



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
EBIOTECNOLOGIA

Exploração de Aceptores de Michael contra proteases de interesse clínico:
Planejamento, triagem virtual e aplicação na resistência bacteriana e
tripanossomíase africana

VOLUME 1

KADJA LUANA CHAGAS MONTEIRO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins 57072-970 – Maceió - AL

KADJA LUANA CHAGAS MONTEIRO

Exploração de Aceptores de Michael contra proteases de interesse clínico:
Planejamento, triagem virtual e aplicação na resistência bacteriana e
trypanosomíase africana

Tese de doutorado apresentada
ao programa de pós-graduação
em Química e Biotecnologia
(PPGQB) da Universidade
Federal de Alagoas – UFAL,
como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em
Ciências.

Orientador: Thiago Mendonça de
Aquino

Coorientadores: Edeildo Ferreira
da Silva-Júnior e Tanja
Schirmeister

Maceió, 2025

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Elisângela Vilela dos Santos – CRB-4 – 2056

M775e Monteiro, Kadja Luana Chagas.

Exploração de aceptores de Michael contra proteases de interesse clínico: planejamento, triagem virtual e aplicação na resistência bacteriana e tripanossomíase africana / Kadja Luana Chagas Monteiro. – 2025.
216 f. : il. color.

Orientador: Thiago Mendonça de Aquino.

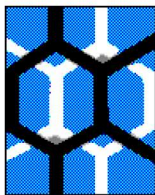
Coorientador: Edeildo Ferreira da Silva Junior.

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2025.

Bibliografia: f. 186-216.

1. Resistência antimicrobiana. 2. Tripanossomíase africana. 3. Proteases.
4. Aceptores de Michael. I. Título.

CDU: 54:616.937



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb@iqb.ufal.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda KADJA LUANA CHAGAS MONTEIRO intitulada: **“Exploração de Aceptores de Michael α,β -insaturados contra proteases de interesse clínico: Planejamento, triagem virtual, síntese e aplicação na resistência bacteriana e tripanossomíase africana”**, apresentada, em sessão aberta, ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 25 de abril de 2025, às 9 horas, na sala de aula da Pós-Graduação do Instituto de Química e Biotecnologia.

Maceió, 25 de abril de 2025.

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **THIAGO MENDONÇA DE AQUINO**
Data: 29/04/2025 10:35:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino
Orientador – (PPGQB/IQB/UFAL)

Documento assinado digitalmente
 **EDEILDO FERREIRA DA SILVA JÚNIOR**
Data: 29/04/2025 15:48:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior - Coorientador
(PPGQB/IQB/UFAL)

Profa. Dra. Tanja Schirmeister - Coorientadora
(JGU/Mainz/Alemanha)

Documento assinado digitalmente
 **JULIO COSME SANTOS DA SILVA**
Data: 29/04/2025 11:43:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Júlio Cosme Santos da Silva
(PPGQB/IQB/UFAL)

Documento assinado digitalmente
 **PAULO FERNANDO DA SILVA SANTOS JÚNIOR**
Data: 29/04/2025 21:20:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Paulo Fernando da Silva Santos Júnior
(UFCG)

Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima
(PPGQB/IQB/UFAL)

Documento assinado digitalmente
 **DIMAS JOSE DA PAZ LIMA**
Data: 30/04/2025 12:54:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro
(PPGCS/ICBS/UFAL)

Documento assinado digitalmente
 **OLAGIDE WAGNER DE CASTRO**
Data: 06/05/2025 19:48:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

RESUMO

O crescente aumento da resistência a antibióticos demanda urgentemente a descoberta de novos fármacos capazes de combater microrganismos patogênicos ou modular mecanismos de resistência. Paralelamente, doenças negligenciadas, como a tripanossomíase africana, representam um desafio crítico para países em desenvolvimento. Ambas as condições compartilham um alvo terapêutico em comum: serino e cisteíno proteases, consideradas alvos para o desenvolvimento de novos protótipos farmacêuticos. Entre as classes químicas com potencial inibidor dessas enzimas, os Aceptores de Michael têm recebido destaque. Neste contexto, este estudo desenvolveu uma série de compostos a partir de uma triagem virtual, contendo estruturas de carbonilas α,β -insaturadas com centros eletrofílicos ("warheads") para atuar contra cisteíno e serino proteases de interesse clínico. Foram identificados aproximadamente 50 potenciais *hits*, derivados de acrilamidas, α -substituídas por ciano, flúor e tiol. A síntese dos compostos selecionados envolveu reações de Knoevenagel, Horner–Wadsworth–Emmons e acoplamento de amida, resultando em 34 ácidos acrílicos intermediários, 14 ésteres acrilamida e 13 acrilamidas com rendimentos variando entre 20-98%. Os compostos foram avaliados em ensaios enzimáticos contra as cisteíno proteases catepsinas B, L e rodesaína, além das serino proteases β -lactamase e tripsina, demonstrando seletividade para serino proteases. Adicionalmente, foram realizados testes de sinergia contra bactérias multirresistentes produtoras de β -lactamases das classes A, B e C. A combinação dos compostos sintetizados com polimixina B exibiu atividade sinérgica promissora para os compostos 6e, 2c e 11b, resultando na redução do crescimento bacteriano de cepas de *Klebsiella pneumoniae* KPC P15-ST11 e ainda com outras combinações e cepas. O núcleo heterocíclico 5-bromoindol emergiu como unidade de reconhecimento, uma vez que os compostos ativos apresentam esse substituinte. Adicionalmente, o ensaio *in silico* de dinâmica molecular revelou interações de hidrogênio mediadas por água no sítio catalítico, além de interações de hidrogênio diretas com o NH do 5-bromoindol e a Ser70. Espera-se que os compostos aqui descobertos sejam aplicados no desenho de futuros fármacos contra o mecanismo de resistência bacteriana mediada por β -lactamase.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana; tripanossomíase africana, proteases, Aceptores de Michael.

ABSTRACT

The increasing rise in antibiotic resistance urgently demands the discovery of new drugs capable of combating pathogenic microorganisms or modulating resistance mechanisms. In parallel, neglected diseases, such as African trypanosomiasis, represent a critical challenge for developing countries. Both conditions share a common therapeutic target: serine and cysteine proteases, considered targets for the development of new pharmaceutical prototypes. Among the chemical classes with potential inhibitory effects on these enzymes, Michael acceptors have been highlighted. In this context, this study developed a series of compounds from virtual screening, containing α,β -unsaturated carbonyl structures with electrophilic centers ("warheads") to act against cysteine and serine proteases of clinical interest. Approximately 50 potential hits were identified, derived from acrylamides, α -substituted by cyan, fluorine and thiol. The synthesis of the selected compounds involved Knoevenagel, Horner–Wadsworth–Emmons and amide coupling reactions, resulting in 34 acrylic acid intermediates, 14 acrylamide esters and 13 acrylamides with yields ranging from 20-98%. The compounds were evaluated in enzymatic assays against the cysteine proteases cathepsins B, L and rhodesain, in addition to the serine proteases β -lactamase and trypsin, demonstrating selectivity for serine proteases. Additionally, synergy tests were performed against multidrug-resistant bacteria producing β -lactamases of classes A, B and C. The combination of the synthesized compounds with polymyxin B exhibited promising synergistic activity for compounds 6e, 2c and 11b, resulting in the reduction of bacterial growth of *Klebsiella pneumoniae* KPC P15-ST11 strains and also with other combinations and strains. The heterocyclic nucleus 5-bromoindole emerged as the recognition unit, since the active compounds present this substituent. Additionally, the *in silico* molecular dynamics assay revealed water-mediated hydrogen interactions at the catalytic site, in addition to direct hydrogen interactions with the NH of 5-bromoindole and Ser70. The compounds discovered here are expected to be applied in the design of future drugs against the β -lactamase-mediated bacterial resistance mechanism.

Keywords: Antimicrobial resistance; African trypanosomiasis, proteases, Michael acceptors.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida. Agradeço a meus pais, Nadjane e Adjér, os quais tenho como guias e referência para todos os meus passos, além de estarem ao meu lado em todos os desafios. Infelizmente, durante o período do meu doutorado meu pai faleceu, no entanto, seu amor e cuidado permaneceram me dando forças até hoje. Agradeço a minha irmã, Redja, por ser sempre minha fiel confidente e amiga em todos os momentos que eu preciso, além de vibrar em todas as minhas conquistas, e seu namorado Ricardo por todos os momentos divertidos de descontração em grupo.

Agradeço a meu esposo, Marcone, um excelente profissional que me ajudou em todos os ensaios *in silico*, desde o desenho dos ligantes até a preparação de figuras e me forneceu suporte quando eu precisei estudar e me dedicar a meus objetivos. Agradeço ainda a ele por todo amor, por ter me acompanhado durante meu estágio no exterior deixando todo o seu trabalho para trás, por me acalmar em momentos de estresse e por confiar em mim sempre que eu mesma duvidei. Agradeço ainda a meus sogros por serem companheiros e nos darem suporte sempre.

Agradeço a meus amigos de colegial, Maria Clara e Eli, pela amizade e parceria ao longo dos anos. Agradeço a meus amigos de faculdade, Íris, Pedro e Cláudio, por continuarmos amigos e torcendo sempre uns pelos outros. Agradeço também aos meus colegas e amigos do meu atual laboratório, Nathalia, Esaú, Maysa, Rita, João, Líbni e Arestides e aos amigos do meu laboratório anterior Érica, Paulo, Igor e Manu pelo compartilhamento de ideias e pela amizade dentro e fora do laboratório sempre. Agradeço ainda ao prof. Dr. Edeildo por ter sido meu coorientador, meu instrutor no meu primeiro contato com a síntese, por ter me auxiliado sempre com minhas dúvidas, por me trazer oportunidades de publicação ao longo da minha trajetória acadêmica, além dos ensinamentos e amizade.

Um agradecimento constante e muito especial ao meu orientador, o prof. Dr. Thiago Aquino, que sempre me confiou grandes projetos e sempre acreditou na execução desses por mim. Que me motivou a realizar o meu sonho de estágio internacional, e que me guia mesmo quando brigo com ele.

Agradeço a professora Dra. Tanja Schirmeister, responsável pelo laboratório AK. Schirmeister por aceitar a orientação do meu estágio internacional na Alemanha durante meu doutorado sanduíche. Agradeço ainda aos então doutorandos Thales, Laura e Colin, ambos do mesmo laboratório estrangeiro, que me ajudaram diretamente no meu período de estágio, me permitindo a execução de boa parte desse trabalho. Agradeço ainda à professora Dra. Simone Simionato da Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, e sua aluna Nathalia da Silva Damaceno pela execução dos ensaios de inibição do crescimento em cepas bacterianas.

Agradeço aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) pelos recursos destinados a esse projeto e a minha formação. Agradeço a banca julgadora, prof. Dr. Dimas Paz, Dr. Júlio Cosme, Dr. Olagide Castro e Dr. Paulo Fernando pelas contribuições na minha formação. Agradeço ainda a todos os professores e técnicos do PPGQB que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Essa tese é dedicada a toda minha família, mas especialmente a meu pai, Adjér de Oliveira Chagas, o qual faleceu em virtude de um câncer durante o meu doutorado.

Pai, sua dedicação por nós e por nossa educação nunca será esquecida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fatores envolvidos na propagação da resistência aos antibióticos.	21
Figura 2. Visão geral dos mecanismos moleculares de resistência aos antibióticos.	23
Figura 3. Estrutura geral de β -lactamases representativas de cada classe. Estruturas cristalinas de β -lactamases de classes A, B, C e D. Resíduos catalíticos importantes de serina- β -lactamases (serina 64/70 e lisina 67/73, destacadas) são coloridos de azul e os íons de zinco de metalo- β -lactamase (Zn 1 e 2) são demonstrados como esferas verde.	27
Figura 4. Estrutura de substratos da β -lactamase KPC; Penicilina G, Imipenem (carbapenem) e Cefoxitina (cefamicina).	28
Figura 5. Estrutura da β -lactamase KPC-2. Os principais resíduos relacionados à catálise e ligação do substrato são destacados em ciano; ao lado, visão ampliada do sítio ativo com os resíduos identificados.	29
Figura 6. Proposta de acilação do anel β -lactâmico para SBLs de classe A. A) Mecanismo que suporta a teoria envolvendo a atuação de Lys73 como base. B) Mecanismo que emprega Glu166 como ativador da água nucleofílica.	30
Figura 7. Estruturas dos antibióticos β -lactâmicos, semelhanças e diferenças para carbapenêmicos. É mostrada ainda a capacidade de tautomerização de carbapenêmicos após a acilação contra a maioria das SBLs.	30
Figura 8. Arquitetura de sítio ativo de MBLs e seus complexos carbapenêmicos. Vistas aproximadas dos locais ativos da MBL nativa (à esquerda) e dos produtos carbapenêmicos hidrolisados (marcados em roxo e laranja) ligados aos locais ativos (à direita). (a) e (b) B1 NDM-1 (PDBs 5zgx e 5ypk; esquerda e direita, respectivamente); (c) e (d) B3 SMB-1 (3vpe e 5b1u); (e) e (f) B2 CphA (1x8g e 1x8i).	32
Figura 9. Propostas de mecanismo geral para MBLs para penicilina genérica. (A) Proposta utilizando água como catalisador e ácido de Lewis; (B) O resíduo de Asp120 atua desprotonando a água e depois na segunda etapa de protonação do nitrogênio e abertura do anel; e (C) O ataque do nitrogênio a uma segunda molécula de água ativa promove a abertura do anel β -lactâmico.	34
Figura 10. Mecanismo proposto para bi-Zn(II)-MBLs.	36
Figura 11. Atuação de IBLs contra enzimas β -lactamases.	39
Figura 12. Estrutura dos IBLs mais utilizados na prática clínica (primeira geração) em comparação ao antibiótico Penicilina G.	39
Figura 13. Estrutura de IBLs monobactâmicos.	42
Figura 14. Proposta de mecanismo para inativação de BRL 42715 por SBLs, mostrando a formação do anel de sete membros tiazepina.	43
Figura 15. Potentes IBLs contendo o átomo de boro.	44
Figura 16. Estrutura de diazabicyclo octanonas (DBOs) representativas.	46
Figura 17. Estrutura cristalina do complexo enzimático NDM-1/Taniborbactam (PDB 6RMF, 1,51 Å). Os dois tipos de adutos enzimáticos observados na estrutura cristalina, especificamente os adutos bicíclicos (esquerda) e tricíclicos (direita), são mostrados em imagens separadas. A estrutura cristalina do grupo etilamino no ligante foi removido porque nenhuma densidade eletrônica para esses átomos foi observada. Resíduos relevantes da cadeia lateral são mostrados e rotulados.	48
Figura 18. Estrutura cristalina de VIM-2 em complexo com ANT431; PDB: 6HF5.	49
Figura 19. Estrutura de derivados de ácido carboxílico inibidores de MBL.	50
Figura 20. Compostos contendo o grupo tiol caracterizados como inibidores de MBLs.	51
Figura 21. Outros derivados contendo o grupo tiol caracterizados como inibidores de MBLs.	52
Figura 22. Estrutura hidrolisada do composto ML 302 e suas interações PDB: 4PVO.	53

Figura 23. Estruturas tridimensionais das Catepsinas B e L. Destaque para os subsítios, os resíduos do sítio catalítico e os resíduos importantes para a interação com substratos. PDB ID: 8B4T e 8B4V.....	56
Figura 24. Estruturas de inibidores de CatB e L relatados.	57
Figura 25. Estrutura tridimensional da catepsina rodasaína de <i>T. brucei</i> . Destaque para os subsítios e resíduos pertencentes ao sítio catalítico.	59
Figura 26. Estrutura de inibidores de rodasaína citados (21-24) e provável mecanismo catalítico do composto K11777 demonstrando as interações potenciais com os subsítios. PDB ID: 2P7U.....	60
Figura 27. Fluxograma das etapas in silico de triagem virtual.	66
Figura 28. Distribuição relativa das espécies de um composto modelo em função do pH. Gráfico gerado a partir de dados do software MarvinSketch.....	67
Figura 29. Estrutura geral e código de todos os ácidos acrílicos sintetizados (intermediários).	84
Figura 30. Estrutura geral e código de todas as acrilamidas sintetizadas (compostos aprovados na triagem).	85
Figura 31. Alterações estruturais propostas no planejamento de novos derivados ácidos acrílicos e acrilamidas como potenciais IBLs.	141
Figura 32. Comparação entre os complexos gerados para AMFG81 (A), AMFY81 (B) e AMFW81 (C) na enzima KPC-2 após o ensaio de docking molecular.	147
Figura 33. Mapas de potencial eletrostático* dos compostos AMCF81 (A), AMFF81 (B) e AMSF81 (C) demonstrando a densidade sobre o substituinte ciano. Em (D) a distância do substituinte ciano dos resíduos Ser70 e Lys73.	147
Figura 34. Complexo formado entre NDM-1 e o composto AMFA81. As distâncias demonstram as interações entre a molécula e os átomos de zinco.....	148
Figura 35. Docking do composto ROCE19 na enzima rodasaína. Os bolsos ocupados pelos diferentes substituintes da enzima e as interações são representados. O resíduo Cys25 foi destacado em amarelo.	150
Figura 36. Mecanismo de condensação de aldeídos aromáticos a cianoacetato de etila.	151
Figura 37. Representação do espectro de RMN do ciano-éster 8a.	152
Figura 38. Mecanismo de hidrólise básica dos ésteres de ciano.	153
Figura 39. Comparação entre o composto hidrolisado e seu éster correspondente. Espectro ampliado de 1,0-4,5 ppm.....	153
Figura 40. Mecanismo para olefinação por reações de HWE.	154
Figura 41. Espectro de RMN ^1H do composto 6c, destacando as constantes de acoplamento dos sinais identificados.	155
Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C do composto 6c, destacando as constantes de acoplamento dos sinais identificados.	156
Figura 43. Mecanismo de acoplamento de amida utilizando TBTU e HOBt.	157
Figura 44. Espectro de RMN ^1H do composto 8d, destacando os principais sinais para comprovação estrutural.	158
Figura 45. Comparação entre os espectros de RMN ^1H do éster 8d e seu correspondente ácido 9e.	159
Figura 46. Proposta de mecanismo para os derivados de rodanina.	160
Figura 47. Comparação dos espectros de RMN ^1H de 1g e 2g. Os espectros foram ampliados de 7,4 a 7,89 ppm.....	160
Figura 48. Proposta de mecanismo para hidrólise do anel rodanina e formação do ácido α -substituído por tiol.	161
Figura 49. Comparação dos espectros de RMN ^1H de 7g e 12g. Os espectros foram ampliados de 7,6 a 8,3 ppm.....	162

Figura 50. Estratégias de síntese das acrilamidas contendo o grupo tiol. Em vermelho, as etapas que não foram confirmadas durante a síntese.	163
Figura 51. Estruturas e porcentagem de inibição dos compostos 24d e 25d testados contra diferentes cisteíno proteases.	164
Figura 52. A: Estrutura do composto ativo contra rodesaína reportado na literatura, 23. B: Ligação de hidrogênio entre a histidina e a glutamina de uma protease de cisteína e os oxigênios da vinil sulfona.	165
Figura 53. Estrutura dos compostos de destaque para a inibição de cisteíno proteases. Destacado em vermelho o núcleo que se repete para todos os compostos.....	167
Figura 54. Ensaio de concentração-dependência e IC ₅₀ dos compostos ativos contra β -lactamase.	170
Figura 55. Ensaio de concentração-dependência e IC ₅₀ dos compostos ativos contra tripsina.	171
Figura 56. Esquema geral do ensaio de sinergismo realizado.....	174
Figura 57. Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano após a adição das combinações de acrilamidas (1e-13e e 2f) com o antibiótico Polimixina B (PMB). Cepa <i>K. pneumoniae</i> P15-ST11 (KPC) após 24h. Controle positivo: bactéria sem tratamento; Controle negativo: meio de cultura sem bactéria (controle de esterilidade).	175
Figura 58. Atividade sinérgica entre os ácidos acrílicos e (A) Polimixina B (PMB) (B) Meropenem (MEM) e (C) Ampicilina (AMP); Porcentagem de inibição do crescimento de <i>K. pneumoniae</i> 86.009 (NDM) após 24 h. Destaque para o composto 2c, ácido acrílico intermediário da acrilamida ativa.	176
Figura 59. Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano pela combinação dos antibióticos meropenem (MEM) e Polimixina (PMB) com o composto 11b. Em A, o composto 11b (64 μ g/mL) foi testado em diferentes concentrações do antibiótico MEM na cepa <i>A. baumannii</i> (103). Em B, foi fixada a concentração de Polimixina B (8 μ g/mL) variando-se a concentração do composto 11b (8-2 μ g/mL). Controle positivo: bactéria sem tratamento; Controle negativo: meio de cultura sem bactéria (controle de esterilidade). Inibição após 24 horas.	177
Figura 60. Porcentagem de inibição do crescimento de <i>K. pneumoniae</i> P15-ST11 (KPC) pela combinação de derivados de rodaninas e PMB após 24h.	180
Figura 61. Interações de 6e com o sítio catalítico. A: Em azul, as pontes de água e em rosa, o empilhamento π - π detectados na simulação. B: Superfície da enzima demonstrando a interação do composto no sítio ativo e C: Posição de 6e com relação ao resíduo de Ser70.	181
Figura 62. A: Principais contatos com os resíduos da enzima ao longo do tempo de simulação. B: RMSD da proteína e do ligante e C: RMSF da simulação.	182
Figura 63. Principais interações para os compostos 5e e 7e. Destaca-se as interações de hidrogênio, especialmente a mediada entre o NH do heterociclo e o resíduo de Ser70. .	183

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre os sistemas de classificação de Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros.	26
Tabela 2. Exemplos de metalo- β -lactamases por subclasse e espécies em que já foram identificadas.	37
Tabela 3. Estado atual do desenvolvimento clínico de IBLs.	40
Tabela 4. Compostos classificados como diazabicyclo octanonas, parceiros β -lactâmicos e atual estágio de desenvolvimento.	46
Tabela 5. Resumo das configurações para os ensaios de triagem virtual.	70
Tabela 6. Mapa de calor contendo as estruturas cristalinas de SBLs e seus resultados de RMSD.	142
Tabela 7. Mapa de calor contendo as estruturas cristalinas de MBLs e seus resultados de RMSD.	143
Tabela 8. Valores de RMSD calculados para a cisteína protease rodesaína nos diferentes algoritmos.	144
Tabela 9. Compostos aprovados no grupo de acrilamidas. Pontuação dos complexos formados com KPC-2 e NDM-1; distância calculada entre o resíduo de Ser70/átomos de zinco e o carbono β da estrutura do ligante. Os compostos estão ordenados de acordo com a coluna distância da enzima KPC-2.	145
Tabela 10. Compostos aprovados no grupo de ésteres acrilamidas. Pontuação dos complexos formados com rodesaína; distância calculada entre o resíduo de Cys25 e o carbono β da estrutura do ligante. Os compostos estão ordenados de acordo com a coluna distância.	149
Tabela 11. Porcentagem de inibição na triagem inicial contra cisteína proteases rodesaína e catepsinas B e L dos compostos 1e-13e e do composto comparativo 2f.	166
Tabela 12. Porcentagem de inibição na triagem inicial contra β -lactamase 1e-13e e do composto comparativo 2f.	168
Tabela 13. Porcentagem de inibição na triagem contra tripsina, compostos 1e-13e e composto comparativo 2f.	172
Tabela 14. CIM dos antibióticos testados em três cepas bacterianas MDR...	173
Tabela 15. Resumo das principais atividades observadas nas cepas MDR testadas.....	178

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RAM	Resistência Antimicrobiana
PBP	Penicillin-Binding Protein (Proteína de ligação à penicilina)
IBL	Inibidor de β -lactamase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (enzima de classe A)
NDM	New Delhi metallo- β -lactamase (enzima de classe B)
MBL	Metallo- β -lactamase
SBL	Serino- β -lactamase
PMB	Polimixina B
MEM	Meropenem
AMP	Ampicilina
CRO	Ceftriaxona
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> (Desvio Quadrático Médio)
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation</i> (Flutuação Quadrática Média)
MD	<i>Molecular Dynamics</i> (Dinâmica Molecular)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
MDR	<i>Multi-Drug Resistant</i> (Multirresistente)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
UV	Ultravioleta
MeOH	Metanol
ACN	Acetonitrila
DAD-UV	Detector de Arranjo de Diodos – Ultravioleta
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido

PDB	Protein Data Bank (base de dados de estruturas moleculares)
AM1	Austin Model 1 (método semiempírico para otimização molecular)
CatB / CatL	Catepsina B / Catepsina L
FICI	Índice de Concentração Inibitória Fracionária (<i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (meio de cultura)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (ionização por eletrospray)
TBTU/HOBt	Reagentes de acoplamento para síntese de amidas
PF	Ponto de Fusão
IC₅₀	Concentração Inibitória Média (para 50% de inibição)
KPC-2	Variante 2 da enzima carbapenemase de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
NDM-1	Variante 1 da metalo- β -lactamase de New Delhi
μM / mM	Micromolar / Milimolar (unidades de concentração)
CN / F / SH	Grupos funcionais: ciano, flúor, tiol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1 Resistência a Antimicrobianos.....	20
2.2 Mecanismos de resistência.....	21
2.3 Resistência mediada por β -lactamases	24
2.3.1 Classificação e aspectos gerais	24
2.3.2 Serino- β -lactamases (SBLs) de classe A.....	27
2.3.3 Metalo- β -lactamases (MBLs)	31
2.4 Inibidores de β -lactamases	38
2.4.1 Desenvolvimento de IBLs contra serino- β -lactamases	41
2.4.2 Desenvolvimento de IBLs contra metalo- β -lactamases	46
2.5 Potencial de aceptores de Michael contra cisteíno proteases	53
2.5.1 Catepsinas B e L.....	55
2.5.2 Inibidores de Catepsinas B e L	56
2.5.3 Rodesaína de <i>T. brucei</i> e <i>T. gambiense</i>	58
2.5.4 Inibidores de rodesaína.....	59
2.6 Fundamentação da hipótese	61
3. OBJETIVOS	64
3.1 Objetivo Geral.....	64
3.2 Objetivos Específicos.....	64
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
4.1 Equipamentos, softwares e metodologia utilizados na triagem virtual....	66
4.1.1. Especificações técnicas das estações de trabalho utilizadas nos testes <i>in silico</i> de triagem virtual e dinâmica molecular.....	66
4.1.2 Preparação dos ligantes.....	67
4.1.3 Preparo e escolha da estrutura das enzimas alvo.....	68
4.1.4. Ensaios de docking molecular	70
4.1.5. Inspeção visual e aplicação de filtros	70
4.1.6. Ensaios de dinâmica molecular.....	71
4.2 Caracterização estrutural e determinação de propriedades físico-químicas	72
4.2.1 Ensaios de ponto de fusão	72

