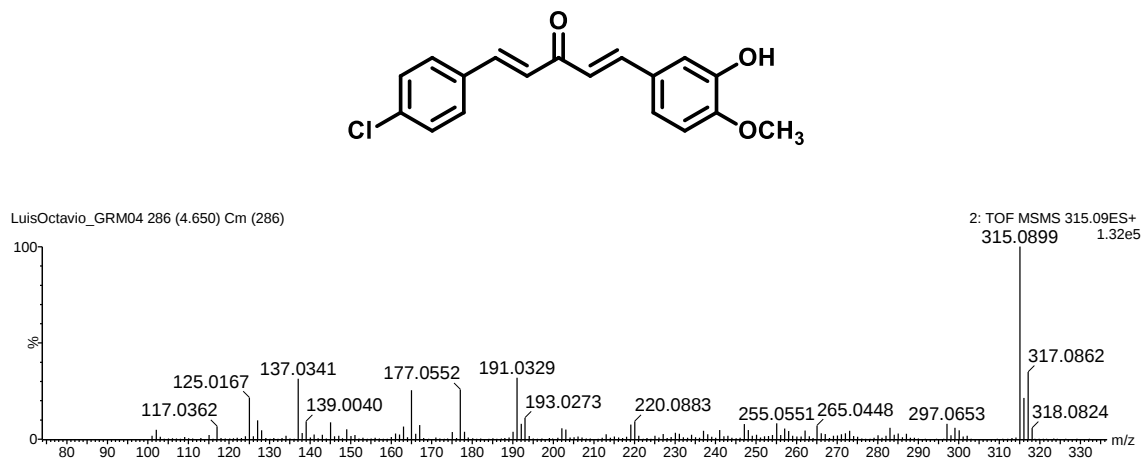


Figura 45. Espectrometria de massa GRM 05

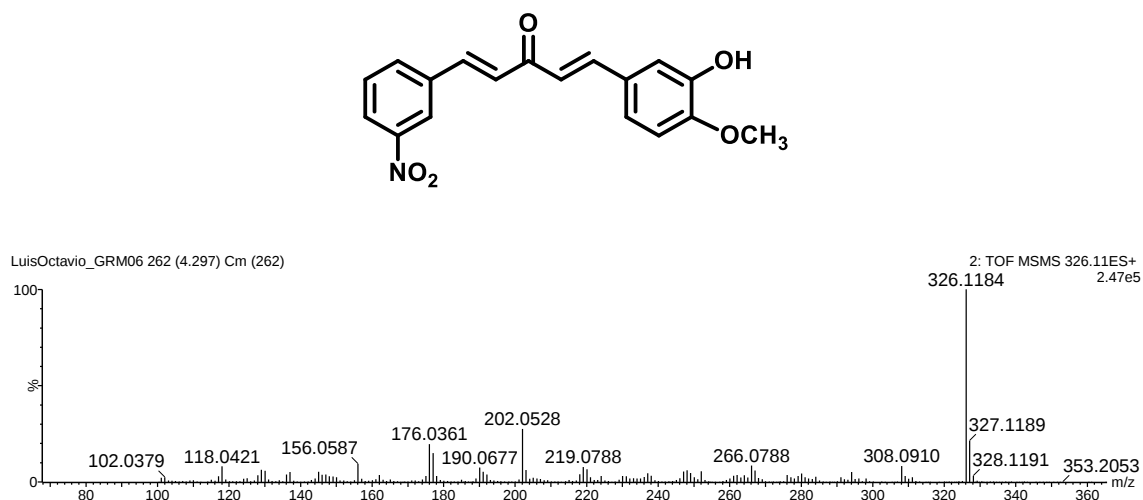


Figura 46. Espectrometria de massa GRM 06

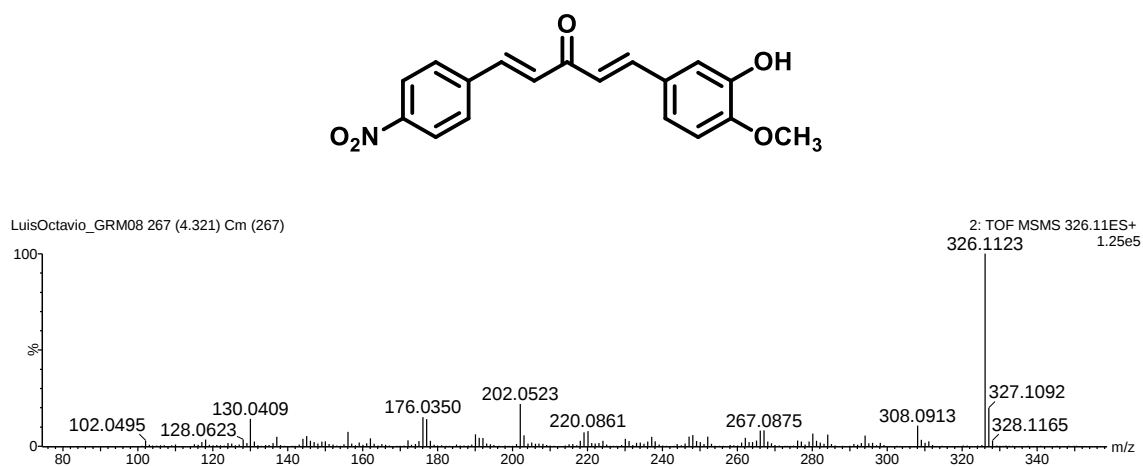


Figura 47. Espectrometria de massa GRM 07

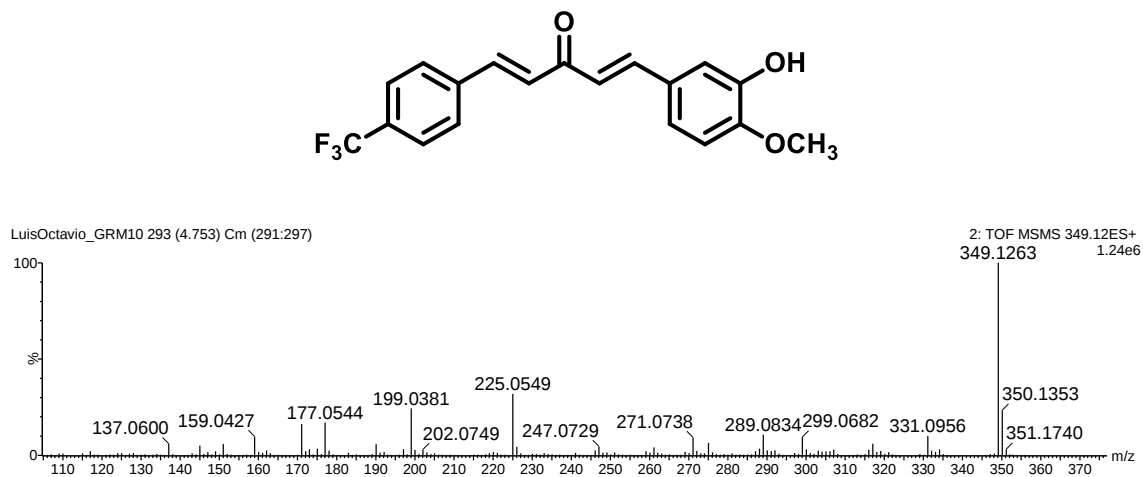