4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia em coluna <i>flash</i>	72
4.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹³ C e ¹ H)	73
4.2.4 Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE).....	73
4.2.5 Espectrometria de Massas (LC-MS)	74
4.3 Reagentes, solventes e equipamentos utilizados na síntese.....	75
4.4 Ensaios de inibição enzimática.....	76
4.4.1 Ensaios de triagem com cisteíno proteases Cathepsina B, L e rodesaína	76
4.4.2 Ensaios frente serino β -lactamase	77
4.4.3 Ensaios com serino protease tripsina.....	79
4.5 Ensaios de atividade antibacteriana e sinergismo com antibióticos β -lactâmicos (cefalosporinas, carbapenêmicos e penicilinas) e polipeptídicos (polimixina B) frente a cepas gram-negativas produtoras de β -lactamases .	80
4.5.1 Soluções estoque das amostras teste e antibióticos.....	80
4.5.2 Cepas bacterianas analisadas	81
4.5.3 Procedimento de avaliação da atividade antimicrobiana.....	81
4.5.4 Ensaio de sinergismo pelo método <i>checkerboard</i>	81
4.6 Planejamento para a síntese	82
4.7 Procedimento experimental para síntese dos compostos planejados	83
4.7.1 Síntese dos ésteres acrílicos α -substituídos por CN (1a-17a)	85
4.7.2 Síntese dos ácidos acrílicos α -substituídos por CN (1b-17b).....	93
4.7.3 Síntese dos ácidos acrílicos α -substituídos por flúor (1c-11c)	101
4.7.4 Reações de acoplamento de amida através de agentes de acoplamento (1d-25d)	107
4.7.5 Síntese das acrilamidas α -substituídas através de hidrólise alcalina (1e-13e).....	122
4.7.6 Síntese do derivado não substituído por CN ou F (1f e 2f)	130
4.7.7 Síntese de derivados de rodanina (1g-10g)	131
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	140
5.1 Planejamento baseado na estrutura de carbonilas α,β -insaturadas	140
5.2 Triagem virtual	141
5.2.1 Preparação de ligantes e enzimas	141
5.2.2 Critérios de seleção dos aprovados na triagem virtual.....	144
5.3 Síntese e caracterização dos compostos planejados	150

5.3.1 Síntese e caracterização dos ácidos acrílicos α -substituídos por CN	150
5.3.2 Síntese e caracterização dos ácidos acrílicos α -substituídos por flúor	154
5.3.3 Síntese e caracterização de acrilamidas α -substituídas por ciano e flúor	156
5.3.4 Síntese e caracterização dos ácidos acrílicos α -substituídos por tiol, rodaninas intermediárias e acrilamidas	159
5.4 Ensaios enzimáticos contra proteases de interesse clínico	164
5.4.1 Ensaios enzimáticos com ésteres acrilamida (Grupo B: 13d-25d) .	164
5.4.2 Ensaios enzimáticos com acrilamidas (Grupo A: 1e-13e)	165
5.4.2.1 Ensaios enzimáticos contra cisteíno proteases.....	165
5.4.2.2 Ensaios enzimáticos contra serino proteases	168
5.5 Ensaios de atividade antibacteriana e sinergismo frente a cepas gram-negativas produtoras de β -lactamases	173
5.6 Ensaios <i>in silico</i> de dinâmica molecular.....	180
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	184
7. REFERÊNCIAS.....	186

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da penicilina em 1928, o tratamento de infecções bacterianas avançou significativamente. Diversas classes de antimicrobianos foram desenvolvidas, abrangendo distintos espectros de atividade e mecanismos de ação. No entanto, com o surgimento dos primeiros casos de resistência antimicrobiana (RAM), a eficácia clínica dos antibióticos passou a ser progressivamente comprometida (WHO, 2014).

Com o agravamento da RAM, diversos mecanismos de resistência foram identificados, sendo um dos mais relevantes a produção de β -lactamases, enzimas responsáveis pela hidrólise do anel β -lactâmico dos antibióticos (MUNITA; ARIAS, 2016). Em resposta à crescente importância clínica dessas enzimas, estratégias terapêuticas passaram a incluir o uso de inibidores de β -lactamases (IBLs), na preservação da atividade dos antibióticos β -lactâmicos (DEJA, 2021). No entanto, os IBLs atualmente disponíveis apresentam espectro limitado, sendo ineficazes contra enzimas de alta relevância clínica (TOOKE et al., 2019). O desafio é ainda maior no caso das metalo- β -lactamases (MBLs), para as quais nenhum inibidor clínico eficaz está disponível até o momento.

Paralelamente ao problema da resistência bacteriana, as doenças tropicais negligenciadas continuam a representar um grave problema de saúde pública em regiões endêmicas. Entre essas, destaca-se a tripanossomíase africana, ou doença do sono, causada pelo protozoário *Trypanosoma brucei*. Um dos principais alvos terapêuticos desse parasita é a rodesaína, uma cisteína protease essencial para sua sobrevivência e progressão da doença.

Nesse contexto, a química medicinal, aliada a técnicas de modelagem molecular, oferece ferramentas promissoras para o planejamento racional de inibidores enzimáticos. O presente trabalho propõe o uso de estratégias computacionais e sintéticas para o desenvolvimento de uma biblioteca de compostos contendo aceptores de Michael, com o objetivo de identificar novos protótipos com atividade como inibidores de β -lactamases e rodesaína. Os compostos planejados foram sintetizados e avaliados em ensaios enzimáticos ou de sinergismo, visando sua aplicação no tratamento da tripanossomíase africana ou como adjuvantes na terapia antimicrobiana.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Resistência a Antimicrobianos

A resistência antimicrobiana (RAM) é considerada um dos principais desafios de saúde pública do século XXI, ameaçando a prevenção e o tratamento de infecções por uma ampla gama de patógenos. A RAM ocorre quando microrganismos — como bactérias, fungos, vírus e parasitas — sofrem alterações que reduzem a eficácia dos medicamentos, limitando as opções terapêuticas disponíveis (WHO, 2023a). Embora o termo se refira a diferentes classes de agentes infecciosos, é comumente confundido com a resistência a antibióticos, que se aplica especificamente a bactérias (WHO, 2023b).

Uma revisão encomendada pelo governo britânico estimou que até 2050, cerca de 10 milhões de mortes anuais poderão ocorrer em decorrência de infecções por microrganismos resistentes (O'NEILL, 2016). Apesar das críticas a essa projeção (DE KRAKER; STEWARDSON; HARBARTH, 2016), há consenso quanto à urgência de um plano global coordenado para enfrentar o problema. A Estratégia Global da OMS para Contenção da RAM, lançada em 2001, já apontava intervenções fundamentais, como ampliar o acesso a antimicrobianos adequados, fortalecer os sistemas de saúde e vigilância e estimular o desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas (WHO, 2001).

Mais recentemente, um estudo global estimou que, em 2019, aproximadamente 4,95 milhões de mortes estavam associadas à RAM, sendo 1,27 milhão atribuídas diretamente à resistência bacteriana. As maiores taxas de mortalidade foram registradas em regiões como a África Subsaariana e o Sul da Ásia. No Brasil, o índice foi de cerca de 63 mortes por 100 mil habitantes (MURRAY et al., 2022).

Países em desenvolvimento são particularmente afetados, como evidenciado por LIM et al. (2016), devido ao uso crescente de antibióticos associado ao aumento da renda, à disponibilidade irrestrita de medicamentos e à falta de controle regulatório. O uso irracional — incluindo prescrição inadequada, dosagem incorreta e má adesão ao tratamento — continua sendo um dos principais fatores para o avanço da RAM. Em países desenvolvidos, a incerteza

diagnóstica contribui para prescrições excessivas, enquanto em nações com menos recursos, o acesso facilitado a antimicrobianos promove a automedicação para sintomas leves, como resfriados (PRESTINACI; PEZZOTTI; PANTOSTI, 2015). Além disso, ambientes hospitalares favorecem a emergência de resistência devido ao uso intensivo de antimicrobianos em pacientes imunocomprometidos, idosos ou submetidos a procedimentos invasivos (VINCENT, 2003). A Figura 1 resume os principais fatores responsáveis pelo surgimento e disseminação da resistência aos antibióticos.

Figura 1. Fatores envolvidos na propagação da resistência aos antibióticos.



Fonte: Autora, 2025.

Outro fator relevante é o uso extensivo de antibióticos na agricultura e na pecuária para manter a saúde e produtividade dos animais. Van Boeckel et al. (2015) previram aumento significativo desse consumo nos países do BRICS, impulsionado pela intensificação da produção. Essa prática não apenas favorece o surgimento de cepas resistentes, como também pode deixar resíduos em produtos de origem animal, impactando a saúde pública e a segurança alimentar (BAYNES et al., 2016; BILLAH et al., 2015; MANYI-LOH et al., 2018).

2.2 Mecanismos de resistência

A resistência antimicrobiana é um fenômeno antigo, resultante da interação contínua entre microrganismos e o ambiente. Muitos antimicrobianos derivam de compostos naturalmente produzidos por organismos, e, ao compartilhar o mesmo nicho ecológico, certas bactérias desenvolvem mecanismos para sobreviver à ação dessas substâncias, originando a chamada

resistência intrínseca. No entanto, no contexto clínico, o principal problema está na resistência adquirida, caracterizada pela perda de sensibilidade de bactérias previamente suscetíveis a determinados antimicrobianos (MUNITA; ARIAS, 2016).

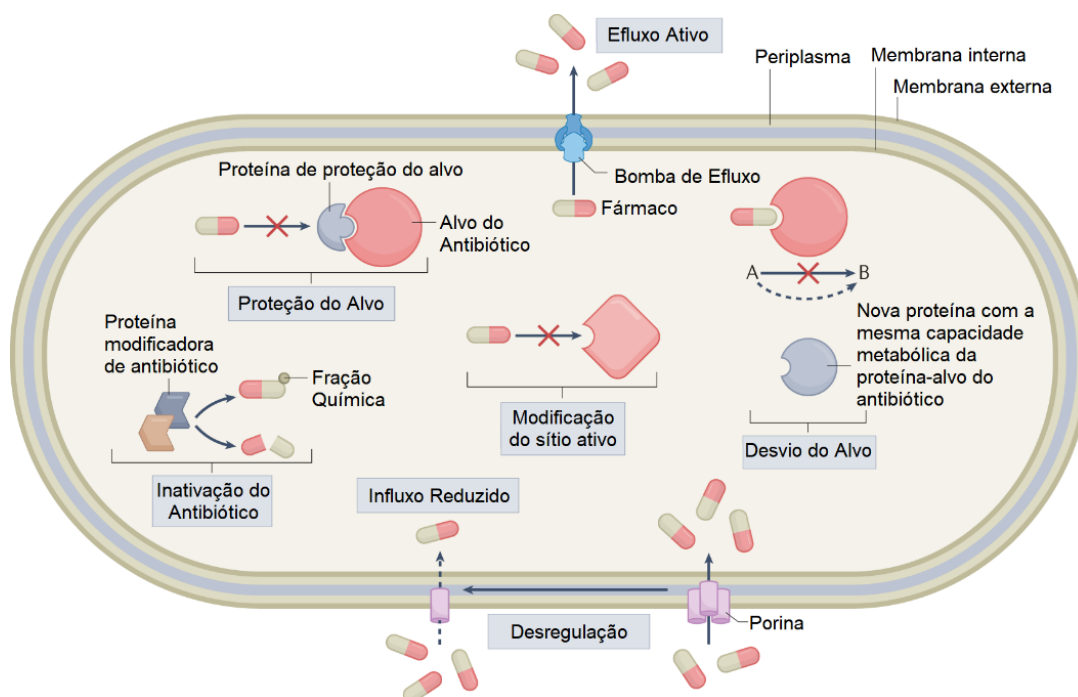
As bactérias possuem notável plasticidade genética, permitindo a adaptação ao estresse antibiótico por meio de duas estratégias principais: i) mutações genéticas, geralmente relacionadas ao alvo do fármaco, e ii) aquisição de genes de resistência via transferência horizontal (ROBERTS et al., 2021). No primeiro caso, mutações em genes específicos conferem resistência a uma subpopulação bacteriana, que prevalece após a eliminação das bactérias suscetíveis pelo antibiótico.

Os mecanismos de resistência podem ser agrupados de acordo com a rota bioquímica envolvida: (i) modificação ou inativação do antimicrobiano; (ii) prevenção da penetração celular ou extrusão do fármaco; (iii) alteração ou proteção do alvo molecular; e (iv) mecanismos adaptativos globais (DARBY et al., 2023; MUNITA; ARIAS, 2016). A Figura 2 (página 23) apresenta uma visão geral dos mecanismos de resistência.

A penetração do antibiótico é essencial para sua ação, especialmente quando o alvo se localiza no citoplasma ou espaço periplasmático. Bactérias podem reduzir essa penetração por alterações na estrutura do envelope celular, como perda de porinas ou modificações na composição de lipídios da membrana (MISHRA et al., 2012). Um exemplo é a produção aberrante de OprD em *P. aeruginosa*, associada à resistência a carbapenênicos (DOMÉNECH-SÁNCHEZ et al., 2003; QUINN et al., 1986).

Outro mecanismo é a ação de bombas de efluxo, que removem ativamente substâncias tóxicas, incluindo antibióticos, do interior celular. Presentes tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, são particularmente relevantes nestas últimas, pela sinergia com a barreira de membrana externa. Um exemplo clássico é a expulsão de tetraciclina por bombas da família Tet/MFS, utilizando o gradiente de prótons como fonte de energia (BEHESHTI et al., 2020; MONTEIRO; DE AQUINO; MENDONÇA JUNIOR, 2020).

Figura 2. Visão geral dos mecanismos moleculares de resistência aos antibióticos.



Fonte: Adaptado de Darby et al., 2023.

A modificação do sítio-alvo também contribui para a resistência, impedindo a ligação eficaz do fármaco. Isso ocorre, por exemplo, na resistência a fluoroquinolonas, em que mutações nas enzimas DNA girase e topoisomerase IV, alvos do fármaco, reduzem sua eficácia, como observado em *Staphylococcus aureus* (PANTOSTI; SANCHINI; MONACO, 2007).

Outra estratégia bacteriana é a inativação do antibiótico, por modificação química ou degradação enzimática. Enzimas específicas podem realizar reações como acetilação, fosforilação ou adenilação, reduzindo a afinidade do fármaco pelo alvo e aumentando sua concentração inibitória mínima (CIM) (MUNITA; ARIAS, 2016). É o caso dos aminoglicosídeos, frequentemente modificados por acetiltransferases, fosfotransferases ou nucleotidiltransferases (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

A integridade da estrutura química do antibiótico é, portanto, essencial para sua atividade. Algumas enzimas catalisam a quebra de ligações críticas, como as β -lactamases, que hidrolisam o anel β -lactâmico de penicilinas e cefalosporinas. Outros exemplos incluem esterases (resistência a macrolídeos) e epoxidases (resistência à fosfomicina) (WRIGHT, 2005). Devido à relevância

clínica das β -lactamases, este mecanismo será o foco principal deste trabalho e será aprofundado nas seções seguintes.

2.3 Resistência mediada por β -lactamases

2.3.1 Classificação e aspectos gerais

As bactérias podem desenvolver resistência aos antibióticos por diversos mecanismos. No caso dos β -lactâmicos, o uso extensivo desses fármacos favoreceu o surgimento de dois mecanismos principais: alterações nas proteínas de ligação à penicilina (PBPs) e a produção de enzimas β -lactamases (BLs), sendo este último o mais prevalente em contexto clínico (BUSH, 2018; PARTRIDGE et al., 2018). Apesar disso, a resistência costuma ser multifatorial, resultando da combinação de múltiplos mecanismos ou da ação simultânea de diferentes β -lactamases, o que torna essencial o estudo detalhado desses perfis.

A identificação de diversas variantes de β -lactamases, impulsionada pela disponibilidade de dados estruturais, genômicos e proteicos, evidenciou a diversidade dessas enzimas, que não constituem um grupo homogêneo. Essa variabilidade decorre, em parte, de mutações que alteram resíduos de aminoácidos, conferindo novas propriedades hidrolíticas. Atualmente, o banco de dados BLDB reúne mais de 7.900 β -lactamases catalogadas (www.bldb.eu) (NAAS et al., 2017).

Dois sistemas são amplamente utilizados para classificar essas enzimas: (i) a classificação molecular de Ambler, que agrupa as β -lactamases em quatro classes (A, B, C e D) com base na sequência de aminoácidos (AMBLER, 1980); e (ii) a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros, que considera o perfil de hidrólise de substratos e a resposta a inibidores (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). A Tabela 1 (página 26) apresenta um comparativo entre os dois sistemas.

A classificação de Ambler é particularmente útil para distinguir entre os mecanismos catalíticos. As enzimas das classes A, C e D utilizam um resíduo de serina no sítio ativo, enquanto as da classe B dependem de íons metálicos. A maioria das β -lactamases de classe A é inibida por ácido clavulânico e apresenta atividade contra penicilinas, cefalosporinas e, em alguns casos,

monobactâmicos, mas não cefamicinas. Entre os principais representantes dessa classe estão as penicilinasas TEM-1 e SHV-1, as ESBLs do tipo CTX-M e as carbapenemases KPC, amplamente distribuídas em Enterobacteriaceae (BAUERNFEIND; SCHWEIGHART; GRIMM, 1990; CHAVES et al., 2001; DATTA; KONTOMICHALOU, 1965; RAPP; URBAN, 2012).

As β -lactamases de classe B, conhecidas como metalo- β -lactamases (MBLs), utilizam íons metálicos — geralmente zinco — como cofatores no sítio catalítico, em substituição ao resíduo de serina presente nas classes A, C e D (BUSH, 1998). O zinco ativa uma molécula de água, que promove a hidrólise do anel β -lactâmico. Essas enzimas são inibidas por agentes quelantes, como o EDTA, mas não por inibidores clássicos como ácido clavulânico ou tazobactam. MBLs hidrolisam a maioria dos β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos, e têm sido identificadas em isolados clínicos de bactérias gram-negativas, incluindo Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* (MUNITA; ARIAS, 2016).

As enzimas de classe C, como a AmpC, conferem resistência à maioria das cefalosporinas, inclusive aquelas de amplo espectro (ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona), bem como às cefamicinas, como cefoxitina (BUSH; JACOBY, 2010). Também podem hidrolisar penicilinas e alguns monobactâmicos. A AmpC é clinicamente relevante e produzida por diversas espécies, como *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras (JACOBY, 2009).

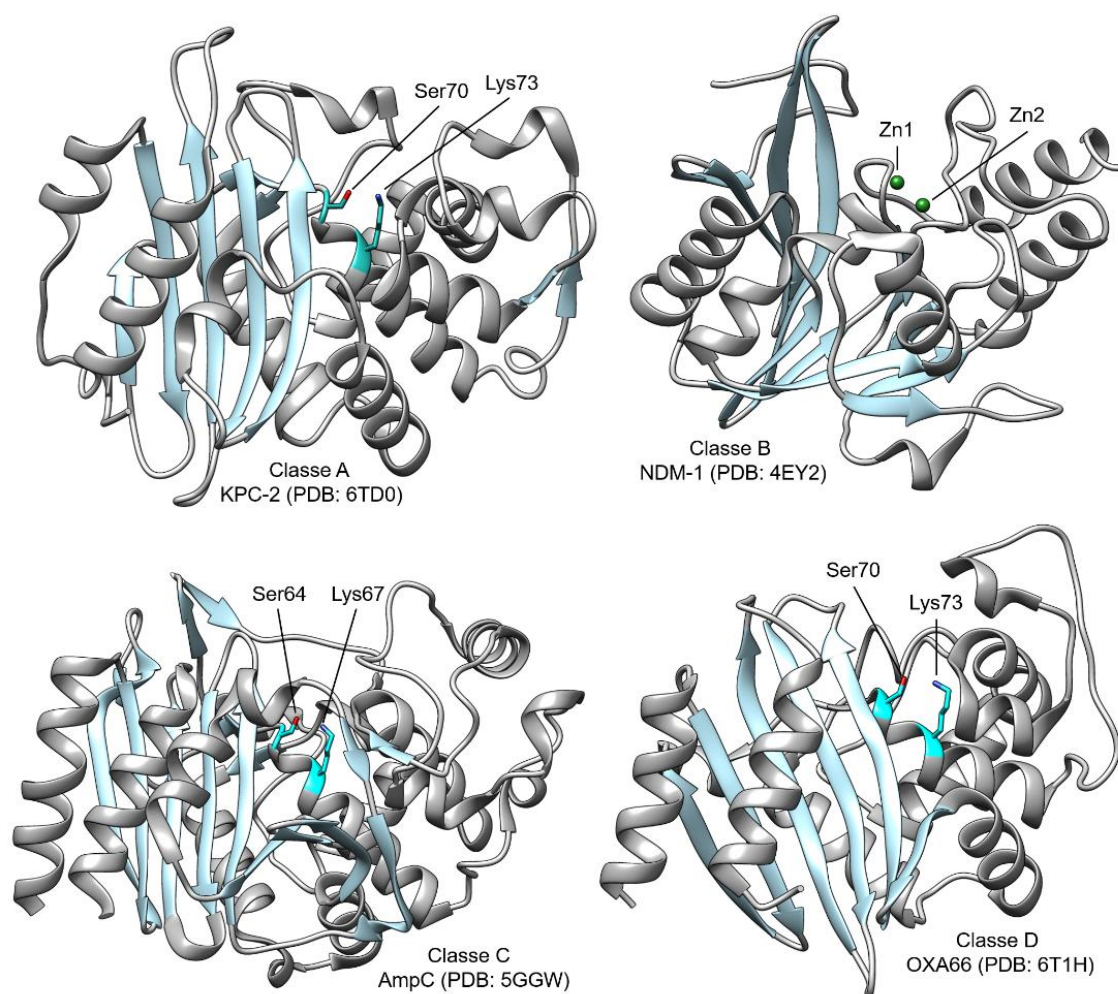
Tabela 1. Comparação entre os sistemas de classificação de Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros.

Classe de Ambler: sítio catalítico (espectro)	Grupo de Bush-Jacoby-Medeiros: sítio catalítico (espectro)	Substratos	Inibido por	Exemplos
A: Serina (variável)	2a: serina (penicilinas)	Penicilinas	Clavulonato, avibactam	Penicilinas de bactérias Gram-positivas
	2b: serina (penicilinas)	Penicilinas e cefalosporinas de espectro limitado	Clavulonato, avibactam e outros novos inibidores	TEM-1, TEM-2 e SHV-1
	2be: serina (ESBLs)	Penicilinas e cefalosporinas, incluindo de espectro estendido	Clavulonato, avibactam e outros novos inibidores	SHV-2, TEM-10, CTX-M e GES-1
	2br: serina (resistente a inibidores)	Penicilinas	Avibactam e outros novos inibidores	TEM-30 e SHV-72
	2c: serina (penicilinas)	Penicilinas e carbenicilinas	Clavulonato, avibactam	PSE (CARB)
	2f: serina (carbapenemases)	Penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos	Avibactam e outros novos inibidores	KPC, SME, NMC-A e GES-2
B: Metallo (carbapenemases)	3: metallo (carbapenemases)	A maioria dos β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, mas não monobactâmicos	Agentes quelantes (EDTA) e ANT431	IMP, VIM e NDM
C: Serina (cefalosporinas)	1: serina (cefalosporinas)	Penicilinas e cefalosporinas	Cloxacilina, avibactam e outros novos inibidores	AmpC cromossomal, CMY, ACT-1 e DHA
D: Serina (oxacilinas)	2d: serina (oxacilinas)	Penicilinas e cloxacilinas, alguns incluem cefalosporinas e/ou carbapenêmicos	Cloreto de sódio, alguns por clavulanato, avibactam e outros novos inibidores	OXA-1/30, OXA-10, OXA-23 e OXA-48

Fonte: Adaptado de Bush; Bradford, 2019.

As β -lactamases de classe D, conhecidas como oxacilinas, distinguem-se pela capacidade de hidrolisar a oxacilina e pela baixa sensibilidade ao ácido clavulânico (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010). Entre as variantes mais relevantes estão a OXA-11, de *P. aeruginosa*, que podem degradar cefalosporinas de terceira geração (ESBLs), e a OXA-23, de *Acinetobacter baumannii*, que apresenta atividade contra carbapenêmicos (HALL et al., 1993; MANSOUR et al., 2008). A Figura 3 (página 27) apresenta a estrutura representativa de cada classe de β -lactamase, destacando suas principais semelhanças e diferenças estruturais.

Figura 3. Estrutura geral de β -lactamases representativas de cada classe. Estruturas cristalinas de β -lactamases de classes A, B, C e D. Resíduos catalíticos importantes de serina- β -lactamases (serina 64/70 e lisina 67/73, destacadas) são coloridos de azul e os íons de zinco de metalo- β -lactamase (Zn 1 e 2) são demonstrados como esferas verde.



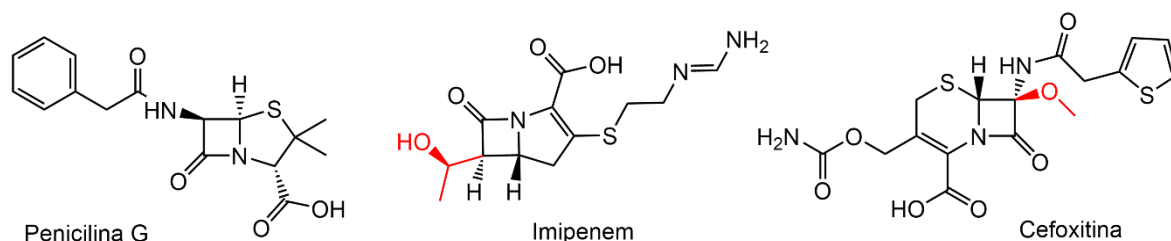
Fonte: Autora, 2025.

2.3.2 Serino- β -lactamases (SBLs) de classe A

As β -lactamases de classe A constituem o grupo mais numeroso e amplamente estudado entre as SBLs (TOOKE et al., 2019). A TEM-1, codificada por plasmídeos, é prevalente em bactérias gram-negativas e ativa contra aminopenicilinas e algumas cefalosporinas (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). Outras variantes importantes incluem PC1, associada à resistência à penicilina em *Staphylococcus aureus* (DATTA; KONTOMICHALOU, 1965); SHV, identificada inicialmente em *Klebsiella pneumoniae* (CHAVES et al., 2001) e CTX-M, uma cefotoximase com atividade contra cefalosporinas de terceira geração.

Entre as SBLs de classe A, destaca-se a KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), uma carbapenemase amplamente disseminada em Enterobacteriaceae, *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*. Ao contrário de outras enzimas da mesma classe, a KPC não é inibida por ácido clavulânico ou tazobactam e representa uma séria ameaça clínica, pois compromete a eficácia dos carbapenêmicos — fármacos de última linha, como imipenem, meropenem e ertapenem (KAZMIERCZAK et al., 2016a). As carbapenemases de serina, como a KPC, hidrolisam β -lactâmicos com substituintes na posição α do anel, adjacente à carbonila. Exemplos incluem o imipenem (grupo 6 α -hidroxietil) e a cefoxitina (grupo 7 α -OCH₃), Figura 4 (página 28) (SOUGAKOFF et al., 2002; SWARÉN et al., 1998).

Figura 4. Estrutura de substratos da β -lactamase KPC; Penicilina G, Imipenem (carbapenem) e Cefoxitina (cefamicina).

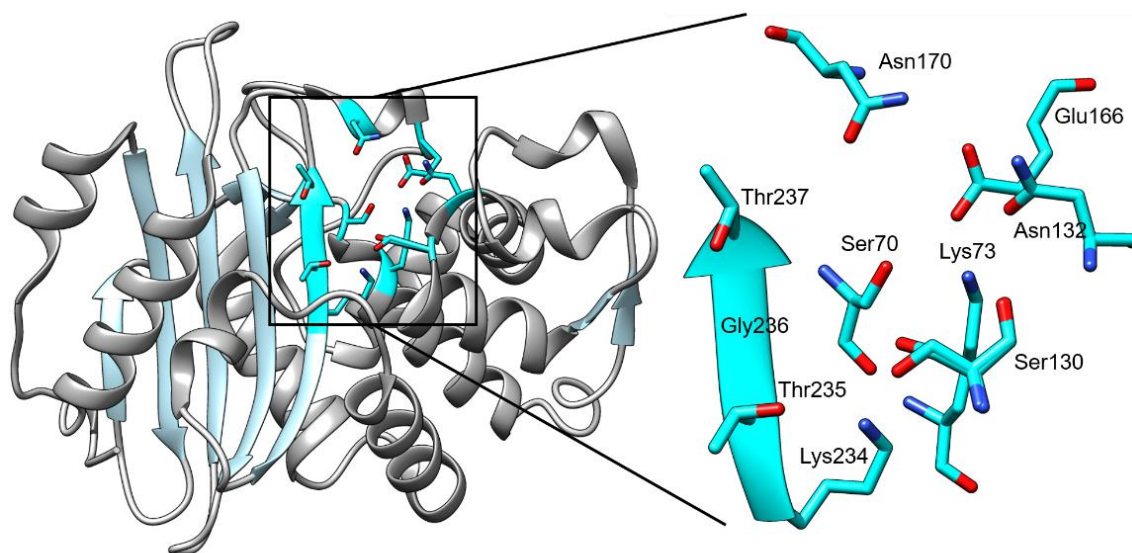


Fonte: Autora, 2025.

A estrutura da KPC apresenta dois subdomínios com arquitetura semelhante à de outras β -lactamases de classe A, como SHV, SME e TEM (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2007). Um dos domínios é majoritariamente α -helicoidal, enquanto o outro contém uma folha β central flanqueada por hélices α (Figura 5, página 29). O sítio ativo localiza-se entre os subdomínios e contém os resíduos catalíticos Ser70, Glu166 e Asn170, além da água responsável pela desacilação (GALDADAS et al., 2018; KE et al., 2007). Outros resíduos essenciais incluem

Ser130, Asn132, Lys234, Ser/Thr235, Gly236 e Ala/Ser/Thr237, conforme o esquema de numeração de Ambler.

Figura 5. Estrutura da β -lactamase KPC-2. Os principais resíduos relacionados à catálise e ligação do substrato são destacados em ciano; ao lado, visão ampliada do sítio ativo com os resíduos identificados.



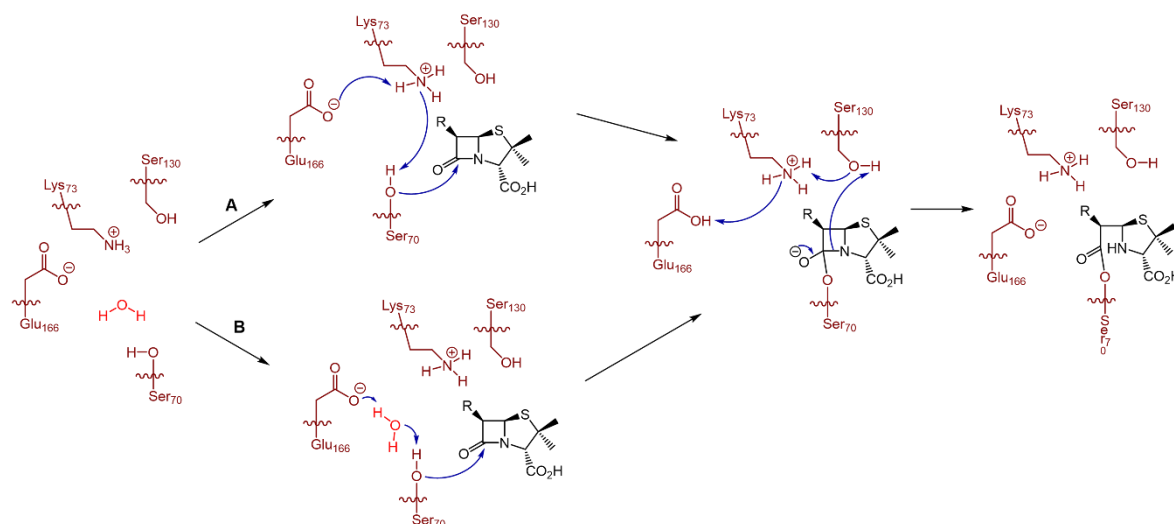
Fonte: Autora, 2025.

Apesar das variações entre as diferentes β -lactamases, todas as SBLs compartilham um mecanismo catalítico do tipo acilação–desacilação, típico das serino proteases. Na etapa de acilação, a serina ativada ataca nucleofílicamente a carbonila do anel β -lactâmico, formando um intermediário tetraédrico instável que, ao sofrer protonação, evolui para o complexo acilado com clivagem da ligação C–N. Em seguida, na etapa de desacilação, uma molécula de água ativada ataca esse intermediário, promovendo a hidrólise da ligação com a serina e a liberação da β -lactama inativa (DRAWZ; BONOMO, 2010; TOOKE et al., 2019).

Embora o mecanismo catalítico das SBLs seja bem estabelecido, ainda há controvérsias quanto à identidade dos resíduos envolvidos nas etapas de acilação e desacilação. Ambas requerem a ativação da serina nucleofílica e da molécula de água responsável pela hidrólise, mas os detalhes moleculares seguem em debate. Para a desacilação, é amplamente aceito que o resíduo Glu166 atue como base ativadora da água hidrolítica (HERZBERG; MOULT, 1987). No entanto, para a acilação, duas hipóteses competem: uma propõe Lys73 como base geral, baseada em mutações no Glu166 que não impedem essa etapa (GIBSON; CHRISTENSEN;

WALEY, 1990; GUILLAUME et al., 1997); outra sugere que o próprio Glu166, via molécula de água, desprotona a hidroxila da Ser70 antes do ataque ao anel β -lactâmico (HERMANN et al., 2005; MINASOV; WANG; SHOICHET, 2002). Essas propostas estão representadas na Figura 6 (página 30).

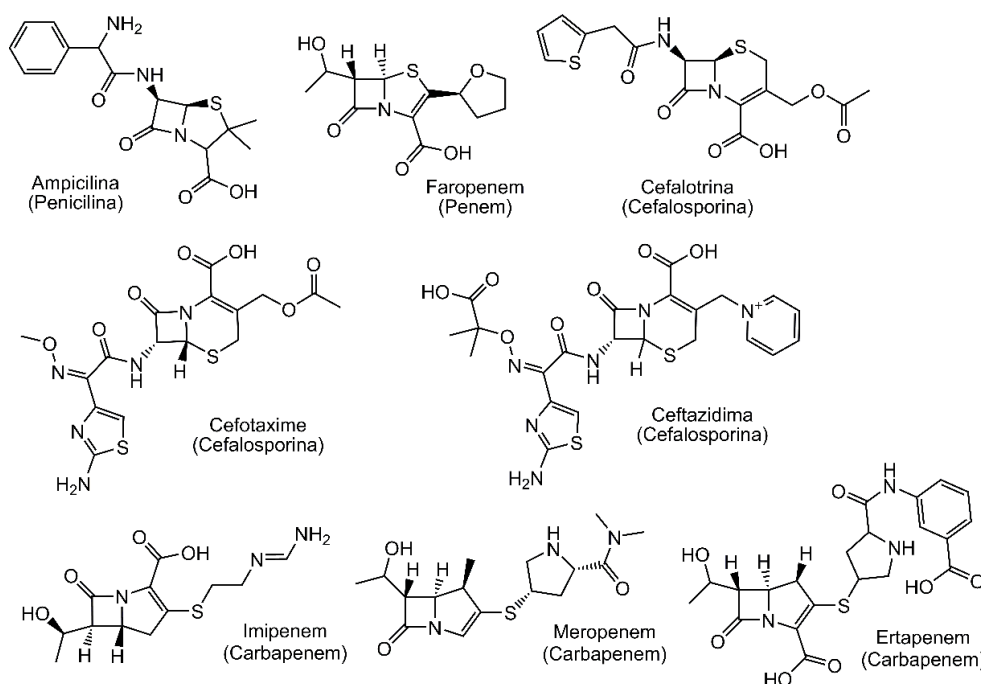
Figura 6. Proposta de acilação do anel β -lactâmico para SBLs de classe A. A) Mecanismo que suporta a teoria envolvendo a atuação de Lys73 como base. B) Mecanismo que emprega Glu166 como ativador da água nucleofílica.



Fonte: Adaptado de Drawz; Bonomo (2010) e Tooke et al. (2019).

Como mencionado, a maioria das penicilinas é facilmente inativada por β -lactamases. Mais preocupante, contudo, é a inativação dos carbapenêmicos por enzimas como a KPC. Normalmente, carbapenêmicos inibem PBPs e formam complexos acilados de longa duração com SBLs como TEM, SHV e CTX-M, o que os torna eficazes na inibição dessas enzimas (TOOKE et al., 2019). Estruturalmente, diferenciam-se das penicilinas e cefalosporinas por conterem um anel pirrolidina fundido ao anel β -lactâmico, em vez de anéis tiazolidina ou dihidrotiazina Figura 7, página 31. Além disso, o grupo 6 α -hidroxietil presente nos carbapenêmicos atua como barreira estérica à hidrólise, contribuindo para sua estabilidade frente à maioria das β -lactamases (PAPP-WALLACE et al., 2011).

Figura 7. Estruturas dos antibióticos β -lactâmicos, semelhanças e diferenças para carbapenêmicos.



Fonte: Adaptado de Tooke et al. (2023).

2.3.3 Metallo- β -lactamases (MBLs)

As metallo- β -lactamases, pertencentes à classe B de Ambler (BUSH, 1998), são enzimas que utilizam íons Zn^{2+} como cofatores catalíticos no sítio ativo (CROWDER; SPENCER; VILA, 2006). Apresentam amplo espectro de ação, hidrolisando penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, mas são ineficazes contra monobactâmicos — uma limitação compensada frequentemente pela co-expressão com SBLs (WALSH et al., 2005).

Inicialmente, a padronização de MBLs foi proposta com base em um esquema de numeração usado para padronizar β -lactamases de classe A; no entanto, logo foi observado que as enzimas da classe B são muito mais complexas, devido à sua natureza ímpar e a sua variabilidade no número de aminoácidos. Essas enzimas não são relacionadas a PBPs conhecidas, mas são membros de uma grande superfamília de metalo-hidrolases. Dentro do grupo, MBLs distinguem-se por um motivo His-X-His-X-Asp que forma um centro metálico localizado na interface das duas folhas β que compõem o núcleo da proteína (GARAU et al., 2004).

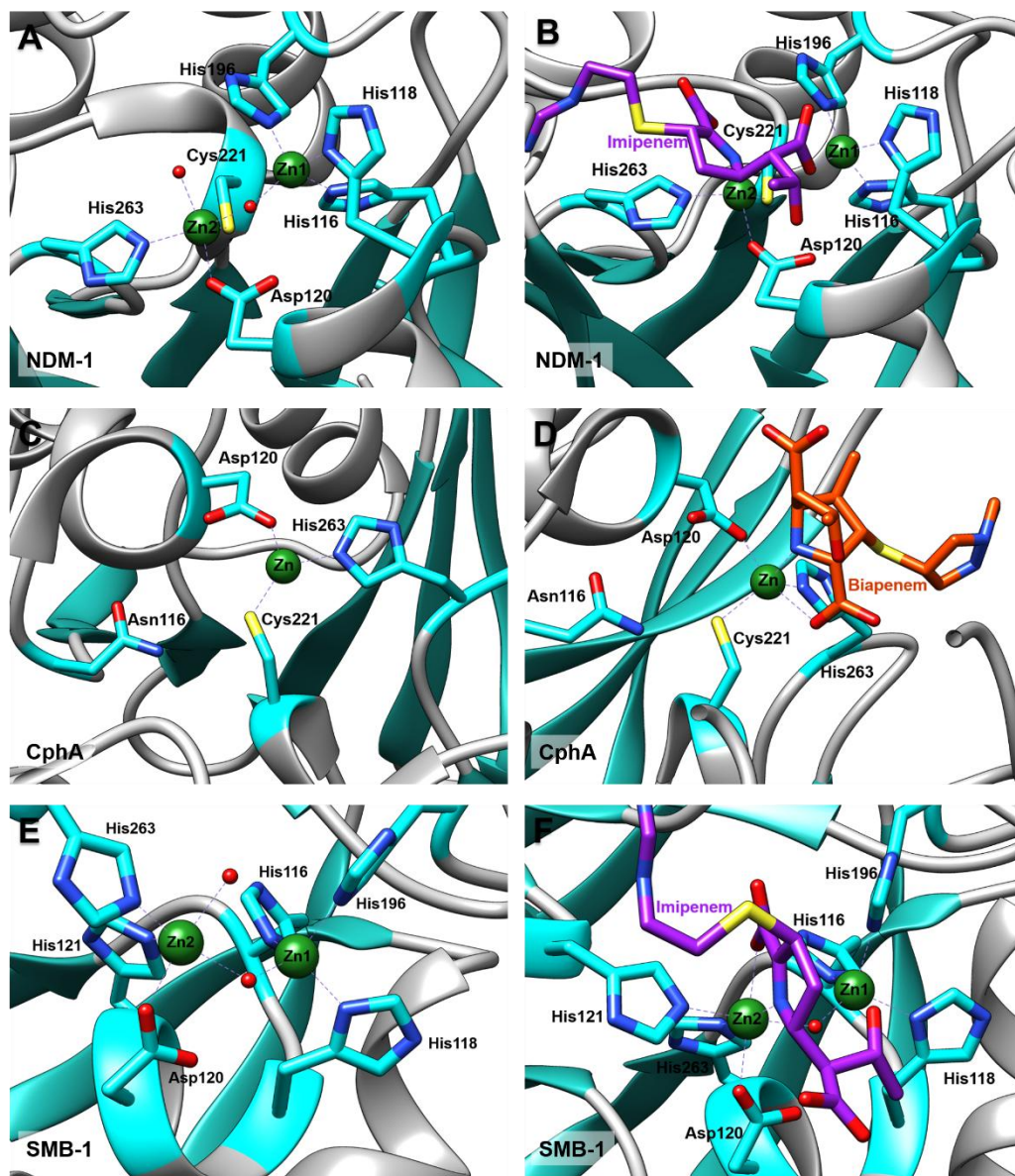
A composição, estequiometria e arquitetura do centro metálico MBLs permite classificá-las em três subfamílias principais: B1, B2 e B3. No entanto, essa

classificação é dificultada pelo baixo grau de similaridade entre as sequências das subclasses (GARAU et al., 2004). As enzimas da subclasse B1 são as mais relevantes do ponto de vista clínico e compartilham mais de 23% de identidade de sequência entre seus membros (MEINI; LLARRULL; VILA, 2015). Essas enzimas apresentam centros metálicos bi nucleares, compostos pelos sítios Zn1 e Zn2: o primeiro é coordenado por três resíduos de histidina (tri-His), e o segundo por resíduos de cisteína, histidina e ácido aspártico (Cys-His-Asp) (Figura 8, página 33).

As enzimas da subclasse B3 também possuem dois íons Zn^{2+} , mas compartilham apenas nove resíduos conservados com B1. Uma diferença marcante é a substituição do resíduo Cys221, coordenador de Zn2 em B1, por um resíduo de histidina adicional nas B3 (Figura 8, página 33). Estruturas cristalinas de representantes das subclasses B1 e B3 revelam que Zn1 apresenta uma esfera de coordenação tetraédrica, enquanto Zn2 exibe geometria trigonal bipiramidal (CONCHA et al., 1996, 2000; FABIANE et al., 1998; GARCIA-SAEZ et al., 2008; ZHANG; HAO, 2011)

Nas enzimas do tipo B1, o sítio Zn1 é coordenado pelos resíduos His116, His118, His196 e uma molécula de água ou hidróxido; já Zn2 é coordenado por Asp120, Cys221, His263 e uma molécula de água (CONCHA et al., 2000; FABIANE et al., 1998). Nas enzimas do tipo B3, os resíduos são semelhantes, com a única diferença da substituição de Cys221 por His121 na coordenação do Zn2 (Figura 8, página 33). As enzimas da subclasse B2, por sua vez, são mono-Zn e compartilham apenas 11% de identidade com as B1. Apesar disso, mantêm parte dos resíduos conservados, como Asp120, Cys221 e His263, e apresentam substituição de His116 por Asn (Figura 8, página 33). (BEBRONE et al., 2009).

Figura 8. Arquitetura de sítio ativo de MBLs e seus complexos carbapenêmicos. Vistas aproximadas dos locais ativos da MBL nativa (à esquerda) e dos produtos carbapenêmicos hidrolisados (marcados em roxo e laranja) ligados aos locais ativos (à direita). (a) e (b) B1 NDM-1 (PDBs 5zgx e 5ypk; esquerda e direita, respectivamente); (c) e (d) B3 SMB-1 (3vpe e 5b1u); (e) e (f) B2 CphA (1x8g e 1x8i).



Fonte: Autora, 2025.

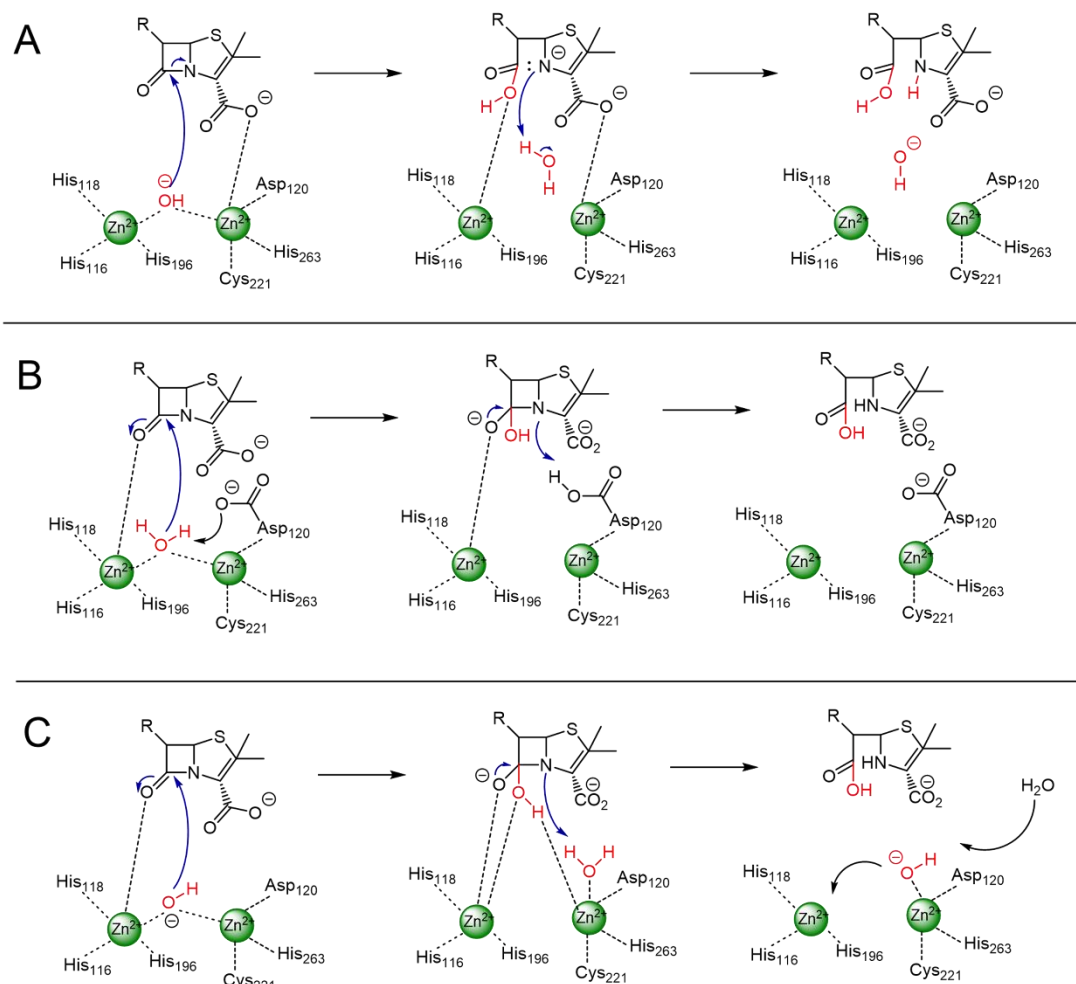
As MBLs binucleares CcrA, IMP-1, BcII e NDM-1 estão entre as enzimas cujos mecanismos catalíticos foram mais bem caracterizados até o momento, fornecendo informações importantes para a proposição de modelos mecanísticos (MEINI; LLARRULL; VILA, 2015). Dada a existência de MBLs contendo um ou dois íons de zinco, o papel desse metal no processo catalítico ainda é objeto de intenso debate na literatura. Uma das hipóteses mais aceitas sugere que o íon Zn^{2+} atue

como ácido de Lewis, coordenando-se ao oxigênio carbonílico do anel β -lactâmico e facilitando o ataque nucleofílico subsequente (PAGE; BADARAU, 2008). Além disso, o íon também pode estabilizar a carga negativa gerada no oxigênio carbonílico durante a formação do intermediário aniônico.

Por outro lado, outra proposta sustenta que a molécula de água coordenada diretamente ao zinco atua como nucleófilo no ataque ao carbono carbonílico. Nesse caso, o papel do íon metálico seria diminuir o pKa da água, promovendo sua ativação íon hidróxido que atuaria como agente nucleofílico (LIAO; YU; HIMO, 2010). Apesar do número crescente de estudos, o papel exato dos íons metálicos no mecanismo catalítico das MBLs permanece controverso e altamente complexo.

Com base em dados de cristalografia de diversas MBLs binucleares (FABIANE et al., 1998; GARAU et al., 2005; XU; GUO; CUI, 2007), diferentes propostas de mecanismos têm sido sugeridas, conforme representado Figura 9, página 35. O modelo mais aceito envolve o ataque de uma molécula de água ativada à carbonila do anel β -lactâmico, resultando na formação de um intermediário aniônico com o anel aberto. O nitrogênio do anel, agora carregado negativamente, remove um próton de uma segunda molécula de água ativada por zinco, estabilizando o produto final inativo (Figura 9A, página 35). Outras propostas variam, por exemplo, na função do resíduo Asp120, que pode substituir a segunda molécula de água no processo de protonação ou atuar na estabilização do intermediário (Figura 9B e C, página 35) (GARAU et al., 2005).

Figura 9. Propostas de mecanismo geral para MBLs para penicilina genérica. (A) Proposta utilizando água como catalisador e ácido de Lewis; (B) O resíduo de Asp120 atua desprotonando a água e depois na segunda etapa de protonação do nitrogênio e abertura do anel; e (C) O ataque do nitrogênio a uma segunda molécula de água ativa promove a abertura do anel β -lactâmico.



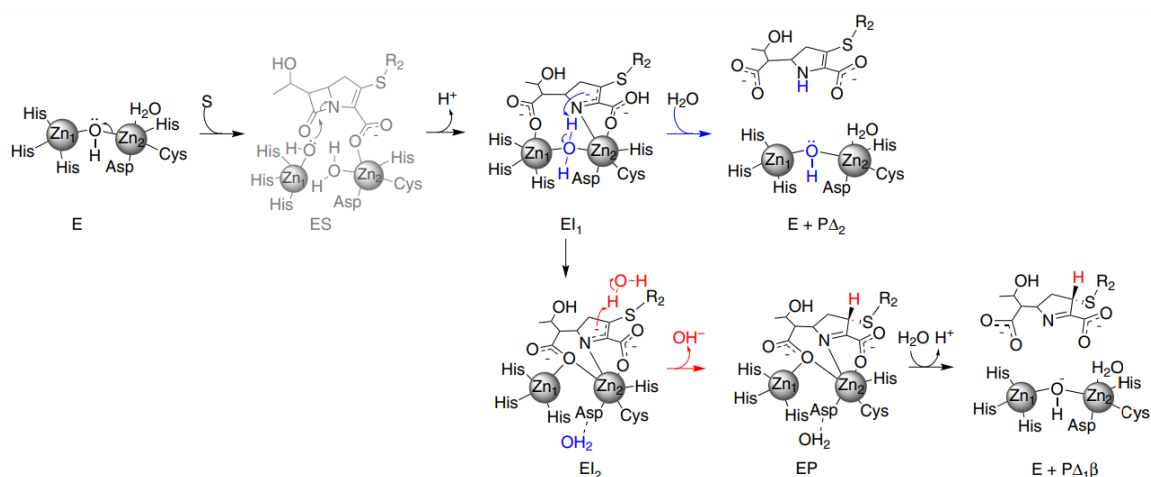
Fonte: Adaptado de Carfi et al. (1995), Gensmantel; Proctor; Page (1980) e Tooke et al. (2019)

Assim como ocorre com as SBLs, o mecanismo catalítico dos carbapenêmicos frente às MBLs também merece destaque. A principal diferença em relação a outros β -lactâmicos, como as penicilinas, está na natureza da molécula de água envolvida na etapa de protonação do intermediário formado. Quando a protonação ocorre no átomo de nitrogênio (estado intermediário EI1 — Figura 10, página 36) há formação e dissociação do produto final, com regeneração da configuração original do sítio ativo, incluindo o hidróxido nucleofílico. Por outro lado, a protonação no carbono C2 (EI2) leva à formação de um complexo estável

sem a molécula de água coordenada ao metal — fato confirmado por estudos cristalográficos (KIM et al., 2013; WACHINO et al., 2016).