Figura 48. Espectrometria de massa GRM 08

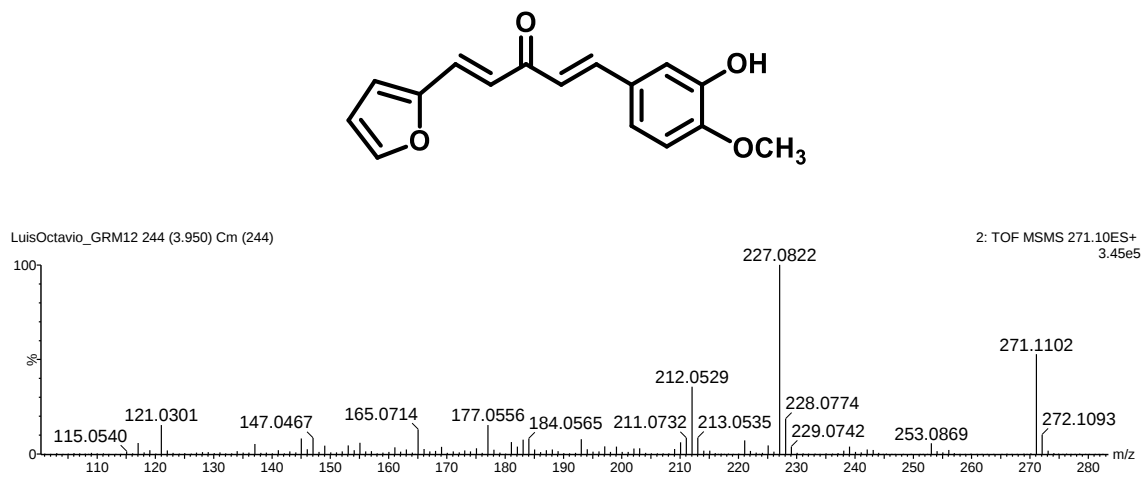


Figura 49. Espectrometria de massa GRM 09

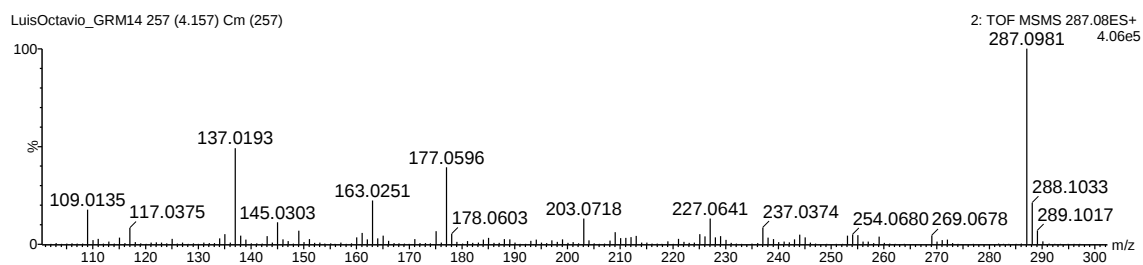
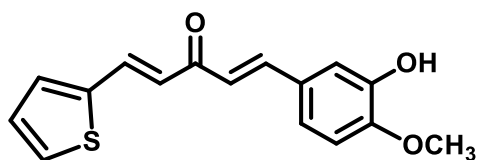


Figura 50. Espectrometria de massa GRM 10

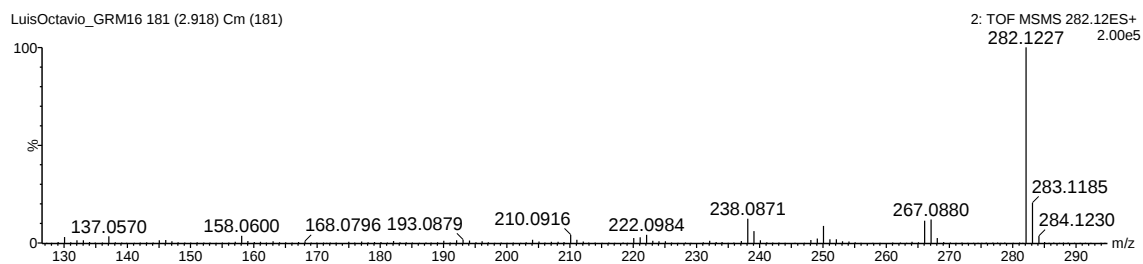