Esse intermediário aniônico, com carga negativa deslocalizada sobre o anel de pirrolina, pode evoluir de duas maneiras: a protonação em C2 gera o produto $\Delta 1$ -pirrolina, enquanto a protonação em N4, viabilizada pela entrada de uma molécula de água em posição de ponte, leva à formação do produto $\Delta 2$ -pirrolina.

Figura 10. Mecanismo proposto para bi-Zn(II)-MBLs.



Fonte: Adaptado de Lisa et al. (2017).

As MBLs foram inicialmente identificadas em bactérias ambientais, sendo por décadas restritas a esse nicho. No entanto, desde a década de 1980, um número crescente de isolados clínicos passou a expressar essas enzimas, especialmente após a detecção de genes codificadores de MBLs em elementos genéticos móveis de patógenos gram-negativos, como Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Acinetobacter spp.* (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; WALSH et al., 2005).

A Tabela 2 (página 37) apresenta os principais tipos de MBLs e os microrganismos em que foram identificados. Entre as subclasses, a B1 merece atenção especial por incluir quase todas as MBLs de maior impacto clínico, como as variantes NDM (YONG et al., 2009), VIM (LAURETTI et al., 1999), IMP (ZHAO; HU, 2011), SPM-1 (TOLEMAN, 2002), BclI (LIM; PÈNE; SHAW, 1988), CcrA (RASMUSSEN; GLUZMAN; TALLY, 1990) e BlaB (ROSSOLINI et al., 1998).

Tabela 2. Exemplos de metalo- β -lactamases por subclasse e espécies em que já foram identificadas.

Subclasse	Enzima	Cepa	Referência
B1	NDM-1	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas</i> e <i>Acinetobacter</i>	(KHAN; MARYAM; ZARRILLI, 2017)
	BcII	<i>B. cereus</i>	(LIM; PÊNE; SHAW, 1988)
	CcrA	<i>B. fragilis</i>	(YANCHAK; TAYLOR; CROWDER, 2000)
	IMP-1	<i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	(CONCHA et al., 2000)
	VIM-1	<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	(LAURETTI et al., 1999)
	VIM-2	<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	(CARDOSO et al., 2002)
	IMP-2	<i>A. baumannii</i> , <i>S. marcescens</i>	(RICCIO et al., 2000)
	SPM-1	<i>P. aeruginosa</i>	(TOLEMAN, 2002)
B2	CphA	<i>A. hydrophila</i>	(MASSIDDA; ROSSOLINI; SATTA, 1991)
	ImiS	<i>Aeromonas veronii</i>	(WALSH et al., 1998)
	Sfh-1	<i>S. fonticola</i>	(SAAVEDRA et al., 2003)
B3	GOB-1	<i>E. meningoseptica</i>	(BELLAIS et al., 2000)
	CAU-1	<i>Caulobacter vibroides</i>	(DOCQUIER et al., 2002)

Fonte: Autora, 2025.

Entre essas, as enzimas IMP, VIM e NDM são as mais difundidas e já foram detectadas em isolados clínicos de diferentes partes do mundo (KAZMIERCZAK et al., 2016b), principalmente em bactérias gram-negativas como *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* Esses microrganismos constam na lista de patógenos prioritários da Organização Mundial da Saúde, o que reforça a urgência na compreensão e controle da disseminação das MBLs.

A enzima NDM-1, por exemplo, foi identificada pela primeira vez em um isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* (YONG et al., 2009) tendo-se disseminado globalmente devido à sua associação com um elemento genético móvel complexo (KHAN; MARYAM; ZARRILLI, 2017). Essa enzima também foi detectada em *P.*

aeruginosa, sendo responsável, em alguns países, por uma elevada proporção de infecções nosocomiais (LEE et al., 2003). Esse cenário é agravado pelo fato de que os inibidores atualmente disponíveis na prática clínica — como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam — foram desenvolvidos para atuar sobre SBLs e são ineficazes contra MBLs (DRAWZ; BONOMO, 2010). Isso torna ainda mais urgente o desenvolvimento de novos inibidores capazes de modular eficazmente esse mecanismo de resistência.

2.4 Inibidores de β -lactamases

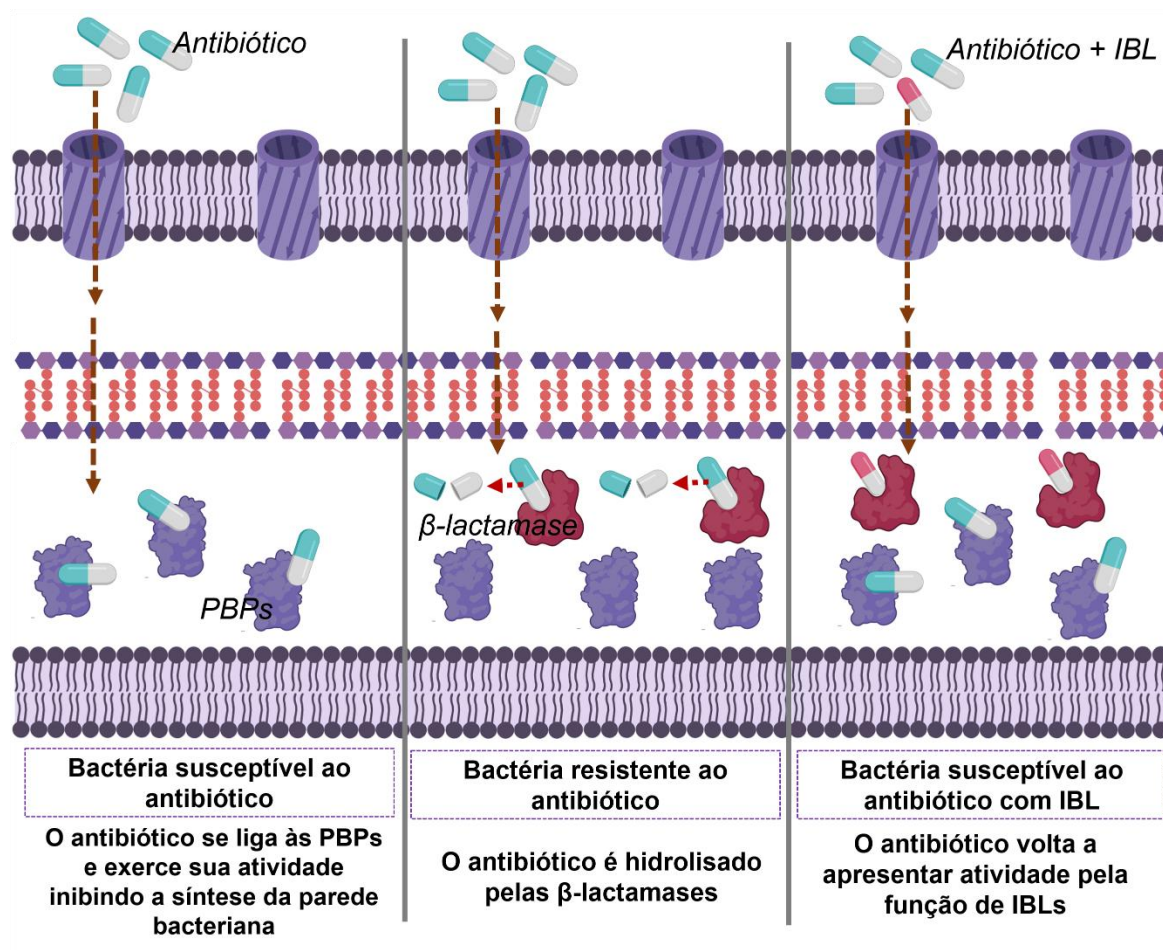
Os antibióticos β -lactâmicos continuam a representar a classe de antimicrobianos mais amplamente utilizada na prática clínica, devido à sua elevada eficácia, segurança e amplo espectro de ação (BUSH; BRADFORD, 2016). No entanto, como já discutido, a crescente resistência bacteriana tem comprometido sua eficácia no tratamento de infecções graves. Em contrapartida, o desenvolvimento de novos antibióticos capazes de contornar os mecanismos de resistência tem sido lento e insuficiente para acompanhar a rápida evolução das bactérias resistentes (VENTOLA, 2015; WENZEL; BANDOW, 2011).

Uma estratégia que tem se mostrado particularmente promissora nos últimos anos é a terapia combinada “antibiótico + inibidor de resistência”. Essa abordagem consiste na administração conjunta de um antibiótico clinicamente relevante com um inibidor específico do mecanismo de resistência bacteriano, permitindo a restauração da eficácia do fármaco (BROWN, 2015; DOUAFER et al., 2019). Os chamados adjuvantes — inibidores de resistência — oferecem vantagens significativas, como o reaproveitamento de antibióticos já aprovados, seguros e amplamente utilizados, além de reduzir a necessidade de investimentos elevados na descoberta de novos compostos antibacterianos (TYERS; WRIGHT, 2019).

Considerando a diversidade de mecanismos de resistência, o desenvolvimento de diferentes tipos de inibidores tem recebido atenção crescente. No caso de bactérias gram-negativas, a produção de β -lactamases destaca-se como um dos principais mecanismos de resistência, dada sua capacidade de inativar praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos. Nesse contexto, o desenvolvimento de IBLs desponta como uma estratégia eficaz para neutralizar tanto SBLs quanto MBLs, promovendo a recuperação da atividade de diversos

antibióticos. A Figura 11 (página 39) ilustra, de forma esquemática, o mecanismo de ação dos β -lactâmicos e o papel dos IBLs como adjuvantes terapêuticos.

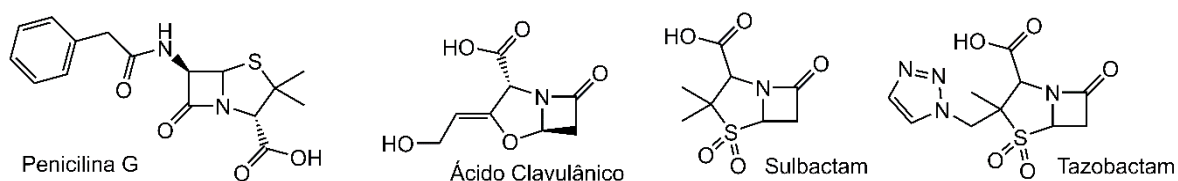
Figura 11. Atuação de IBLs contra enzimas β -lactamases.



Fonte: Autora, 2025.

De fato, essa abordagem combinada não é nova para a terapia antimicrobiana. O primeiro IBL utilizado na prática clínica, o ácido clavulânico, foi identificado em *Streptomyces clavuligerus*, no ano de 1972. Mais tarde foi descoberto o sulbactam, em 1978 e o tazobactam em 1984 (BEBRONE et al., 2010; BROWN et al., 1976). Embora esses IBLs sejam estruturalmente semelhantes à penicilina (Figura 12, página 40), eles apresentam fraca atividade antibacteriana. No entanto, quando administrado em combinação com antibióticos β -lactâmicos, eles se ligam irreversivelmente à β -lactamases (DRAWZ; BONOMO, 2010).

Figura 12. Estrutura dos IBLs mais utilizados na prática clínica (primeira geração) em comparação ao antibiótico Penicilina G.



Fonte: Autora, 2025.

Embora os IBLs tenham representado um marco na terapia antimicrobiana, especialmente pela sua eficácia na inibição de SBLs, os compostos de primeira geração apresentam um espectro de ação limitado, atuando predominantemente contra enzimas da classe A — com exceção das carbapenemases. Esses inibidores demonstram pouca ou nenhuma eficácia contra β -lactamases de classe C, como a AmpC, e são inativos frente às classes B (MBLs) e D (LIVERMORE, 1998; TOTIR et al., 2008). Essa lacuna terapêutica reforça a necessidade urgente de desenvolvimento de novos compostos capazes de inibir essas enzimas (LI et al., 2022; TOOKE et al., 2019).

Inibidores mais recentes, como Avibactam e Vaborbactam, apresentam espectro de ação ampliado, atuando sobre enzimas das classes A, C e algumas de classe D. O sucesso desses compostos tem incentivado a busca por novos inibidores com estruturas químicas diversificadas e maior abrangência (DRAWZ; PAPP-WALLACE; BONOMO, 2014). A Tabela 3 (página 40) apresenta um panorama atualizado dos IBLs em desenvolvimento, bem como as combinações terapêuticas disponíveis atualmente.

Tabela 3. Estado atual do desenvolvimento clínico de IBLs.

Grupo	Inibidor	Parceiro β -lactâmico	Estágio	Espectro de inibição				
				ESBL	AmpC	KPC	OXA-48	MBL
Clavam	Ácido Clavulânico ²	Amoxicilina	Aprovado	✓	-	-	-	-
		Ticarcilina	Aprovado	✓	-	-	-	-
Sulfona	Sulbactam ²	Ampicilina	Aprovado	✓	-	-	-	-
		Piperacilina	Aprovado	✓	-	-	-	-
	Tazobactam ²	Cefepime	Aprovado	✓	-	-	-	-
		Ceftolozane	Aprovado	✓	-	-	-	-
DBO	Enmetazobactam ²	Cefepime	Fase III	✓	-	-	-	-
	Avibactam ¹	Ceftazidime	Aprovado	✓	✓	✓	✓	✓
		Aztreonam	Fase II	✓	✓	✓	✓	✓
	Relebactam ²	Imipenem	Fase III	✓	✓	✓	✓	-
	Nacubactam ¹	Meropenem	Fase I	✓	✓	✓	-	-

	Zidebactam ²	Cefepime	Fase III	✓	✓	✓	-	-
	ETX2514	Sulbactam	Fase II	✓	✓	✓	-	-
Ácido Borônico	Vaborbactam ¹	Meropenem	Aprovado	✓	✓	✓		
	VNRX-5133	Cefepime	Fase I	✓	✓	✓		✓
Ácido-Piridino-2-carboxílico	ANT431	Meropenem	Pré-Clínica	-	-	-	-	✓

Legenda: ¹ Inibidor reversível; ² Inibidor Irreversível.

Fonte: Adaptado de Bush; Bradford (2019).

2.4.1 Desenvolvimento de IBLs contra serino- β -lactamases

Por muitos anos, a busca por IBLs eficazes contra enzimas do tipo SBL concentrou-se em estruturas baseadas no próprio anel β -lactâmico como andaime molecular (DECUYPER et al., 2018). Estudos de relação estrutura-atividade levaram à identificação do esqueleto dos monobactâmicos e, posteriormente, ao desenvolvimento do composto sintético Aztreonam (Figura 13, página 42), que demonstrou resistência à hidrólise por algumas β -lactamases, como TEM-1, TEM-2, OXA-2 e SHV-1 (BONNER et al., 1981; SYKES et al., 1982). Atualmente, Aztreonam é o monobactâmico de maior sucesso clínico, podendo ser administrado em combinação com diversos antibióticos β -lactâmicos (DECUYPER et al., 2018).

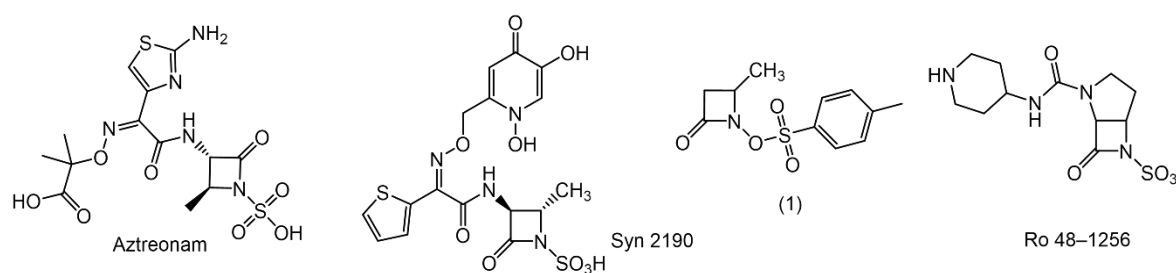
Posteriormente, um derivado monobactâmico contendo 1,3-hidroxi-4-piridona na cadeia lateral C3, denominado Syn 2190, foi identificado como inibidor da AmpC. Embora inativo contra ESBLs, o composto demonstrou inibição frente a β -lactamases das classes A e D em *Pseudomonas aeruginosa* e diversas espécies de Enterobacteriaceae (NETZEL et al., 2007; NISHIDA et al., 1999). Além disso, a combinação de Syn 2190 com ceftazidima ou cefpirome (em proporção 1:1) melhorou significativamente a eficácia do tratamento em modelos murinos infectados com *P. aeruginosa*.

Uma modificação promissora foi realizada por Bulychev et al. (2000), resultando no derivado monobactâmico 1 (Figura 13, página 42), que apresentou rápida acilação no sítio ativo da enzima TEM-1 e resistência à desacilação (BULYCHEV et al., 2000). Após a formação da acil-enzima com a SBL NMC-A, observou-se eliminação do grupo tosilato, originando duas espécies distintas de acil-enzimas (MOUREY et al., 1999), com baixas taxas de desacilação. Segundo os autores, as conformações alternam entre estados voltados para dentro e para

fora do orifício oxiânion, exigindo a quebra e reformação de pontes de hidrogênio. Em ambas, a água necessária para a etapa de desacilação encontra-se mal posicionada, o que justifica o caráter irreversível da inibição.

Além disso, monobactâmicos com ligação em ponte também têm sido relatados como inibidores eficazes de SBLs. Um exemplo é o composto Ro 48-1256, que demonstrou afinidade por AmpC quando combinado com imipenem, meropenem, piperacilina ou ceftazidima contra isolados de *P. aeruginosa* (LIVERMORE, 1997). Sua atividade inibitória foi atribuída à capacidade de restringir a rotação da ligação C3–C4, necessária para a aproximação da água hidrolítica à ligação éster enzima-inibidor, bloqueando assim, a desacilação (HEINZE-KRAUSS et al., 1998).

Figura 13. Estrutura de IBLs monobactâmicos.



Fonte: Autora, 2025.

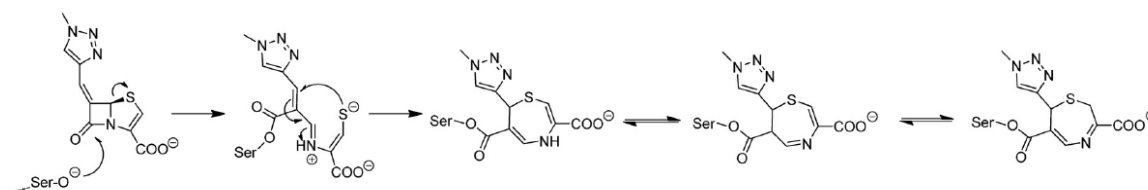
Os penems também têm sido investigados como potenciais IBLs com eficácia frente a diversos mecanismos de resistência (DRAWZ; PAPP-WALLACE; BONOMO, 2014). Um dos compostos mais estudados é o BRL 42715, relatado como um inibidor eficaz contra enzimas das classes A, C e D (FARMER et al., 1994; MATAGNE et al., 1995). Quando avaliado contra TEM-1, SHV-1, CP99 (classe C) e OXA-1, BRL 42715 apresentou valores de IC_{50} cerca de 10 a 100 vezes menores que os observados para os inibidores clássicos como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (MATAGNE et al., 1995).

Ensaio de combinação com antibióticos demonstraram o potencial desse composto em restaurar a atividade da amoxicilina frente a cepas resistentes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* e *Neisseria gonorrhoeae* (FARMER et al., 1994). O mecanismo de inibição proposto para esse penem envolve a formação de um anel tiazepina estável de

sete membros, ligado covalentemente ao resíduo catalítico Ser64, sem a necessidade de fragmentação no sítio ativo (MICHAUX et al., 2005).

Estudos com o BRL 42715 e outros penems apoiam um modelo em que o composto forma inicialmente uma imina intermediária do tipo acil-enzima, a qual sofre rearranjo e ciclização intramolecular, resultando na formação do anel tiazepina. Essa estrutura impede a regeneração da enzima, promovendo inibição eficaz das β -lactamases das classes A, C e D (Figura 14, página 43) (NUKAGA et al., 2003; VENKATESAN et al., 2006). Além dos penems, diversos derivados de penicilinas, cefalosporinas e sulfonas também têm sido investigados como possíveis IBLs, expandindo o arsenal de estratégias contra a RAM (KONG; YANG, 2021).

Figura 14. Proposta de mecanismo para inativação de BRL 42715 por SBLs, mostrando a formação do anel de sete membros tiazepina.



Fonte: Adaptado de Drawz; Bonomo (2010).

Uma classe química que tem ganhado destaque nos últimos anos no desenvolvimento de IBLs é a dos derivados de boro. O interesse por esses compostos decorre da capacidade do boro em adotar uma geometria tetraédrica, o que lhe permite mimetizar espécies de transição tetraédricas presentes em reações hidrolíticas (FU et al., 2014). Essa propriedade favorece a formação de complexos covalentes reversíveis entre a serina catalítica da enzima e o grupo boronato, levando à inibição eficiente da atividade enzimática (DRAWZ; PAPP-WALLACE; BONOMO, 2014).

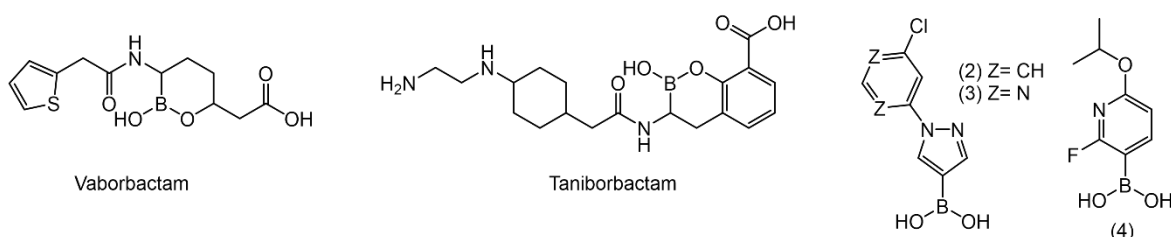
O principal exemplo dessa classe é o Vaborbactam (Figura 15, página 44), o derivado de boro de maior sucesso clínico até o momento. Embora tenha sido desenvolvido inicialmente como um inibidor específico da KPC, também demonstra atividade frente a outras enzimas das classes A e C (HECKER et al., 2015). Em 2017, o Vaborbactam foi aprovado em combinação com o meropenem, apresentando atividade *in vitro* contra *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e

Citrobacter spp. produtoras de KPC (CASTANHEIRA et al., 2016). Estudos cristalográficos mostram a formação de um aduto tetraédrico com a serina catalítica, e revelam que o grupo carboxilato do Vaborbactam contribui para a fixação do complexo no sítio ativo (HECKER et al., 2015).

Apesar de não apresentar atividade contra MBLs, a estrutura do Vaborbactam serviu como base para o desenvolvimento do Taniborbactam (também conhecido como VNRX-5133), um boronato bicíclico com amplo espectro de ação (Figura 15, página 44). Taniborbactam inibe enzimas das classes A, C e D, além de algumas MBLs, como NDM-1 e VIM-1/2 (KRAJNC et al., 2019). A sua atividade contra MBLs tem sido atribuída à interação das hidroxilas do boro com o sítio Zn1 e com o resíduo conservado Asn233 da enzima VIM-2 (BUSH; BRADFORD, 2019). Trata-se do primeiro IBL de amplo espectro a entrar em desenvolvimento clínico.

Estratégias de química computacional também têm sido aplicadas na identificação de novos IBLs derivados de ácidos borônicos. Em um estudo pioneiro, London et al. (2014) utilizaram uma biblioteca de 23 mil ácidos borônicos para realizar uma triagem virtual baseada em *docking* covalente, empregando a estrutura cristalográfica da enzima AmpC (PDB: 4E3N). O trabalho resultou na identificação de três potentes IBLs (2-4, Figura 15, página 44), sendo que o composto 4 demonstrou restaurar a eficácia da cefotaxima frente a patógenos produtores de AmpC. O destaque foi o papel do anel pirazol na ancoragem do composto ao sítio ativo. Posteriormente, foram identificados derivados não cíclicos com atividade inibitória significativa, demonstrando a versatilidade estrutural dos ácidos borônicos como ponto de partida para o desenvolvimento de novos IBLs (SANTUCCI et al., 2017).

Figura 15. Potentes IBLs contendo o átomo de boro.



Fonte: Autora, 2025.

Na busca por alternativas estruturais ao anel β -lactâmico, uma nova classe química emergiu como promissora no desenvolvimento de IBLs: os compostos diazabiciclo-octanonas (DBOs). Essa classe ganhou notoriedade com a descoberta do Avibactam, um inibidor covalente, reversível e não β -lactâmico, composto por um anel de cinco membros com um grupo amida (LAHIRI et al., 2013). Embora estruturalmente distinto dos β -lactâmicos, o Avibactam compartilha com eles um grupo carbonila eletrofílico, o que favorece seu reconhecimento pelas β -lactamases e a formação de adutos estáveis (STACHYRA et al., 2010). Outro aspecto importante é a presença de um anel piperidina, localizado acima da ligação C7–N6, que mantém a molécula em uma conformação relativamente tensa. Isso permite que o átomo de N6 atue como nucleófilo mais eficiente do que a água hidrolítica, resultando em um tempo reduzido de regeneração enzimática (EHMANN et al., 2013).

Em comparação com os IBLs clássicos, o Avibactam mostra excelente atividade inibitória contra β -lactamases clinicamente relevantes das classes A e C, como CTX-M-15, KPC-2 e AmpC de *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (EHMANN et al., 2012). Seu mecanismo de inibição difere dos demais IBLs: após o ataque nucleofílico da serina catalítica ao grupo carbonila da carbamoila do Avibactam, o complexo formado não sofre hidrólise, mas passa por um processo lento de desacilação, regenerando tanto a enzima quanto o inibidor (COLEMAN, 2011; KRISHNAN et al., 2015). A exceção é observada com a enzima KPC, onde ocorre hidrólise do aduto e a consequente perda da fração ureia, impedindo a regeneração do inibidor (EHMANN et al., 2013). Essa capacidade de regeneração permite que o Avibactam, ao contrário de inibidores irreversíveis, possa acilar novas β -lactamases mesmo após a liberação. No entanto, o tempo de acilação e desacilação varia conforme a enzima, sendo mais lento em β -lactamases da classe D (OXA) (GONZÁLEZ-BELLO et al., 2020).

O sucesso do Avibactam impulsionou o desenvolvimento de novos compostos na classe dos DBOs. Um dos derivados mais relevantes é o Relebactam (Figura 16, página 46), ativo contra a maioria das enzimas-alvo do Avibactam, com destaque para as β -lactamases das classes A, incluindo KPC, e C (ZHANEL et al., 2018). Estruturalmente semelhante ao Avibactam, o Relebactam se diferencia pela

presença de um anel piperidina na cadeia lateral da carboxamida, adição que reduz o efluxo do composto por bombas de resistência bacterianas (DEJA, 2021).

Outro avanço foi o desenvolvimento do Nacubactam, que possui um grupo 2-aminoetoxi na cadeia lateral (Figura 16, página 46). Além da atividade inibitória esperada, esse composto apresenta atividade antibacteriana intrínseca, ausente nos DBOs anteriormente descritos (LIVERMORE et al., 2016). Também foi observada sinergia com diversos antibióticos β -lactâmicos, intensificando seu efeito antimicrobiano.

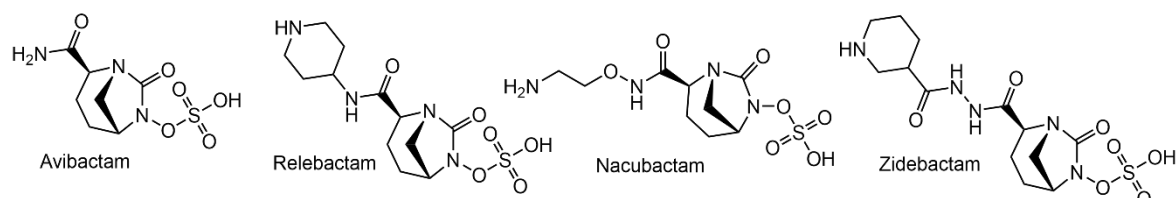
Estudos cristalográficos e de interação molecular têm contribuído para a identificação de diversos outros compostos derivados de DBOs, incluindo alguns com ação potencial contra β -lactamases da classe B, até então resistentes a IBLs tradicionais. A Tabela 4 (página 46) apresenta um resumo dos principais DBOs com relevância clínica atualmente.

Tabela 4. Compostos classificados como diazabicyclo octanonas, parceiros β -lactâmicos e atual estágio de desenvolvimento.

Nome/Código	Combinação com	Fase de desenvolvimento clínico	Referência
Avibactam	Ceftazidima	Aprovada	(FLAMM et al., 2014)
	Ceftarolina fosamil	Fase II	(CEREXA, 2023)
	Aztreonam	Fase III	(ASTRAZENECA, 2023)
Relebactam	Imipenem/cilastin	Fase III	(MERCK, 2023)
Nacubactam	Meropenem	Fase I	(ROCHE, 2023)
Zidebactam	Cefepime	Fase I	(WOCKHARDT, 2023)
ETX 2514	Sulbactam	Fase II	(THERAPEUTICS, 2023)

Fonte: Autora, 2025.

Figura 16. Estrutura de diazabicyclo octanonas (DBOs) representativas.



Fonte: Autora, 2025.

2.4.2 Desenvolvimento de IBLs contra metalo- β -lactamases

Embora avanços significativos tenham sido alcançados no desenvolvimento de IBLs contra enzimas das classes A, C e D, o mesmo progresso ainda não foi observado para as MBLs da classe B. Nenhum dos IBLs disponíveis clinicamente,

voltados para serino- β -lactamases apresenta atividade contra MBLs, e até o momento não existe nenhum inibidor aprovado para uso clínico com eficácia comprovada frente a enzimas da classe B. Além das diferenças no mecanismo catalítico, SBLs e MBLs diferem estruturalmente quanto ao tamanho e à topologia do sítio ativo. Enquanto as SBLs possuem um sítio catalítico estreito e profundo, as MBLs apresentam um sulco raso, com poucos pontos de contato para ancoragem do substrato ou inibidor (MOJICA et al., 2022). Essa diferença topológica representa um desafio adicional no desenho de IBLs eficazes contra MBLs. Além disso, a heterogeneidade entre os sítios ativos das diferentes subclasses de MBLs dificulta ainda mais o desenvolvimento de compostos de amplo espectro (WANG et al., 1999).

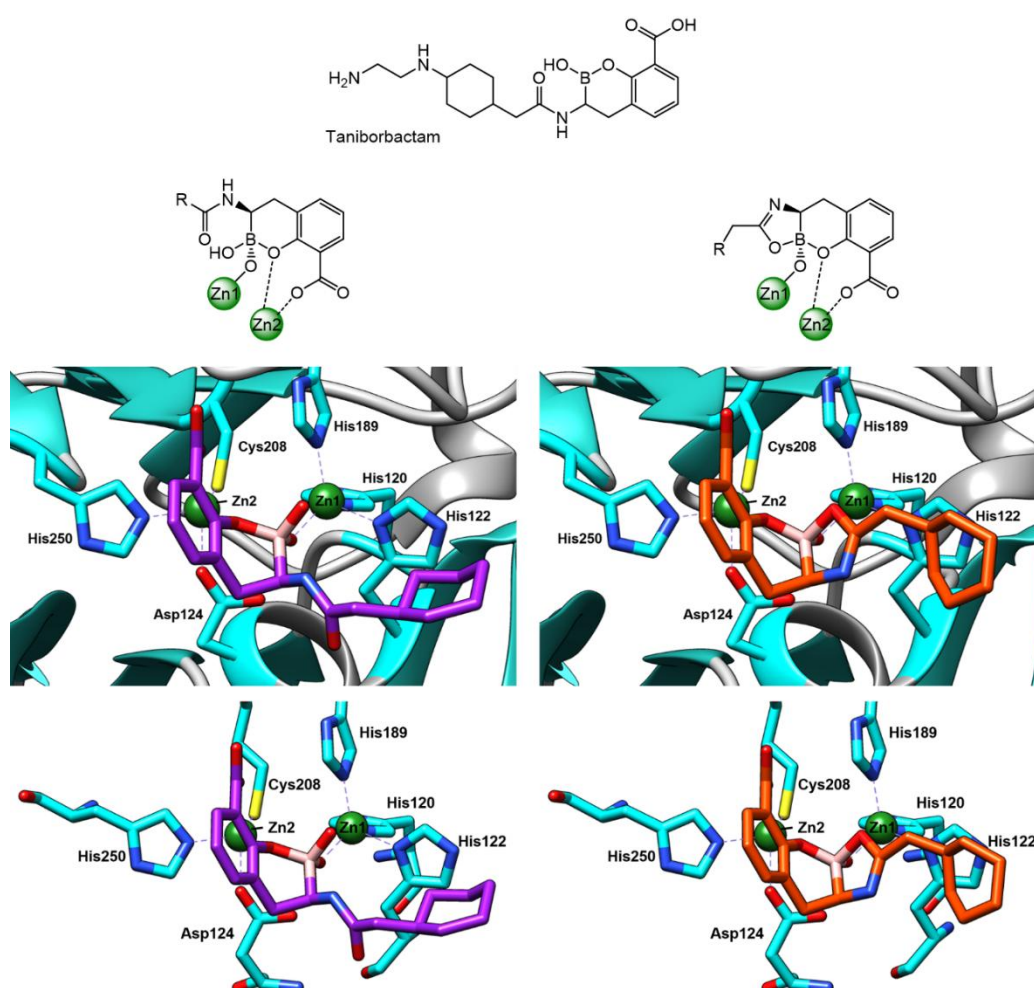
Outro aspecto relevante é que, ao contrário das SBLs — que são exclusivamente bacterianas — as MBLs pertencem a uma superfamília de metaloenzimas envolvidas em diversas funções biológicas, além da hidrólise de antibióticos β -lactâmicos. Essa diversidade funcional representa um risco potencial de toxicidade ou efeitos fora do alvo ao desenvolver inibidores para uso clínico.

Com o avanço da pesquisa básica e o apoio de estudos de cristalografia, algumas características estruturais e mecânicas têm sido elucidadas para MBLs, permitindo abordagens mais racionais para o desenvolvimento de inibidores. Uma forma prática de classificar os mecanismos de ação dos IBLs voltados às MBLs é agrupar os compostos com base em seus determinantes químicos capazes de interferir com o centro catalítico da enzima (F. MOJICA; A. BONOMO; FAST, 2016). As três categorias principais são: (i) compostos que se ligam diretamente ao íon de zinco; (ii) quelantes que sequestram o íon de zinco do sítio ativo; (iii) compostos que formam ligações covalentes com resíduos catalíticos da enzima.

Atualmente, dois inibidores com atividade contra MBLs encontram-se em estágio clínico de desenvolvimento: Taniborbactam (VNRX-5133) e ANT431. O Taniborbactam é um boronato bicíclico com atividade contra β -lactamases das classes A, C e D, além das MBLs do tipo VIM e NDM, especialmente em *Pseudomonas aeruginosa* (HERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2022). Estudos cristalográficos da enzima VIM-2 complexada com taniborbactam revelaram a formação de complexos tricíclicos com os íons metálicos do sítio catalítico,

sugerindo um possível mecanismo para sua elevada atividade em comparação a outros IBLs (Figura 17, página 48) (KRAJNC et al., 2019). Taniborbactam encontra-se atualmente em ensaios clínicos de fase III, em combinação com cefepime, para tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de MBLs (DAIGLE et al., 2018; MCGOVERN et al., 2022).

Figura 17. Estrutura cristalina do complexo enzimático NDM-1/Taniborbactam (PDB 6RMF, 1,51 Å). Os dois tipos de adutos enzimáticos observados na estrutura cristalina, especificamente os adutos bicíclicos (esquerda) e tricíclicos (direita), são mostrados em imagens separadas. A estrutura cristalina do grupo etilamino no ligante foi removido porque nenhuma densidade eletrônica para esses átomos foi observada. Resíduos relevantes da cadeia lateral são mostrados e rotulados.

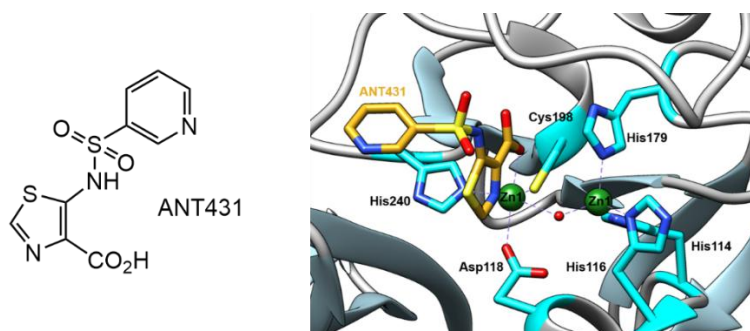


Fonte: Autora, 2025.

O segundo inibidor ANT431 (Figura 18, página 49), um tiazol-4-carboxílico apresenta inibição de NDM-1 e VIM-2, potencializando o efeito do meropenem contra *E. coli* produtora dessas enzimas (EVERETT et al., 2018). A estrutura

cristalina do complexo VIM-2/ANT431 revelou que tanto o grupo carboxilato quanto o átomo de nitrogênio do tiazol estão envolvidos na esfera de coordenação do zinco metálico (Zn₂) (LEIRIS et al., 2019; WILLIAMS et al., 2020).

Figura 18. Estrutura cristalina de VIM-2 em complexo com ANT431; PDB: 6HF5.



Fonte: Autora, 2025.

Assim como o ANT431, outros derivados de ácidos carboxílicos têm sido reportados como potenciais inibidores MBLs. Os mecanismos de ligação desses compostos ao sítio ativo variam amplamente entre diferentes estruturas, evidenciando a diversidade e complexidade dos centros catalíticos das MBLs. O composto 5 (Figura 19, página 50) foi identificado por triagem virtual e demonstrou ligação próxima aos íons de zinco do sítio ativo, sem no entanto, promover quelação direta (LI et al., 2017a). Apesar disso, interações por pontes de hidrogênio com o resíduo Asn233 e com moléculas de água foram observadas, conferindo ao composto uma atividade considerável contra a enzima VIM-5.

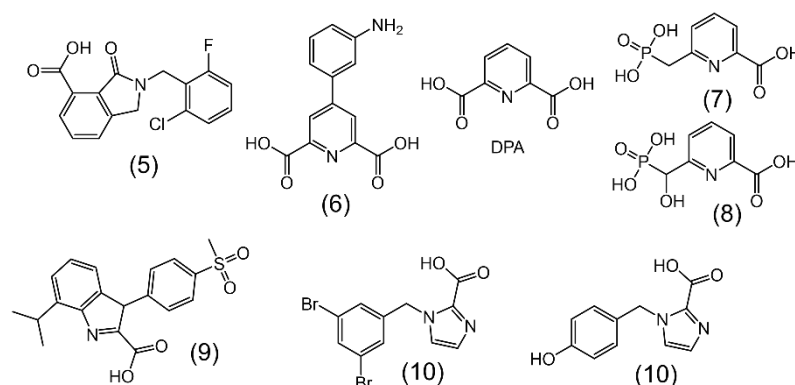
Em outro estudo, um derivado do ácido dipicolínico (DPA) foi destacado como um inibidor promissor (CHEN et al., 2017). O DPA é reconhecido como um “removedor de zinco” (KIMURA; ISHII; YAMAGUCHI, 2005), e sua modificação estrutural originou o composto 6 (Figura 19, página 50), que apresentou inibição competitiva por ligação ao metal, com atividade significativa contra MBLs clinicamente relevantes. Além disso, foi observado aumento da eficácia do imipenem frente a cepas produtoras de MBLs em Enterobacteriaceae (CHEN et al., 2017).

Em 2018, Hinchliffe et al., reportaram dois derivados fosfonados — 6-fosfonometilpiridina-2-carboxilatos (Figura 19, compostos 7 e 8) — com atividade contra as enzimas IMP-1, VIM-2, NDM-1 e L1 (HINCHLIFFE et al., 2018). A estrutura cristalográfica do complexo IMP-1 com o composto 7 revelou que o

inibidor se liga ao sítio ativo sem deslocar o hidróxido nucleofílico. O carboxilato e o nitrogênio da piridina interagem com o segundo íon de zinco, enquanto o carboxilato ainda forma interações eletrostáticas com o resíduo Lys224, ressaltando sua importância na estabilidade do complexo.

Outra abordagem envolveu o indol-2-carboxilato, identificado por Brem et al., por meio de triagem de alto rendimento (composto 9, Figura 19) o qual demonstrou atividade inibitória ampla contra as enzimas NDM, VIM e IMP (BREM et al., 2022). Nesse caso, o mecanismo de ação parece envolver o bloqueio do hidróxido complexado com o zinco, sem provocar seu deslocamento. Os autores também destacam que o grupo indol contribui para a formação de um complexo estável com a enzima. Mais recentemente, dois derivados imidazol-2-carboxílicos (compostos 10 e 11, Figura 19), foram descritos como potentes inibidores de MBLs da subclasse B1, com destaque para a inibição das enzimas VIM-2 (0,014 μ M), VIM-5 (0,053 μ M) e IMP-1 (0,085 μ M) (YAN et al., 2022).

Figura 19. Estrutura de derivados de ácido carboxílico inibidores de MBL.



Fonte: Autora, 2025.

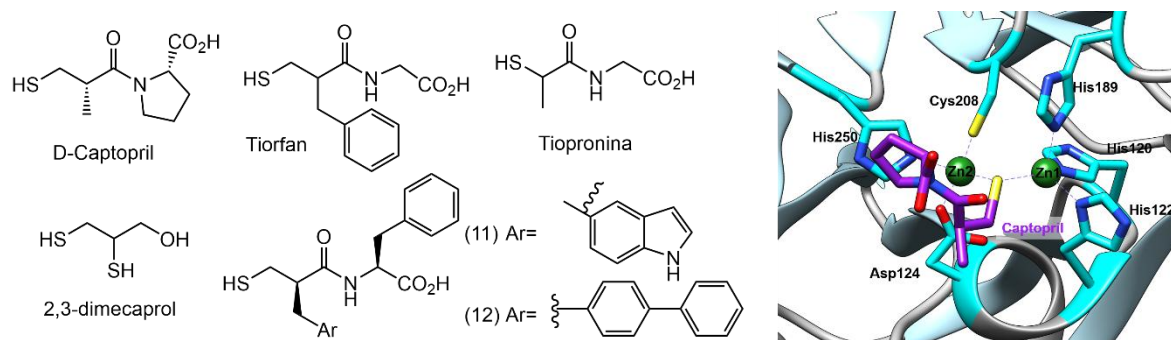
Compostos contendo grupos tiol tem sido amplamente investigados como potenciais inibidores de MBLs. Acredita-se que tíóis livres, atuando como bases de Lewis, podem coordenar-se diretamente aos íons de zinco presentes no sítio ativo das MBLs — que, por sua vez, atuam como ácidos de Lewis — substituindo a molécula de água nucleofílica envolvida no processo catalítico (LI et al., 2022).

O principal representante dessa classe é o captopril, fármaco aprovado para o tratamento da hipertensão arterial, mas que também demonstrou atividade inibitória significativa contra MBLs de diversas subclasses, incluindo BcII, NDM-1, CphA, L1 e FEZ-1 (BREM et al., 2016; GARCÍA-SÁEZ et al., 2003; GARCÍA-SÁEZ

et al., 2003; KING et al., 2012; NAUTON et al., 2008). A estrutura cristalográfica da enzima NDM-1 complexada com L-captopril mostra que o grupo tiol do inibidor se posiciona entre os dois íons Zn^{2+} , ocupando os sítios de coordenação de ambos os metais (Figura 20, página 51). Como resultado, o grupo tiol substitui o ânion hidróxido situado entre os dois íons zinco — responsável por iniciar a reação de hidrólise — bloqueando, assim, a atividade catalítica da enzima (KING et al., 2012).

Além do captopril, outros três fármacos contendo tiol livre também foram identificados como inibidores promissores de MBLs (Figura 20, página 51): Tiorfano, o metabólito ativo da racecadotril (um antidiarreico inibidor da encefalinase); Tiopronina, utilizada no tratamento da cistinúria homozigótica grave; Dimercaprol, empregado como agente quelante no tratamento de envenenamento por metais pesados como arsênio, cádmio e mercúrio (KLINGLER et al., 2015). Todos esses compostos demonstraram boa atividade contra diferentes MBLs testadas, além de apresentarem efeito sinérgico quando combinados com imipenem. Um aspecto estrutural relevante para a atividade inibitória parece ser a presença de grupos carboxilato, que contribuem para o ancoramento ao sítio catalítico. Essa hipótese é reforçada por estudos com os compostos 11 e 12 (Figura 20, página 51), obtidos por modificações estruturais no esqueleto do tiorfano. Esses derivados apresentaram atividade inibitória na faixa nanomolar, representando importantes avanços no desenvolvimento de inibidores mais potentes (MENG et al., 2019).

Figura 20. Compostos contendo o grupo tiol caracterizados como inibidores de MBLs.

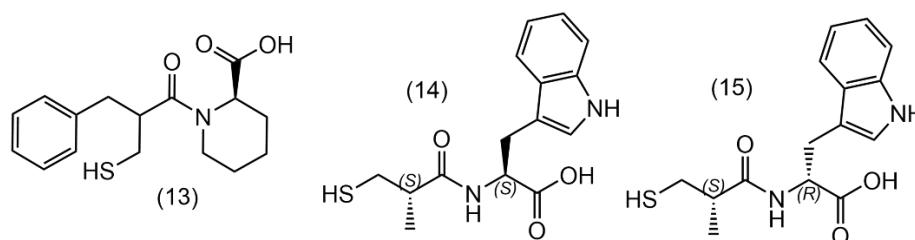


Fonte: Autora, 2025.

O sucesso dos inibidores já mencionados inspirou mais esforços para desenvolver novos IBLs contendo o grupo tiol. Um deles, utilizou-se o anel

piperidina como modificação estrutural, resultando em boa atividade contra VIM-1, NDM-1 e IMP-7 (Figura 21, composto 13) (BÜTTNER et al., 2018). Outro trabalho desenvolveu inibidores (S)-3-mercapto-2-metilpropanamida (Figura 21, 14 e 15), apresentando atividade de amplo espectro, onde destaca-se contra VIM-1/2/5, NDM-1, IMP-1 e BcII (LI et al., 2017b).

Figura 21. Outros derivados contendo o grupo tiol caracterizados como inibidores de MBLs.

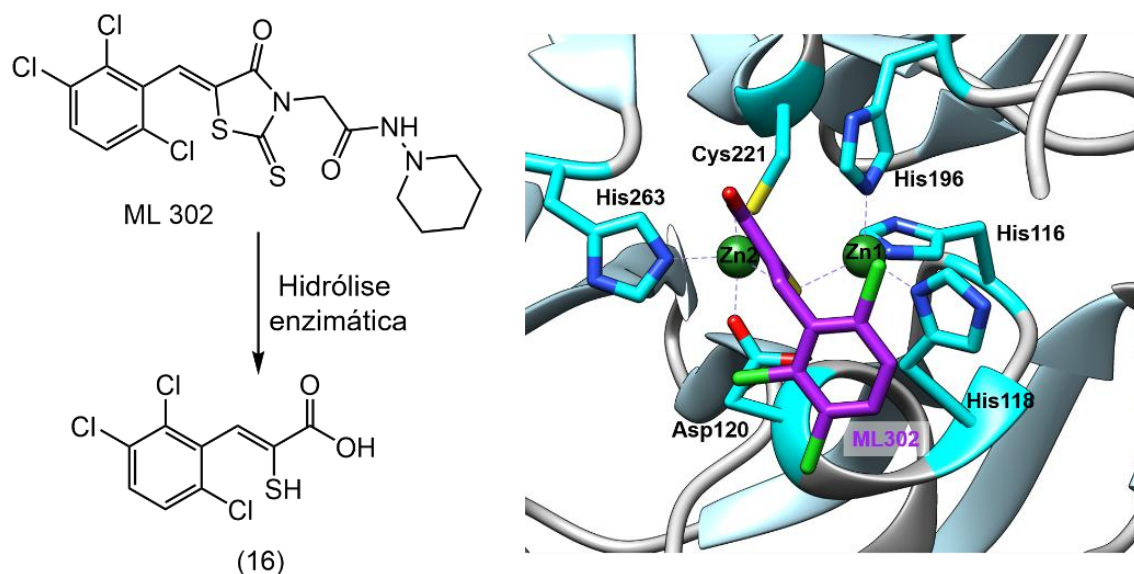


Fonte: Autora, 2025.

Por fim, resultados promissores também têm sido obtidos com compostos contendo o núcleo rodanina. Na química medicinal, essa estrutura tem sido associada a atividade contra β -lactamases de classe A e C, bem como a propriedades antibióticas por inibição de PBPs (GRANT et al., 2000; XIANG et al., 2018; ZERVOSEN et al., 2004, 2012; ZHANG et al., 2018). Um exemplo notável é a molécula ML302 (Figura 22, página 53) identificada em uma triagem de alto rendimento contra MBLs, apresentando atividade dupla VIM-2/IMP-1 com eficácia em múltiplos isolados clínicos (SPICER et al., 2010).

O aspecto mais relevante desse estudo foi a potencialização da atividade do imipenem frente a cepas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Estudos cristalográficos posteriores demonstraram que o ML302 sofre hidrólise, formando o tienolato composto 16 (Figura 22, página 53), um acceptor de Michael, considerado a forma ativa do ML302 (BREM et al., 2014). Esse achado chamou a atenção do nosso grupo de pesquisa, já que até então não havia relatos do uso da rodanina como substrato para MBLs. Além disso, a estrutura do tiol gerado a partir da hidrólise sugere potencial para formar complexos estáveis com os íons Zn^{2+} do sítio catalítico.

Figura 22. Estrutura hidrolisada do composto ML 302 e suas interações PDB: 4PVO.



Fonte: Autora, 2025.

2.5 Potencial de aceptores de Michael contra cisteíno proteases

Embora evidências mecanísticas, como as previamente discutidas, sustentem o uso de compostos aceptores de Michael como inibidores de serino proteases, há um respaldo ainda mais robusto na literatura para o uso dessa classe química na inibição de cisteíno proteases. O desenvolvimento de inibidores irreversíveis específicos para essas enzimas foi inicialmente proposto com base na introdução de uma estrutura reativa — comumente denominada *warhead* — em um substrato eficiente. Os primeiros *warheads* utilizados incluíam agentes alquilantes, como compostos diazo e halocetonas. Atualmente, uma variedade de *warheads* já foi descrita, entre os quais se destacam os aceptores de Michael. Além disso, compostos derivados de aminoácidos e peptídeos contendo grupos α,β -insaturados, como vinil sulfonas e carbonilas insaturadas, têm se mostrado inibidores irreversíveis específicos e potentes de cisteíno proteases (POWERS et al., 2003).

Além do catabolismo e do processamento proteico, as cisteíno proteases participam de processos fisiológicos e patológicos relevantes, como a degradação de hemoglobina, invasão de células hospedeiras e maturação de proteínas de superfície (LECAILLE; KALETA; BRÖMME, 2002). A papaína foi a primeira cisteíno protease a ser isolada e caracterizada, a partir do látex da *Carica papaya* (WALSH,

2015) e atualmente sabe-se que tanto ela quanto as catepsinas pertencem à maior família de cisteíno proteases.

Diversas cisteíno proteases de parasitas e vírus têm sido reconhecidas como alvos terapêuticos importantes em doenças graves como AIDS, câncer, doenças autoimunes e infecções parasitárias, incluindo malária, doença de Chagas, leishmaniose e tripanossomíase africana (GILLS et al., 2007; LECAILLE; KALETA; BRÖMME, 2002; SLOANE et al., 1990).