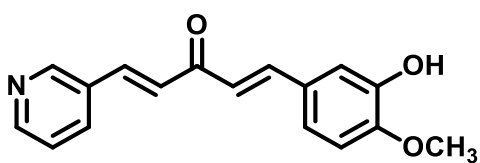


Figura 51. Espectrometria de massa GRM 11

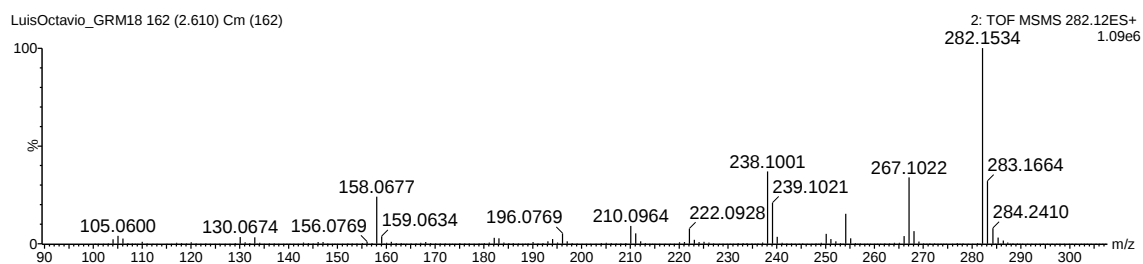
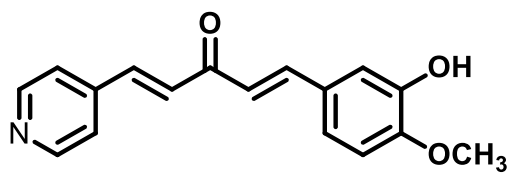
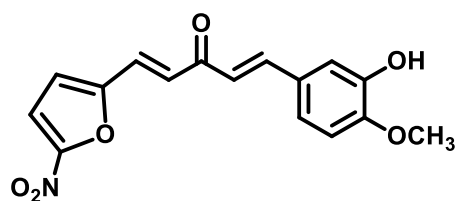


Figura 52. Espectrometria de massa GRM 12



Massa teórica 315.28

Massa Experimental (M+H)⁺ 316.08