O sítio catalítico dessas enzimas é composto por uma tríade Cys–His–Asn, na qual a histidina atua como doadora de próton, promovendo a ativação nucleofílica do resíduo de cisteína. Este, por sua vez, ataca o carbono da ligação peptídica (ou do inibidor), formando um intermediário tioéster tetraédrico, com liberação da fração N-terminal do substrato (COULOMBE et al., 1996). Esse intermediário é estabilizado por pontes de hidrogênio no buraco oxiânion, frequentemente mediadas por um resíduo de glutamina conservado. A etapa seguinte envolve a hidrólise da ligação tioéster, liberando um fragmento carboxílico do substrato.

O principal desafio no desenvolvimento de inibidores seletivos de cisteíno proteases é a similaridade estrutural e mecanística com serino proteases. Apesar disso, embora as tríades catalíticas apresentem configurações espaciais semelhantes, estudos indicam que, nas serino proteases, o intermediário tetraédrico carregado e o buraco oxiânion são essenciais à catálise, enquanto nas cisteíno proteases, o intermediário acil mais neutro é o estado-chave estabilizado (LEUNG; ABBENANTE; FAIRLIE, 2000).

Adicionalmente, assim como as serino proteases, as cisteíno proteases possuem sítios ativos rasos e expostos ao solvente, o que permite a ligação de inibidores compostos por cadeias curtas, frequentemente equivalentes a até quatro resíduos de aminoácidos. Dada a semelhança estrutural e catalítica entre as proteases de serina e cisteína, e o comprovado potencial dos aceptores de Michael como inibidores de ambos os tipos enzimáticos, este trabalho também se propõe a estudar compostos α,β -insaturados derivados de carbonilas como candidatos à inibição de cisteíno proteases.

Na sequência, serão apresentadas as principais características de dois grupos de cisteíno proteases de interesse clínico avaliados neste estudo: as catepsinas humanas B e L, e a rodesaína, considerada o alvo mais promissor no desenvolvimento de fármacos contra o *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da tripanossomíase africana.

2.5.1 Catepsinas B e L

As catepsinas B e L são cisteíno proteases lisossomais pertencentes à família da papaína, envolvidas em processos fisiológicos como remodelação da matriz extracelular, apoptose, reabsorção óssea e autofagia (DELAISSÉ et al., 2000; SAUDENOVA et al., 2022). Ambas têm sido associadas a diversas doenças, como câncer, infecções, diabetes, aneurismas e fibroses (GOICHEVA et al., 2006; LIU et al., 2024).

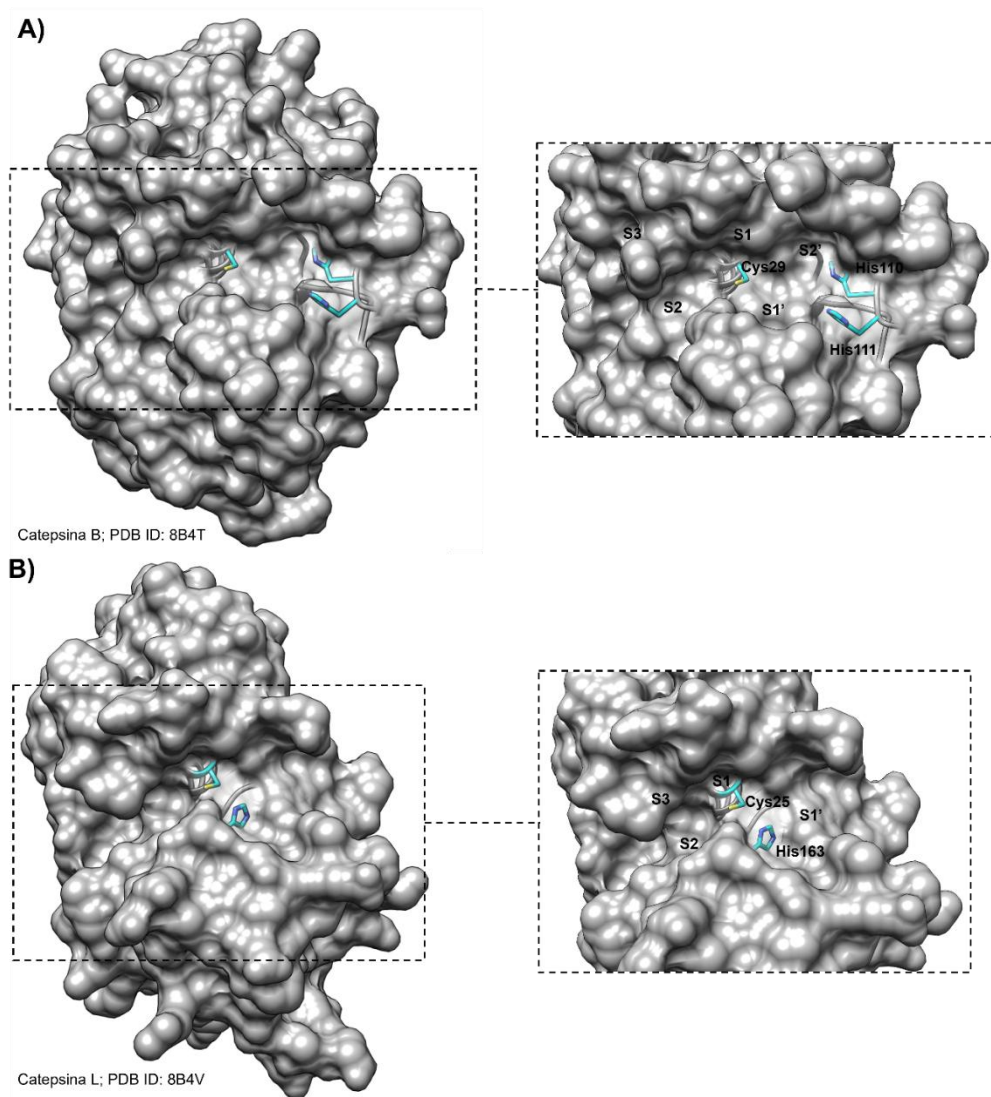
A catepsina B (CatB) participa da degradação lisossomal de proteínas intracelulares e fagocitadas, sendo regulada por inibidores endógenos como a cistatina. Sua superexpressão está associada à progressão tumoral, metástase e evasão de apoptose, além de estar presente em estágios avançados de cânceres como próstata, mama e colorretal (COULIBALY et al., 1999; FRIEDRICH et al., 1999). A catepsina L (CatL) atua na degradação de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular, especialmente na reabsorção óssea. Assim como a CatB, sua superexpressão está relacionada à invasão celular e metástase (GOICHEVA; JOYCE, 2007). Ambas são consideradas alvos viáveis para o desenvolvimento de agentes anticâncer.

Estruturalmente, a CatB é uma proteína bilobal (~30 kDa), com seu sítio catalítico localizado na interface entre os domínios esquerdo e direito (Figura 23A, página 56). O mecanismo catalítico envolve o resíduo Cys29, que ataca o carbono carbonílico do substrato e His199, que estabiliza o estado de transição (SCHECHTER; BERGER, 1967). A atividade da CatB varia conforme o pH: atua como exopeptidase em pH ácido (lisossomos) e como endopeptidase em pH neutro (meio extracelular) (MONTCOURRIER et al., 1994).

A CatL, por sua vez, é inicialmente sintetizada como uma proenzima, ativada em ambiente ácido por clivagem proteolítica (Figura 23B, página 56). Seu mecanismo catalítico é semelhante ao da CatB, com os resíduos Cys25 e His163

participando da catálise (SHENOY; SIVARAMAN, 2011). Dada sua importância fisiopatológica e estrutura catalítica semelhante à de outras cisteíno proteases, essas enzimas representam alvos estratégicos para o desenvolvimento de inibidores baseados em aceptores de Michael, com potencial aplicação em terapias anticâncer e antiparasitárias.

Figura 23. Estruturas tridimensionais das Catepsinas B e L. Destaque para os subsítios, os resíduos do sítio catalítico e os resíduos importantes para a interação com substratos. PDB ID: 8B4T e 8B4V.



Fonte: Autora, 2025.

2.5.2 Inibidores de Catepsinas B e L

Como muitas cisteíno proteases reconhecem substratos peptídicos, é comum utilizar a nomenclatura P (substrato) e S (enzima) para descrever suas

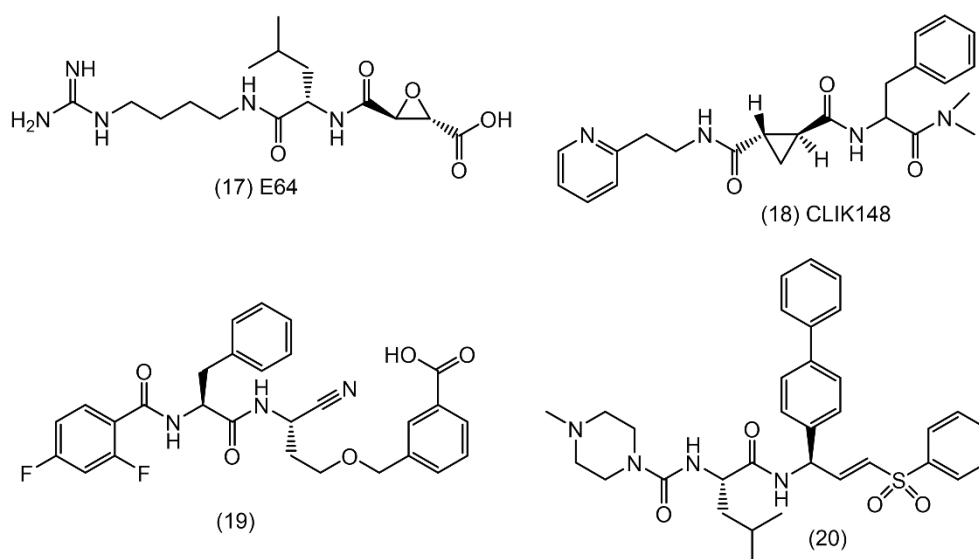
interações. Os resíduos do substrato são denominados P1, P2, P3, e os subsítios correspondentes no sítio ativo da enzima são S1, S2, S3, sendo S1 o mais relevante para a afinidade e especificidade. No caso das catepsinas, resíduos hidrofóbicos em S2 favorecem a inibição da CatB, enquanto resíduos aromáticos tendem a favorecer a CatL (FUSETANI et al., 1999).

Dada a participação da CatB na progressão tumoral, o desenvolvimento de inibidores tem sido intensamente explorado. Esses compostos geralmente contêm uma funcionalidade eletrofílica (*warhead*) que reage com Cys29 e possuem de 2 a 4 resíduos peptídicos. Um dos exemplos mais conhecidos é o E-64 (composto 17, Figura 24, página 58) isolado de *Aspergillus japonicus*, com ação irreversível sobre diversas cisteíno proteases (GOBEC; FRLAN, 2006). Desde então diversos outros derivados foram desenvolvidos, porém com pouca seletividade entre cisteíno proteases de diferentes tipos (BARRETT et al., 1982). Derivados mais seletivos, como CLIK148 (composto 18, Figura 24, página 58) apresentaram alta afinidade por CatL hepática, atribuída a interações no subsítio S2 e ao grupo piridina N-terminal (TSUGE et al., 1999).

Além dos epóxidos, inibidores nitrílicos também se mostraram eficazes. Sua inibição ocorre pela formação de um intermediário tioimidato, estabilizado pelo resíduo Gln19 no buraco oxianion (BRISSEON; CAREY; STORER, 1986). Destaque para os inibidores desenvolvidos por Greenspan et al., que, após otimização nas posições P3 e P2, obtiveram compostos nanomolares com interação no subsítio S2' de CatB, como o análogo 19 (Figura 24, página 58).

Outra classe promissora é a das vinil sulfonas, originalmente descritas como inibidores irreversíveis de catepsinas, mas com posterior identificação de caráter pan-inibidor (BRÖMME et al., 1996). No entanto, Mendieta et al. desenvolveram uma série de peptidil 3-aryl vinil sulfonas com modificações estratégicas, sendo o composto 20 (Figura 24, página 58) o mais potente e seletivo para CatL, com inibição em níveis nanomolares e potencial aplicação contra o câncer.

Figura 24. Estruturas de inibidores de CatB e L relatados.



Fonte: Autora, 2025.

2.5.3 Rodesaína de *T. brucei* e *T. gambiense*

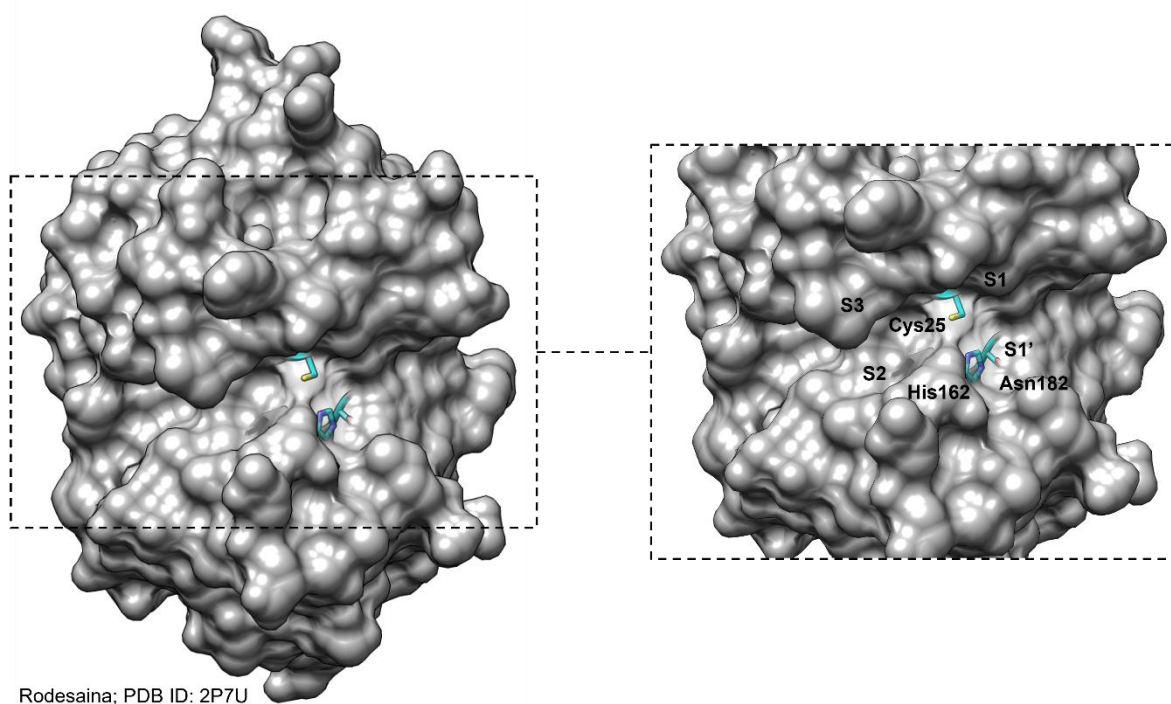
A tripanossomíase africana (HAT) é uma doença tropical negligenciada endêmica da África Subsaariana, causada por *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *T. brucei gambiense* (COX, 2004). A doença evolui em dois estágios: o inicial (hemolinfático), caracterizado por sintomas inespecíficos como febre e fadiga, e o tardio (neurológico), no qual o parasita invade o sistema nervoso central, levando a deterioração neurológica e morte se não tratada (KENNEDY, 2004). Os fármacos disponíveis, como suramina, pentamidina e melarsoprol, são antigos, tóxicos e fase-específicos (PÉPIN; MILORD, 1994).

Entre os alvos terapêuticos promissores estão proteases essenciais ao parasita, mas não indispensáveis ao hospedeiro, como as cisteíno proteases da família da papaína (ETTARI et al., 2013). Em *T. brucei*, a principal enzima desse grupo é a catepsina L, conhecida como rodesaína ou tripanopapaína-Tb, enquanto a catepsina B apresenta papel secundário (STEVERDING et al., 2012).

Dada a sua relevância funcional e papel chave na progressão para o estágio tardio da HAT, a rodesaína é um alvo terapêutico estratégico, e a inibição de sua atividade catalítica representa uma abordagem promissora no tratamento da tripanossomíase africana. A rodesaína é uma proteína de 215 aminoácidos com estrutura bilobal e tríade catalítica Cys25–His162–Asn182. O mecanismo de

catálise é semelhante ao de outras cisteíno proteases, envolvendo a conversão do grupo tiol de Cys25 em tiolato, estabilizado por interações com His162 e Asn182 (KERR et al., 2010). A enzima é considerada essencial para o parasita ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE) e causar a fase neurológica da infecção. Estudos demonstraram que a rodesaína facilita essa travessia ativando receptores acoplados à proteína Gq, como os receptores ativados por protease (PARs), em células endoteliais humanas (GRAB et al., 2009; LONSDALE-ECCLES; GRAB, 2002). Dada sua relevância funcional e papel-chave na progressão para o estágio tardio da HAT, a rodesaína é um alvo terapêutico estratégico, e a inibição de sua atividade catalítica representa uma abordagem promissora no tratamento da tripanossomíase africana.

Figura 25. Estrutura tridimensional da catepsina rodesaína de *T. brucei*. Destaque para os subsítios e resíduos pertencentes ao sítio catalítico.



Fonte: Autora, 2025.

2.5.4 Inibidores de rodesaína

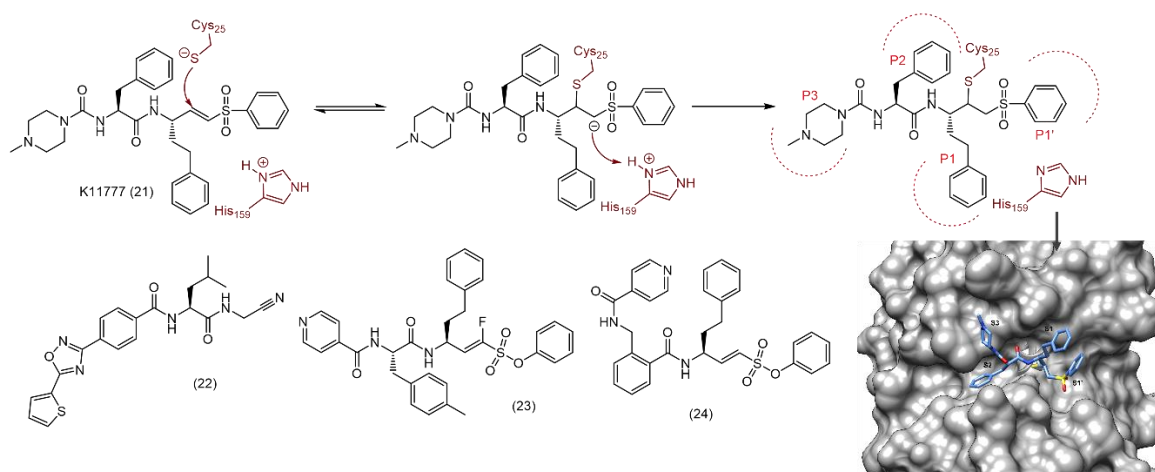
Devido à semelhança estrutural entre a rodesaína e as catepsinas humanas, classes químicas já exploradas contra outras cisteíno proteases também são promissoras como inibidores dessa enzima. Em geral, os inibidores de rodesaína são classificados como peptídicos, peptidomiméticos ou não peptídicos, e podem atuar de forma reversível ou irreversível. Dentre eles, os peptidomiméticos

destacam-se por combinarem um segmento de reconhecimento (similar a um peptídeo) com uma região *warhead*, geralmente reagente com o resíduo de cisteína do sítio ativo (ETTARI et al., 2013).

Diversas classes de *warheads* têm sido utilizadas, incluindo aldeídos, cetonas, nitrilas e epoxisuccinilas, no entanto, os mais estudados são os aceptores de Michael, especialmente os derivados de vinil sulfona. O inibidor mais conhecido é o K777 (ou K11777) (composto 21, Figura 26), que demonstrou alta seletividade por rodesaína. Estudos estruturais identificaram preferências por substituintes no sítio S1' (OPh > CH₂Ph > Ph) e tolerância a resíduos hidrofóbicos volumosos no S2, como leucina e fenilalanina, em virtude do ambiente hidrofóbico conferido pelo resíduo Leu67. O grupo morfolina em P3 também se mostrou importante por interações no sítio S3 (CAFFREY et al., 2001; KERR et al., 2009). O composto K777 apresentou perfil farmacocinético favorável e segurança pré-clínica em roedores, cães e primatas, sendo considerado um candidato promissor também para o tratamento da doença de Chagas (CLAYTON, 2010).

O grupo de Schirmeister expandiu o uso dessa classe, substituindo a vinil sulfona por uma nitrila, resultando no composto 22 (Figura 26, página 61), com Ki= 0,0092 µM contra rodesaína (SCHIRMEISTER et al., 2017). Em seguida, mantendo a vinil sulfona, identificaram o composto 23 (Figura 26, página 61) com afinidade nanomolar e alta seletividade em relação às catepsinas humanas CatB e CatL, além de apresentar boa absorção, distribuição e segurança em linhagens celulares (JUNG et al., 2021). Mais recentemente, uma abordagem de *design de novo*, baseada em triagem de fragmentos e *docking* molecular, levou à identificação do composto 24 (Figura 26, página 61) uma vinil sulfona com Ki = 9 nM e seletividade superior a 150 vezes para rodesaína comparada às catepsinas humanas.

Figura 26. Estrutura de inibidores de rodesaína citados (21-24) e provável mecanismo catalítico do composto K11777 demonstrando as interações potenciais com os subsítios. PDB ID: 2P7U.



Fonte: Autora, 2025.

2.6 Fundamentação da hipótese

Inspirados pelos resultados apresentados por Brem et al. (2014), pensamos em empregar a estrutura molecular de carbonilas α,β -insaturadas como ponto de partida para o desenvolvimento de novos inibidores de proteases. O composto inspiração (16, Figura 22, página 53) consiste em um derivado α -substituído por SH, o que nos levou a pensar que modificações desse grupo por outros também elétron retiradores, como CN e F, poderiam ser benéficas para a atividade inibitória.

Outro ponto de modificação potencial identificado é o carbono logo após ao carbono β . Nesse caso, poderia ser avaliado a tolerância de diferentes grupos aromáticos e não aromáticos nessa posição. Para isso, selecionamos todos os aldeídos presentes em nossa biblioteca de reagentes químicos apresentando grupos aromáticos, alifáticos e heteroátomos. Segundo o apresentado pelos trabalhos mencionados nos tópicos anteriores, essa região ligada diretamente ao *warhead* pode ser fundamental para a seletividade por determinada enzima.

Além disso, entendendo o potencial do estudo de compostos peptidomiméticos para a atividade inibitória das proteases mencionadas - como citado para os compostos 11, 12 (Figura 20), 14, 15 (Figura 21) e 21 (Figura 26) - percebemos que a inserção de um aminoácido adequado poderia atuar como uma unidade de reconhecimento dentro do sítio ativo, fazendo interações adjacentes ao resíduo catalítico. Sendo assim, a carbonila característica de compostos aceptores de Michael foi transformada em uma função amida, caracterizando a estrutura como uma acrilamida α,β -insaturada. Unindo essas características químicas

inerentes de diversos compostos comprovadamente ativos, a hipótese aqui apresentada caracteriza-se em apresentar acrilamidas α,β -insaturadas como aceptores de Michael capazes de inibir a atividade de proteases de alta relevância clínica.

A estratégia empregada nesse trabalho faz parte dos esforços de *Computer-Aided Drug Design* (Projeto de medicamentos assistido por computador), mais especificamente através da estratégia de triagem virtual por ancoragem molecular (ou *docking* molecular). O *docking* consiste em prever conformações de ligação e energias livres de ligação para ligantes (pequenas moléculas) a alvos macromoleculares (Fullerens, Graphenes and Nanotubes, 2018). É uma estratégia de triagem de compostos de baixo custo e que reduz substancialmente o tempo gasto com o desenvolvimento de compostos biologicamente ativos. Sendo assim, considerando a expertise do grupo de pesquisa, esse método foi empregado como base para a escolha dos compostos a serem sintetizados.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Aplicar estratégias de *docking* molecular em triagem virtual para a seleção de protótipos inibidores de proteases, com foco específico nas enzimas β -lactamase e rodesaína. Realizar a síntese, caracterização e avaliação biológica desses compostos por meio de ensaios de inibição enzimática e de crescimento bacteriano, com o intuito de identificar novos protótipos bioativos que possam servir como esqueleto-base para o desenvolvimento de candidatos a fármacos voltados à inibição da resistência bacteriana mediada por β -lactamases e à interrupção da infecção parasitária por *T. brucei*.

3.2 Objetivos Específicos

- Validar uma triagem virtual utilizando as estruturas cristalográficas das enzimas NDM-1, KPC-2 e rodesaína;
- Planejar, desenhar e realizar a triagem virtual de aproximadamente 1390 compostos pertencentes às classes de acrilamidas;
- Sintetizar os compostos selecionados como potenciais *hits*, com base nos resultados da triagem virtual;
- Avaliar a atividade inibitória enzimática dos compostos frente às enzimas catepsinas B e L, rodesaína e β -lactamases;
- Investigar o potencial de sinergismo dos compostos como adjuvantes de antibióticos frente a cepas bacterianas produtoras de β -lactamases.

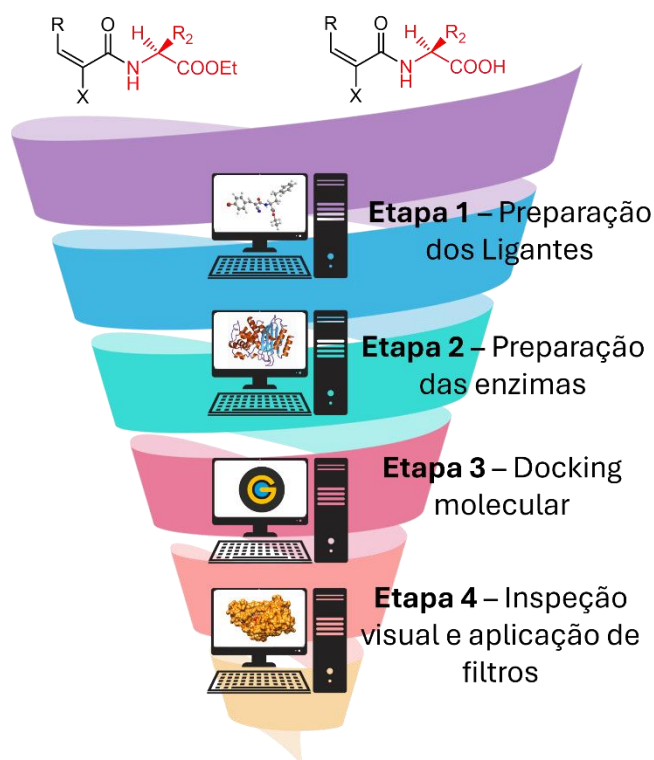
MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos, softwares e metodologia utilizados na triagem virtual

A triagem virtual foi realizada com o objetivo de identificar compostos potencialmente inibidores das proteases-alvo para posterior síntese e avaliação biológica. As etapas *in silico* foram divididas da seguinte maneira: (1) preparação dos ligantes, (2) seleção e preparação da enzima, (3) ensaios de *docking* molecular e (4) inspeção visual das interações entre os ligantes e aminoácidos específicos, coordenações com metais, bem como a análise das distâncias intermoleculares entre grupos funcionais ou átomos dos ligantes e resíduos específicos do sítio catalítico do alvo (Figura 27, página 66).

Figura 27. Fluxograma das etapas *in silico* de triagem virtual.



Fonte: Autora, 2025.

4.1.1. Especificações técnicas das estações de trabalho utilizadas nos testes *in silico* de triagem virtual e dinâmica molecular

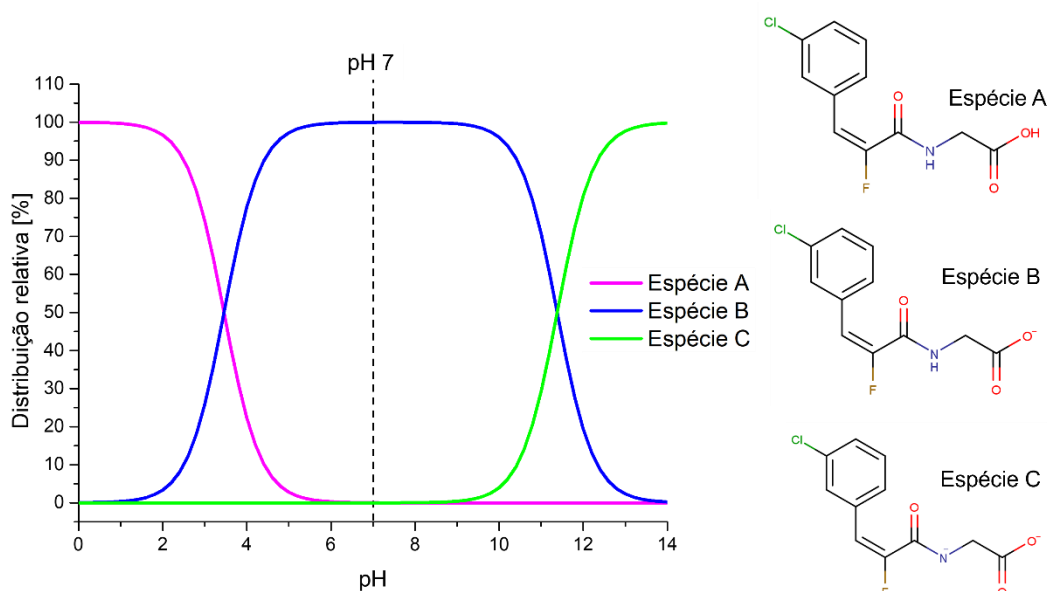
As especificações técnicas das estações de trabalho utilizadas nas etapas *in silico* (etapas 1-4) foram as seguintes: Processador Intel Core i5-10210U, RAM 8GB, placa de vídeo dedicada Geforce MX110 2GB.

Para os ensaios de dinâmica molecular, as seguintes especificações técnicas da estação de trabalho foram: Processador Intel Core i7-9700, RAM 16GB, placa de vídeo dedicada Geforce RTX2060 6GB.

4.1.2 Preparação dos ligantes

Inicialmente, as estruturas dos ligantes planejados foram desenhadas no *software* Chem3D 17.0 (PerkinElmer Informatics, Waltham, MA, EUA), as quais foram minimizadas usando o campo de força MM2 para garantir a precisão das geometrias e conectividades atômicas. Uma vez que outros ensaios discutidos na literatura comprovam a isomeria *E* para esses compostos, esta foi fixada e mantida. Adicionalmente, esta conformação foi também a mais favorável obtida após a minimização estrutural. Uma vez que os ensaios *in silico* devem mimetizar o máximo possível as condições biológicas, deve ser considerado que o pH do meio é 7, o que levaria a desprotonação da função ácida do ligante, como demonstrado no gráfico de distribuição relativa das espécies em função do pH (Figura 28, página 67). Com isso, a função ácida foi alterada para íon carboxilado (COO^-). Uma observação adicional, foi mantida a configuração *S* dos aminoácidos utilizados.

Figura 28. Distribuição relativa das espécies de um composto modelo em função do pH. Gráfico gerado a partir de dados do *software* MarvinSketch.



Fonte: Autora, 2025.

Posteriormente, as estruturas foram salvas no formato *.mol2, com cada molécula armazenada em um arquivo individual. Finalizado todo o processo de

desenho dos compostos, cada um deles foi submetido a otimização geométrica mais refinada, usando o método semiempírico AM1 (Austin Model 1) (ALLINGER, 1977; DEWAR et al., 1985), implementado no *software* Spartan '14 V1.1.4 (Wavefunction, Inc., Irvine, Califórnia, EUA). Esse método é particularmente eficiente para sistemas orgânicos, fornecendo uma boa relação entre precisão e custo computacional. As estruturas foram otimizadas até atingirem um gradiente de energia menor que 0,001 kcal/(mol·Å), garantindo que as conformações obtidas correspondessem a mínimos energéticos globais ou locais. Após a minimização, as estruturas foram analisadas visualmente para verificar a ausência de distorções geométricas e, então, salvas no formato *.mol2 para uso nas etapas subsequentes da triagem virtual.

4.1.3 Preparo e escolha da estrutura das enzimas alvo

4.1.3.1 Enzimas serino β -lactamase e metalo β -lactamase

O grupo de acrilamidas (**A**) foi investigado frente às enzimas serino β -lactamase (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase – KPC-2) e metalo β -lactamase (New Delhi metalo β -lactamase – NDM-1). Para a escolha das estruturas cristalinas, 17 estruturas de serino β -lactamase e 25 metalo β -lactamases foram selecionadas a partir da base de dados PDB (Protein Data Bank - <https://www.rcsb.org/>). Os critérios de escolha consistiram no tipo de enzima, a qual deveria ser do tipo KPC-2 e NDM-1, além de estarem complexadas com algum ligante em seu sítio ativo e apresentar resolução de até 2,5 Å.

O re-docking dos ligantes co-cristalizados foi realizado utilizando o *software* GOLD 2022.3.0 (Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC, Cambridge, Reino Unido, licença acadêmica). O ensaio de re-docking consiste em uma técnica utilizada para validar a precisão de um método de encaixe molecular, baseando-se nos resultados dos algoritmos de busca aplicados. Ele consiste em "redocar" um ligante no sítio ativo de uma proteína para verificar se o método de *docking* é capaz de reproduzir a conformação e a orientação observadas experimentalmente na estrutura cristalina da proteína. Dessa forma, após o *download* das estruturas cristalinas no formato *.pdb, os arquivos foram adicionados individualmente ao *software* GOLD. Então, as moléculas co-cristalizadas de água, íons, agentes precipitantes e cofatores foram removidas. O ligante co-cristalizado à proteína

também foi extraído, e salvo no formato *.mol2 para ser utilizado posteriormente no *re-docking*. Além disso, foram adicionados os átomos de hidrogênio da macromolécula, e o sítio de ligação foi definido como sendo o mesmo local onde encontrava-se o ligante co-cristalizado que foi previamente removido. Nas configurações, foram selecionadas as opções de gerar o maior número de soluções (máximo de 10) e a eficiência de busca foi ajustada para 200% (o programa realiza uma busca para encontrar as soluções, então, elas são reverificadas antes de serem escritas). O programa GOLD apresenta quatro algoritmos: ChemPLP, GoldScore, ChemScore e ASP. O ensaio de *re-docking* foi realizado para cada uma das proteínas em cada uma das funções de pontuação. Finalmente, o complexo com maior pontuação, dentre as 10 soluções geradas para cada análise, foi salvo no formato *.pdb. Ainda no programa GOLD, o complexo salvo foi aberto novamente, e o ligante foi extraído assim como no início do *re-docking*. O arquivo gerado foi salvo no formato *.mol2.

Finalmente, os arquivos do ligante nativo (co-cristalizado) antes e depois do *re-docking* foram sobrepostos utilizando o *software* PyMOL versão 0.99rc6 (Schrödinger, LLC, Nova York, EUA), fornecendo um valor do RMSD (do inglês *Root Mean Square Deviation*) de forma que, quanto menor o valor de RMSD, mais semelhante a conformação entre ambas, o que permitiu avaliar a capacidade do método em reproduzir o resultado observado. A partir desses resultados, foi construído um mapa de calor contendo os valores de RMSD de cada um dos ligantes. Adicionalmente, foi calculado o valor de média e somatório para cada algoritmo. O algoritmo escolhido foi aquele que apresentou menor valor de RMSD médio e consequentemente, de somatório. Adicionalmente, a enzima escolhida, foi aquela em que o valor de RMSD foi o menor entre todos os avaliados para aquele algoritmo.

4.1.3.2 Enzima rodesaína de *T. brucei rhodesiense*

A série de ésteres de acrilamidas (**B**) contendo o aminoácido homofenil alanina (HomoPhe), foi planejada para ser testada contra a cisteíno protease rodesaína, presente no parasita causador da tripanossomíase humana africana. A estrutura cristalina utilizada foi a de código PDB: 2P7U (JUNG et al., 2021; MÜLLER et al., 2023) com resolução de 1,65 Å, ligada ao inibidor K777, uma vinil sulfona de

destaque no desenvolvimento de novos inibidores (KERR et al., 2009). O mesmo processo para realização do ensaio de *re-docking* foi feito para esta cisteína protease.

4.1.4. Ensaios de docking molecular

Finalizada a escolha da enzima e a preparação dos ligantes a serem utilizados, os arquivos gerados foram levados ao ensaio *in silico* de docking molecular. O ensaio de *docking* também foi realizado no *software* GOLD 2022.3.0, sob o mesmo processo de configuração. Um ajuste manual foi feito no estado de protonação do principal resíduo catalítico da enzima SBL, Ser70. Uma vez que em meio biológico esse resíduo encontra-se desprotonado, o hidrogênio foi removido manualmente da estrutura e uma carga foi adicionada. O hidrogênio presente no grupo tiol catalítico da cisteína protease também foi removido. No *software* GOLD, o sítio de ligação foi definido de forma específica para cada enzima. Para a SBL, o centro da caixa de docking (10 Å) foi posicionado no resíduo Ser70. Na MBL e na rodesaína, a caixa de 10 Å foi centrada a partir das coordenadas do ligante nativo presente na estrutura cristalográfica. Para cada ligante avaliado, foram geradas dez poses de acoplamento, sendo apenas a de melhor pontuação retida para análise posterior.

Tabela 5. Resumo das configurações para os ensaios de triagem virtual.

Grupo e número de ligantes	Enzima testada	Sítio de ligação	Função de Pontuação
Acrilamidas (1.350 ligantes)	KPC-2 PDB ID: 6TD0	10 Å a partir do resíduo de Ser70	ChemScore
	NDM-1 PDB ID: 4EY2	10 Å a partir das coordenadas do ligante nativo	ChemPLP
Ésteres de acrilamidas (40 ligantes)	Rodesaína PDB ID: 2P7U	10 Å a partir das coordenadas do ligante nativo	ChemScore

Fonte: Autora, 2025.

4.1.5. Inspeção visual e aplicação de filtros

Após o *docking*, foi gerado um arquivo contendo os valores de pontuação dos complexos formados, os quais foram salvos no formato *.pdb e preparados para inspeção visual. A inspeção visual, bem como o cálculo de distâncias foi

realizado utilizando o *software* UCSF Chimera 1.15 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, Universidade da Califórnia, São Francisco, EUA). As distâncias foram calculadas em angstrom (Å) e tomaram como referência o carbono β dos ligantes e o oxigênio do resíduo de Ser70 para a enzima KPC-2 e o enxofre do resíduo de Cys25 para a enzima rodesaína. Em contrapartida, para a enzima NDM-1, a possibilidade de formação de complexo com os átomos de Zinco do sítio catalítico foi avaliada através da função "*Metal Geometry*" no *software* Chimera.

4.1.6. Ensaios de dinâmica molecular

Os ensaios de dinâmica molecular foram realizados utilizando o pacote de *software* Schrödinger (versão 2023-1, Schrödinger, LLC, Nova York, NY, EUA, 2023). A estrutura da proteína foi obtida a partir do arquivo de *docking* molecular gerado previamente no programa GOLD, onde a posição do ligante já estava definida. A proteína foi preparada utilizando o módulo *Protein Preparation Wizard* do Schrödinger. A estrutura da proteína foi alinhada utilizando a funcionalidade "*Align to*" e para evitar instabilidades decorrentes de cargas expostas nos terminais da proteína, a funcionalidade "*Cap termini*" foi ativada durante a preparação da estrutura. Adicionalmente, foi feita a reposição de átomos de hidrogênio; o ajuste do estado de protonação dos resíduos (considerando pH $7,0 \pm 2,0$); a otimização da orientação de grupos hidroxila e cadeias laterais e a minimização da energia da proteína utilizando o *force field* OPLS4. O ligante, cuja posição foi definida no ensaio de *docking* molecular anterior, foi mantido em sua conformação original. O sítio ativo foi definido com base na posição do ligante determinada no ensaio de *docking* molecular.

Os módulos *Protein Preparation Wizard* e *Desmond* foram utilizados para a preparação do sistema e simulação de dinâmica molecular, respectivamente. Na simulação de dinâmica molecular o sistema foi montado utilizando o módulo *System Builder*. A proteína foi solvatada em uma caixa de água de formato *triclinic* (modelo TIP3P). Íons foram adicionados para neutralizar o sistema e atingir uma concentração salina de 0,15 M de NaCl. A simulação de DM foi realizada por 100 ns utilizando o módulo *Desmond*.

A trajetória da simulação foi analisada utilizando ferramentas do *Desmond*, onde foram calculados parâmetros como (i) RMSD (*Root Mean Square Deviation*),

no intuito de se avaliar a estabilidade da proteína e do ligante, (ii) RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), para identificar regiões da proteína com maior flexibilidade, e (iii) Distâncias interatômicas, para monitorar interações específicas entre o ligante e resíduos do sítio ativo.

As interações proteína-ligante foram analisadas utilizando o módulo *Simulation Interaction Diagram* do Schrödinger. Foram identificadas interações como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações iônicas. A convergência da simulação foi verificada através da estabilização do RMSD e da energia potencial do sistema.

4.2 Caracterização estrutural e determinação de propriedades físico-químicas

4.2.1 Ensaios de ponto de fusão

A determinação dos pontos de fusão das amostras foi realizada utilizando-se um fusômetro digital MICROQUÍMICA®, modelo MQAPF-302. As análises foram conduzidas com base nas instruções do fabricante, empregando lamínulas de vidro para o acondicionamento das amostras. A taxa de aquecimento foi ajustada de acordo com a faixa estimada de fusão, mantendo-se geralmente entre 2 e 3 °C/min nas proximidades do ponto de fusão, de modo a garantir maior precisão nos valores obtidos. A observação do início e término da fusão foi feita visualmente, com o auxílio da lente de aumento e da iluminação embutida no próprio equipamento. Embora os experimentos tenham sido conduzidos de maneira padronizada, o equipamento utilizado não passou por calibração prévia recente, sendo portanto, os dados obtidos considerados para fins comparativos entre as amostras sob as mesmas condições experimentais.

4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia em coluna *flash*

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de Sílica Gel 60 F254 (MERCK®) de 0,25 mm de espessura, reveladas por luz emissora de radiação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm. A purificação dos intermediários e compostos finais foi realizada por meio de cromatografia em coluna *flash*, utilizando colunas pré compactadas do tipo Simply connect BS-SUP (20-40 µm).

4.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C e ^1H)

Os espectros de RMN 1D e 2D (^1H , ^{13}C , HSQC) foram obtidos em equipamentos *Brüker*[®], modelos *avance DRX 600 MHz* e *400 MHz – UltraShield*[®], utilizando DMSO- d_6 , Acetona- d_6 , CDCl_3 e MeOD como solventes deuterados. Os deslocamentos químicos (δ) foram computados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram computadas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram instituídas da seguinte maneira: simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q) e multiplete (m).

4.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise de cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em dois equipamentos diferentes. Pensando na organização dos resultados, o primeiro equipamento será identificado como **Método A** e o segundo como **Método B**, e assim serão identificados no texto.

Método A: Os experimentos de CLAE foram conduzidos em um sistema UFLC (*Ultra-Fast Liquid Chromatography*) da Shimadzu Corporation. O equipamento é composto pelos seguintes módulos principais: duas bombas de propulsão binária, injetor automático, forno para coluna, detector de arranjo de diodos (DAD-UV) e módulo de comunicação. A aquisição e o tratamento dos dados cromatográficos foram realizados por meio de um *software* dedicado fornecido pelo fabricante. Para garantir a comparabilidade dos tempos de retenção entre diferentes amostras, a mesma metodologia de coleta de dados foi aplicada em todas as corridas cromatográficas.

A coluna cromatográfica utilizada foi a Kinetex 5 μm C18 100Å, com dimensões de 250 x 4,6 mm, fabricada pela Phenomenex[®]. A temperatura da coluna foi mantida em 40°C durante a análise. A fase móvel utilizada é composta por acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) grau HPLC (alta pureza para cromatografia líquida). O fluxo da fase móvel é de 0,2 mL/min com gradiente de eluição programado da seguinte forma: 0,01 min: 30% ACN e 70% MeOH; 10 min: 10% ACN e 90% MeOH; 15 min: 10% ACN e 90% MeOH (mantido até o final da análise); 15 min: parada do gradiente.

Método B: O segundo ensaio de CLAE foi realizado em um sistema da Shimadzu Corporation L201550[®]. O equipamento é composto por uma coluna de

fase reversa C-18 Supelco Discovery®, com dimensões de 25 cm x 4,6 mm e partículas de 5 µM. A fase móvel utilizada foi MeOH 100% ou MeOH:Ácido Fórmico 0,1%. O volume de injeção foi de 5 µL, com fluxo de 0,6 mL/min e pressão de 69 Kgf/cm², sob gradiente de eluição constante. A aquisição e o tratamento dos dados cromatográficos foram realizados por meio de um *software* dedicado fornecido pelo fabricante. Para garantir a comparabilidade dos tempos de retenção entre diferentes amostras, a mesma metodologia de coleta de dados foi aplicada em todas as corridas cromatográficas.

4.2.5 Espectrometria de Massas (LC-MS)

A análise de espectrometria de massas foi realizada em dois equipamentos diferentes. Pensando na organização dos resultados, o primeiro equipamento será identificado como **Método A** e o segundo como **Método B**, e assim serão identificados no texto.

O equipamento utilizado para o **método A** consistiu na utilização de um sistema LC-MS composto por um HPLC Agilent série 1100 acoplado a uma coluna Agilent Poroshell 120 EC-C18 com dimensões de 150 × 2,10 mm e partículas de 4 µm. A fase móvel utilizada representa uma mistura de 80% de acetonitrila, 10% de água e 10% de uma solução de ácido fórmico a 0,1% em água. O ácido fórmico foi adicionado como modificador de fase móvel para melhorar a ionização no modo ESI (Eletro spray). A detecção foi realizada em um comprimento de onda de 254 nm. A massa molecular dos compostos foi determinada utilizando uma armadilha LC/MSD Agilent série 1100, com ionização por Eletrospray (ESI) operando no modo positivo ou negativo, dependendo do caso.

O segundo equipamento (**Método B**) consistiu em um sistema de cromatografia líquida de ultra performance Waters Acquity Arc (MA, EUA) interligado com um espectrômetro de massa do tipo quadrupolo simples e equipado com ionização por *eletrospray* operado no modo de ionização negativa. Os analitos foram preparados sob a dissolução em ACN grau LC-MS. A cromatografia foi realizada em colunas Acquity UPLC BEH C18 (2,1 mm × 5,1 mm e 1,7 µm de tamanho de partícula). A separação foi feita utilizando uma fase móvel formada por acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (90:10, v/v) (fase móvel A) e água ultrapura em ácido fórmico 0,1% (fase móvel B) em modo gradiente a uma taxa de fluxo de 1,0

mL/min por 15 minutos. A coluna foi mantida a 40 °C e a pressão do sistema foi de 8.000 psi. Os parâmetros dependentes da fonte mantidos para os analitos foram tensão capilar: 0,8 kV e tensão do cone: 15 V. A detecção dos íons foi realizada no modo *Selected Ion Recording* (SIR). O software Empower® versão 3 foi usado para controlar todos os parâmetros de UPLC e MS.

4.3 Reagentes, solventes e equipamentos utilizados na síntese

Os reagentes utilizados na síntese foram dos fabricantes *Sigma-Aldrich*® e *BLDParmatech*® (Grau de pureza ≥99%). Os solventes utilizados foram padrão P.A. (para análise) dos fabricantes Synth, Êxodo ou *Sigma-Aldrich*®.

REAGENTES	
1-Naftaldeído	Cianoacetato de etila
2-Naftaldeído	Trietilamina (Et ₃ N)
4-Bromobenzaldeído	Hidróxido de Sódio
4-Flúorbenzaldeído	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio tetrafluoroborato (TBTU)
2,3-Diclorobenzaldeído	N,N-diisopropiletilamina (DIPEA)
3,5-Diclorobenzaldeído	Hidróxido de Lítio (LiOH)
3-Clorobenzaldeído	Acetato de Sódio (AcONa)
2-Clorobenzaldeído	Bissulfato de potássio (KHSO ₄)
2,6-Diclorobenzaldeído	Ácido Clorídrico (HCl)
2,4-Diclorobenzaldeído	Trietil 2-fluoro-2-fosfoacetato
2,3,6-Diclorobenzaldeído	Hidreto de sódio 60% óleo mineral (NaH)
m-Anisaldeído	Glicina etil éster hidrociorada
o-Anisaldeído	H-Gly-OEt.HCl
p-Anisaldeído	H-Phe-OMe.HCl
Salicilaldeído	H-Ala-OMe.HCl
5-Bromoindol-3-carbaldeído	Etil L-triptofanato.HCl
4-metoxi-3-metilbenzaldeído	H-HoPhe-OEt.HCl
2-Tiazolcarboxaldeído	Rodanina
4-piridina carbaldeído	Ácido 5-fenil-2,4-pentadienoico
3-tiofeno carbaldeído	2-bromo benzaldeído
imidazol-4-carbaldeído	3-metil tiofeno-2-benzaldeído
3-fenil propanal	2,4-dimetoxi benzaldeído
quinolina-2-carbaldeído	4-formil benzo nitrila
4-bromo benzaldeído	3-piridina benzaldeído
4-bromotiofeno-2-carbaldeído	3-hidroxi-4-metoxi benzaldeído

SOLVENTES

Acetato de Etila absoluto (AcOEt)	Hexano absoluto (Hex)
Metanol absoluto (MeOH)	Água destilada
Etanol absoluto (EtOH)	Ciclohexano absoluto (CyHex)
Ácido acético glacial (AcOH)	Tetrahidrofurano (THF)
Diclorometano (DCM)	

EQUIPAMENTOS

Balança analítica (*Shimadzu/ATY224*)
 Bomba de vácuo (*Suryha*)
 Vidrarias de laboratório (*SkyLab*)
 Evaporador rotativo (*IKA® / Hb10 Digital*)
 Estufa (*Nova ética/ 404/1D*)
 Capela com exaustão (*Lucadema*)
 Placas de agitação e aquecimento (*IKA/ C-MAG HS7*)

4.4 Ensaios de inibição enzimática

4.4.1 Ensaios de triagem com cisteíno proteases Catepsina B, L e rodesaína

As atividades inibitórias dos compostos frente às proteases foram avaliadas por ensaios cinéticos utilizando substratos fluorogênicos ou colorimétricos. Os substratos e compostos foram preparados como soluções estoque de 20 mM em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em tampão apropriado para obtenção das concentrações finais desejadas. As soluções de estoque das enzimas foram preparadas nas seguintes concentrações: Catepsinas: 0,2 U/mL; Rodesaína: 2mg/mL.

Os ensaios frente catepsinas B e L, e rodesaína foram conduzidos em placas de 96 poços, brancas e de fundo plano (Greiner Bio-One), utilizando um leitor de microplacas Tecan Infinite F200 Pro (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suíça). Cada poço continha um volume total de 200 µL, composto por:

- 180 µL de tampão de ensaio adequado à enzima avaliada (descrito abaixo);
- 10 µL da solução da amostra com concentração final de 20 µM (previamente preparada com DMSO) ou solução de DMSO como controle negativo;
- 5 µL de solução estoque do substrato fluorogênico, Z-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina (Bachem), em DMSO;
- 5 µL de solução enzimática previamente diluída em tampão.

Enzima - Diluição	Tampão	Conc. substrato
Catepsina B - fígado humano (Calbiochem) – 1:100	50 mM Tris; 2 mM DTT; 5 mM EDTA; 200 mM NaCl (pH 6,5)	100 µM
Catepsina L - Paramecium humano (Calbiochem) – 1:25	50 mM Tris; 2 mM DTT; 5 mM EDTA; 200 mM NaCl (pH 6,5)	6,25 µM
Rodesaína – 1:150	50 mM Acetato; 5 mM DTT; 5 mM EDTA; 200 mM NaCl (pH 5,5)	10 µM

DTT: 1,4-ditiotreitol; EDTA: ácido etilenodiamino-tetraacético;

As medições de fluorescência foram realizadas em duplicata, com leitura a cada 30 segundos, por um período total de 10 minutos, a 25 °C. Os comprimentos de onda utilizados para excitação e emissão da fluorescência foram $\lambda_{ex} = 380$ nm e $\lambda_{em} = 460$ nm, respectivamente. A porcentagem de inibição foi determinada com base na diferença entre a atividade enzimática na presença e na ausência do inibidor, corrigida pela fluorescência de fundo (branco). O cálculo foi realizado conforme a seguinte equação:

$$\%Inibição = \left(1 - \frac{FL \text{ com inibidor} - FL \text{ branco}}{FL \text{ controle negativo} - FL \text{ branco}} \right) \times 100$$

Onde:

- FL com inibidor representa a fluorescência da amostra contendo o inibidor;
- FL controle é a fluorescência da amostra contendo apenas a enzima (controle negativo);
- FL branco corresponde à fluorescência de fundo, proveniente de poços contendo todos os componentes do ensaio, exceto a enzima.

4.4.2 Ensaio frente serino β -lactamase

A inibição da β -lactamase foi avaliada utilizando o *kit* comercial MAK222 (Sigma-Aldrich), baseado na hidrólise da cefalosporina cromogênica Nitrocefina. As reações foram conduzidas em duplicatas em placas de 96 poços transparentes e de fundo plano (Greiner Bio-One), e a absorbância foi monitorada utilizando o leitor

de microplacas Tecan Spark 10M (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suíça). Cada poço continha um volume total de 100 µL, composto por:

- 20 µL da solução da amostra, concentração final de 1mM (previamente diluída em DMSO) ou solução de DMSO como controle negativo ou solução de ácido clavulânico como controle positivo (concentração final de 200 µM);
Obs.: A concentração de DMSO final permaneceu 5% obedecendo instruções do fabricante.
- 30 µL de substrato (Nitrocefina) diluído em tampão fornecido no *kit* (concentração não especificada);
- 50 µL de solução enzimática preparada em tampão fornecido no *kit* (concentração não especificada);

A determinação da concentração inibitória média (IC₅₀) dos compostos foi realizada sob as mesmas condições experimentais estabelecidas para o ensaio de triagem preliminar. Os compostos foram testados em duplicata em uma curva de concentração composta por sete pontos: 5, 2, 1, 0,75, 0,5, 0,25 e 0,125 mM. Foi utilizado DMSO como veículo, mantendo sua concentração final inferior a 5% (v/v) em todos os poços. As soluções foram preparadas a partir de diluições seriadas da amostra estoque em DMSO, seguidas de diluição em tampão apropriado. A porcentagem de inibição da atividade enzimática foi calculada com base na fluorescência, comparando-se os sinais obtidos nos poços contendo inibidor com o controle negativo (enzima sem inibidor). Os dados foram analisados por meio de regressão não linear com ajuste de curva sigmoideal para determinação da IC₅₀.

A absorbância foi monitorada a cada 1 minuto, por um total de 15 minutos, a 25 °C, com detecção de λ_{abs} = 490 nm. A porcentagem de inibição foi determinada com base na diferença entre a atividade enzimática na presença e na ausência do inibidor, corrigida pela fluorescência de fundo (branco). O cálculo foi realizado conforme a seguinte equação:

$$\%Inibição = \left(1 - \frac{FL \text{ com inibidor} - FL \text{ branco}}{FL \text{ controle negativo} - FL \text{ branco}}\right) \times 100$$

Onde:

- FL com inibidor representa a fluorescência da amostra contendo o inibidor;

- FL controle é a fluorescência da amostra contendo apenas a enzima (controle negativo);
- FL branco corresponde à fluorescência de fundo, proveniente de poços contendo todos os componentes do ensaio, exceto a enzima.

4.4.3 Ensaaios com serino protease tripsina

Os ensaios contra tripsina foram conduzidos em placas de 96 poços, brancas e de fundo plano (Greiner Bio-One), utilizando um leitor de microplacas Tecan Infinite F200 Pro (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suíça). As concentrações de estoque dos compostos testados foram de 20 mM e da enzima 1 mg/mL.

Cada poço continha um volume total de 200 μ L, composto por:

- 180 μ L de tampão TRIS 50 mM (pH 7,4);
- 10 μ L da solução da amostra concentração final de 20 μ M (previamente preparada com DMSO) ou solução de DMSO como controle negativo;
- 5 μ L de solução estoque do substrato fluorogênico, de concentração 85 μ M Boc-Leu-Arg-Arg-7-amino-4-metilcumarina, HCl (Bachem), em DMSO;
- 5 μ L de solução enzimática previamente diluída em tampão (diluição 1:300).

A determinação da IC₅₀ foi realizada utilizando o mesmo protocolo descrito para o ensaio de triagem. O ensaio foi conduzido em placas brancas de 96 poços, adequadas para detecção por fluorescência. Os compostos foram avaliados em duplicata em uma curva de concentração composta por sete pontos: 100, 50, 20, 10, 5, 2 e 0,5 μ M. As soluções foram preparadas por diluições seriadas a partir de uma solução estoque, dissolvida inicialmente em DMSO. A porcentagem de inibição foi calculada com base na fluorescência relativa em comparação ao controle negativo (enzima ativa sem inibidor). Os dados obtidos foram submetidos à análise por regressão não linear, com ajuste de curva sigmoideal, para a determinação da IC₅₀.

As medições de fluorescência foram realizadas em duplicata, com leitura a cada 30 segundos, por um período total de 10 minutos, a 25 °C. Os comprimentos de onda utilizados para excitação e emissão da fluorescência foram λ_{ex} = 380 nm e λ_{em} = 460 nm, respectivamente. A porcentagem de inibição foi determinada com

base na diferença entre a atividade enzimática na presença e na ausência do inibidor, corrigida pela fluorescência de fundo (branco). O cálculo foi realizado conforme a seguinte equação:

$$\%Inibição = \left(1 - \frac{FL \text{ com inibidor} - FL \text{ branco}}{FL \text{ controle negativo} - FL \text{ branco}}\right) \times 100$$

Onde:

- FL com inibidor representa a fluorescência da amostra contendo o inibidor;
- FL controle é a fluorescência da amostra contendo apenas a enzima (controle negativo);
- FL branco corresponde à fluorescência de fundo, proveniente de poços contendo todos os componentes do ensaio, exceto a enzima.

4.5 Ensaios de atividade antibacteriana e sinergismo com antibióticos β -lactâmicos (cefalosporinas, carbapenêmicos e penicilinas) e polipeptídicos (polimixina B) frente a cepas gram-negativas produtoras de β -lactamases

4.5.1 Soluções estoque das amostras teste e antibióticos

As amostras de teste foram solubilizadas em DMSO para a obtenção de soluções estoque com concentrações de 25.600 $\mu\text{g/mL}$ (ácidos acrílicos), 10.000 $\mu\text{g/mL}$ (acrilamidas) e 5.000 $\mu\text{g/mL}$ (derivados de rodanina). Para garantir que a concentração final de DMSO nas diluições de teste permanecesse inferior a 1%, as soluções de estoque foram diluídas em água estéril na preparação de soluções intermediárias com concentrações de 512 $\mu\text{g/mL}$ (ácidos acrílicos), 1.024 $\mu\text{g/mL}$ (acrilamidas ácidas) e 256 $\mu\text{g/mL}$ (derivados de rodanina). Essas soluções intermediárias foram, então, diluídas conforme necessário para gerar as soluções de trabalho utilizadas nos experimentos.

Os antibióticos utilizados nos ensaios de sinergismo incluíram: Ceftriaxona dissódica (Lote: 96260058) e Meropenem tri-hidratado (Lote: LRAD1014), adquiridos da Teuto Brasileiro S/A (Distrito Agroindustrial de Anápolis – DAIA, Goiás, Brasil). Ampicilina (Lote: 101373318) e solução de Polimixina B (Lote: BCCG2613), fornecidas pela Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). As soluções foram preparadas seguindo rigorosamente as instruções dos fabricantes.

4.5.2 Cepas bacterianas analisadas

Foram utilizadas cepas bacterianas pertencentes aos grupos A, B e D, conforme a classificação proposta por Ambler (AMBLER, 1980). Para representar o grupo A, foi utilizada a cepa *Klebsiella pneumoniae* KPC P15-ST11, isolada por Silva et al. (2020). A cepa representativa do grupo B foi a *K. pneumoniae* produtora de metalo-β-lactamase do tipo New Delhi (NDM) identificada como 86.009. Por fim, a classe D foi representada por uma cepa de *Acinetobacter baumannii* portadora do gene de resistência OXA-58, designada pelo número 103.

A cepa bacteriana foi ajustada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland, utilizando espectrofotometria (faixa de absorbância: 0,08–0,13). Em seguida, realizou-se uma diluição 100 vezes em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), obtendo-se uma concentração final de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro).

4.5.3 Procedimento de avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços (KASVI), utilizando caldo BHI como meio de cultura, conforme protocolo descrito por Vasconcelos et al., (2020). As amostras de teste foram mantidas na concentração de 256 µg/mL, enquanto os antibióticos (Ceftriaxona, Meropenem, Ampicilina e Polimixina B) foram submetidos a diluição seriada em base 2, variando de 256 µg/mL até 2 µg/mL.

Como controle experimental positivo foi utilizada a cultura bacteriana em caldo BHI e o controle negativo, caldo BHI estéril. A inibição do crescimento bacteriano foi avaliada após 24 horas de incubação mediante determinação da densidade óptica (DO595) no espectrofotômetro de microplacas iMark™ (Bio-Rad), utilizando comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram quantificados aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição de crescimento (\%)} = \frac{DO \text{ controle positivo} - DO \text{ tratamento}}{DO \text{ controle positivo}} \times 100$$

4.5.4 Ensaio de sinergismo pelo método *checkerboard*

A sinergia entre os compostos testados e os antibióticos foi avaliada mediante o ensaio *checkerboard*, utilizando concentrações baseadas nos valores de CIM

previamente determinados. As combinações foram feitas nas seguintes proporções:

- Concentração fixa de 64 µg/mL para todas as amostras e antibióticos (ceftriaxona, ampicilina e polimixina B);
- Concentrações variáveis de meropenem: 16 µg/mL para cepa NDM; 8 µg/mL para Kp15; 4 µg/mL para Ac103.

Estas concentrações corresponderam a $\frac{1}{4}$ dos valores de CIM obtidos nos ensaios preliminares, visando alcançar um Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI) de 0,5, conforme metodologia validada por Sturaro et al., 2024.

As combinações foram preparadas em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços contendo caldo BHI. Após a adição do inóculo padronizado, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Os controles utilizados foram os mesmos empregados na avaliação da atividade antimicrobiana, conforme descrito no tópico anterior. As curvas de crescimento foram obtidas por espectrofotometria (595 nm), realizando leituras nos tempos de 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h e 24h, utilizando o leitor de microplacas iMark™ (Bio-Rad).

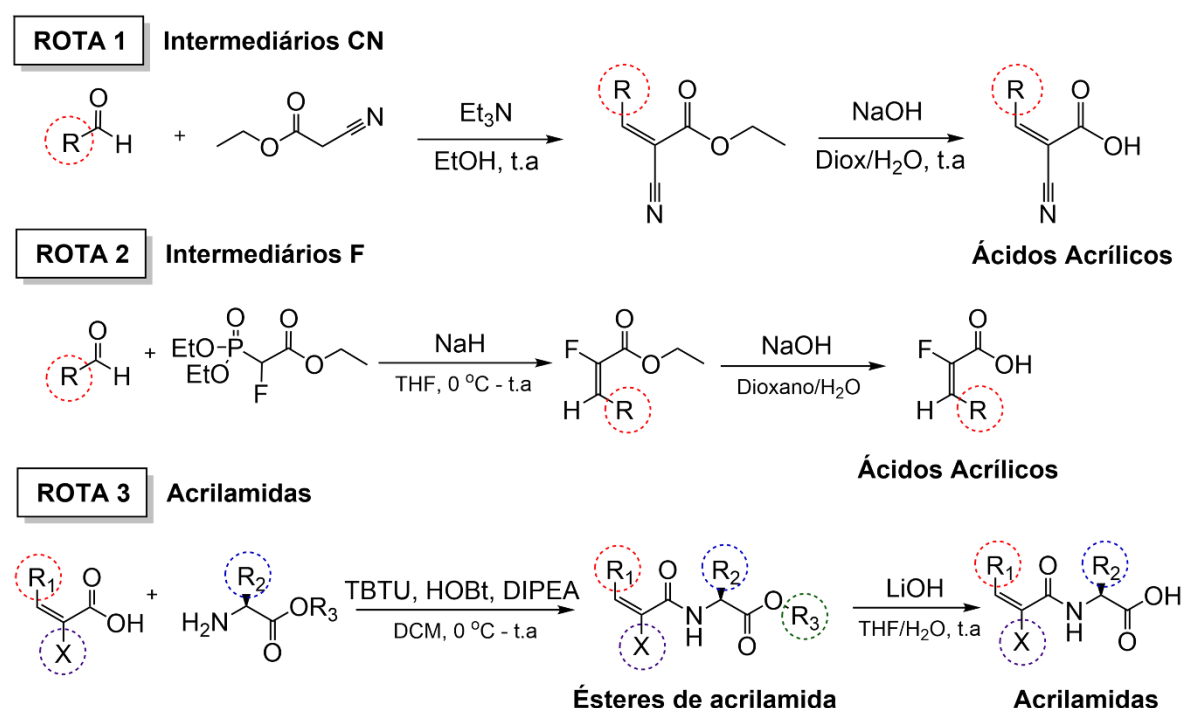
4.6 Planejamento para a síntese

Após a seleção dos compostos potencialmente ativos por triagem virtual, eles foram sintetizados através de uma síntese linear que envolveu reações já descritas na literatura. O grupo de ácidos acrílicos foi sintetizado como intermediário para os derivados acrilamidas. Os ácidos acrílicos α -substituídos por um grupo ciano foram obtidos empregando reações de condensação de Knoevenagel em que foram utilizados aldeídos aromáticos e o reagente cianoacetato de etila (KOLAHDOOZAN et al., 2013). O produto formado, um éster acrílico, foi submetido a hidrólise básica (Rota 1, Esquema 1). O grupo de ácidos acrílicos α -substituídos por flúor utilizou como reagente principal o trietil 2-fluoro-2-fosfoacetato, reagente utilizado em reações de Horner–Wadsworth–Emmons (HWE). Assim como as reações de Knoevenagel, o produto formado foi um éster acrílico que também foi submetido a hidrólise básica (Rota 2, Esquema 1).

Finalmente, os dois grupos de ácidos acrílicos foram submetidos a uma reação de acoplamento de amida utilizando agentes de acoplamento (FUCHS et al., 2023). Estes agentes, TBTU e HOBt, foram combinados à base DIPEA e a

diferentes amino-ésteres previamente selecionados (glicina, alanina, fenil alanina, triptofano e homo fenil alanina) para promover o acoplamento com os ácidos acrílicos intermediários obtidos anteriormente (Rota 3, Esquema 1). O primeiro produto obtido foi um éster acrilamida. Para a série contendo o aminoácido HomoPhe, o éster etílico foi mantido na estrutura, mas para a série contendo os demais aminoácidos, todos os intermediários foram submetidos a hidrólise básica com hidróxido de lítio, resultado em acrilamidas com a função ácida conservada.

Esquema 1. Rotas de síntese para ácidos acrílicos intermediários (Rota 1 e 2) e acrilamidas (Rota 3). Destacados, R e X indicam grupos que diferenciam os compostos de cada série.

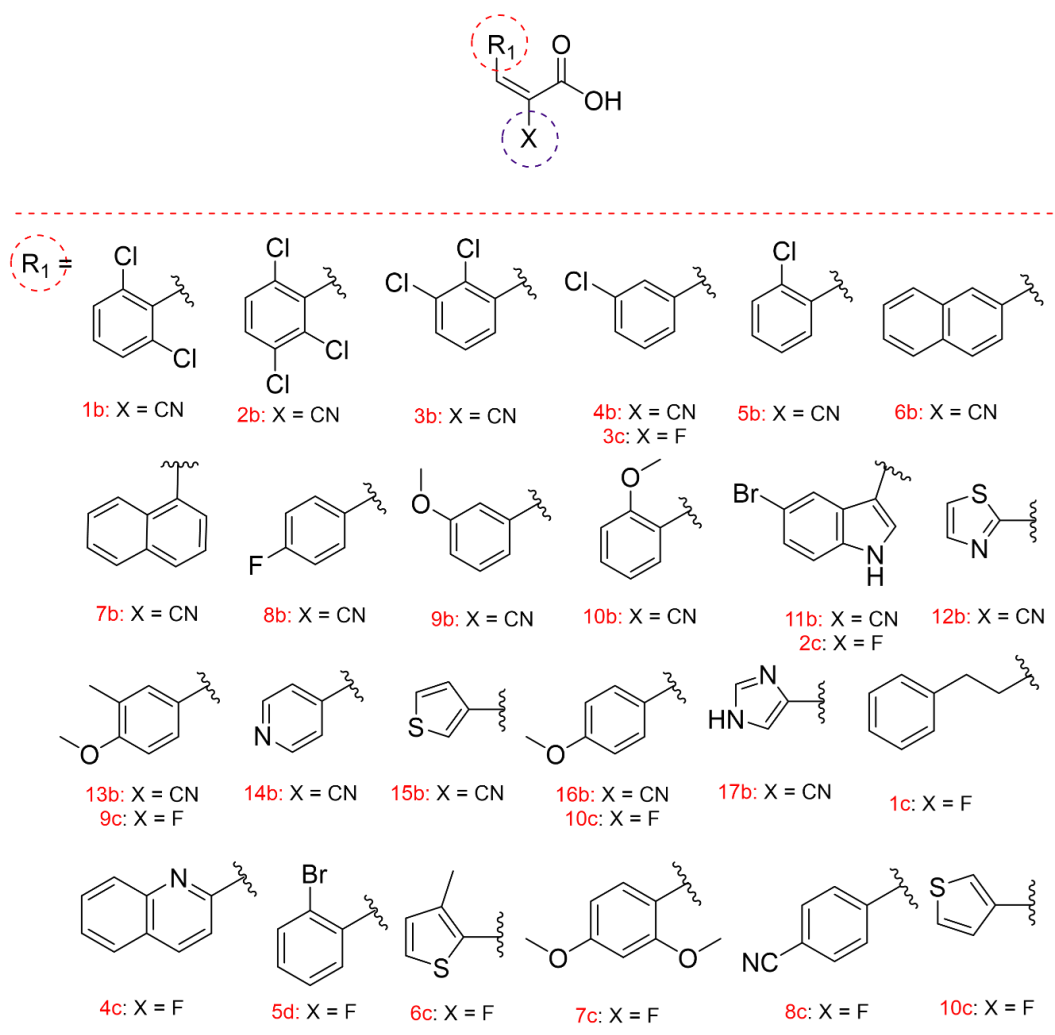


Fonte: Autora, 2025.

4.7 Procedimento experimental para síntese dos compostos planejados

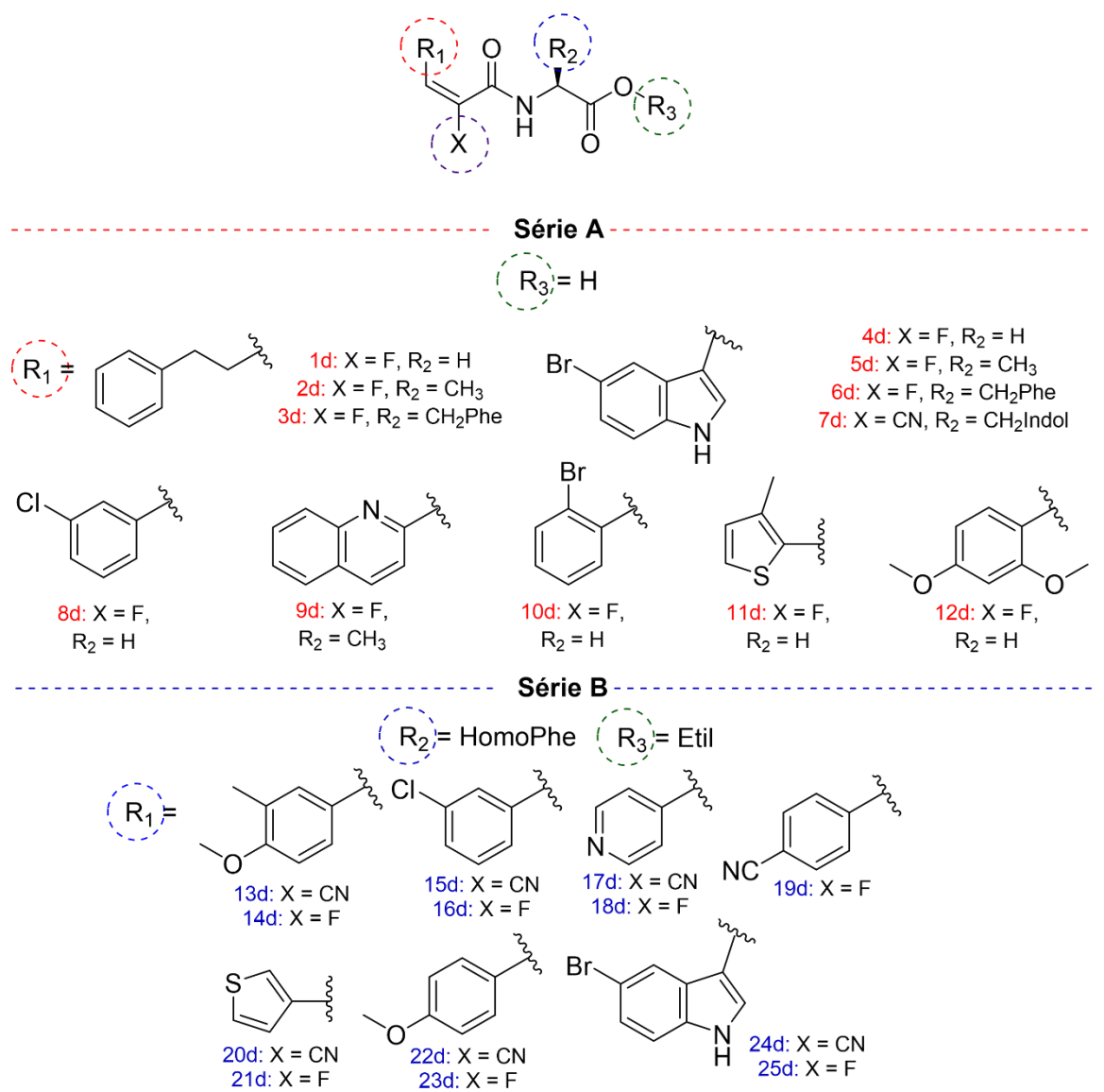
O procedimento individual de síntese de todos os compostos será descrito nos tópicos subsequentes. As figuras 29 e 30 resumem todas as estruturas sintetizadas e suas respectivas identificações.

Figura 29. Estrutura geral e código de todos os ácidos acrílicos sintetizados (intermediários).



Fonte: Autora, 2025.

Figura 30. Estrutura geral e código de todas as acrilamidas sintetizadas (compostos aprovados na triagem).

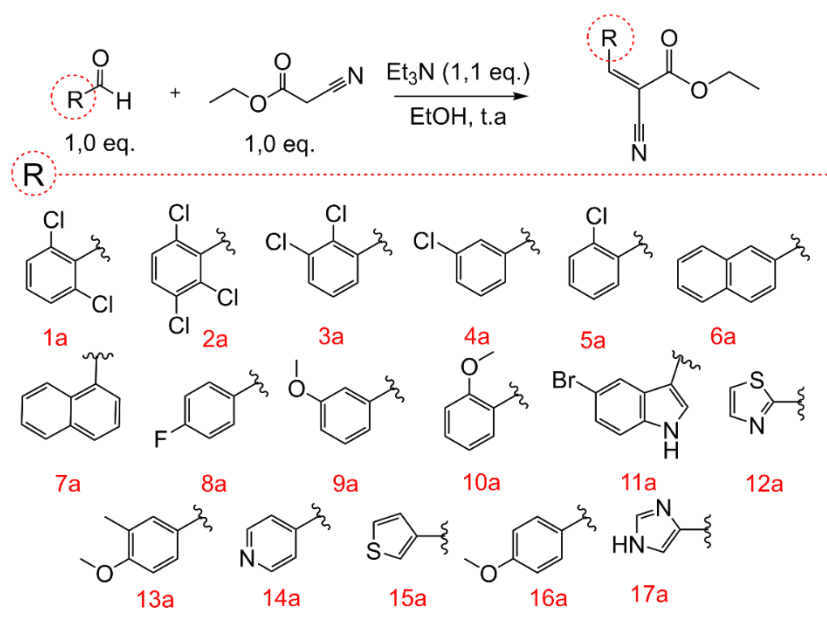


Fonte: Autora, 2025.

4.7.1 Síntese dos ésteres acrílicos α -substituídos por CN (1a-17a)

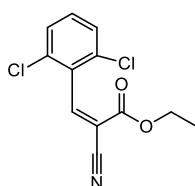
Os derivados de ciano ésteres acrílicos foram obtidos através da adaptação da metodologia descrita por Denmark e colaboradores (2017). Em um balão de fundo redondo foram adicionados 5 mmol (1,0 eq.) de cianoacetato de etila, 1,0 eq. do requerido aldeído, 1,1 eq. de Et_3N e 10 mL de Etanol PA. A reação foi agitada à temperatura ambiente por 3 horas. Após o término ser constatado por CCD, o precipitado formado foi filtrado e lavado com EtOH ou água.

Esquema 2. Metodologia de síntese dos derivados ésteres acrílicos substituídos com o grupo ciano.



Fonte: Autora, 2025.

4.7.1.1 Dados e caracterização de etil 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrilato (1a)



Sólido branco

Rendimento: 90,0%

PF: 113 - 113,4 °C

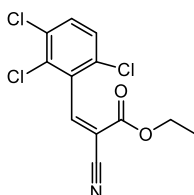
Massa molar: 296,0 g/mol

Fórmula molecular: C₁₂H₉Cl₂NO₂

Fator de retenção: 0,62 (Hex:AcOEt 95:5)

- RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,41 (t, 3H, J= 7,17 Hz, CH₃); 4,40 (q, 2H, J= 7,17, CH₂); 7,54 (t, 1H, J= 1,81 Hz, H-Ar); 7,84 (m, 2H, H-Ar); 8,11 (s, 1H, CH=C).
- RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14,12; 63,22; 106,10; 114,44; 128,68; 132,68; 133,99; 136,11; 151,58; 161,58. (Apêndice 1)

4.7.1.2 Dados e caracterização de etil 2-ciano-3-(2,3,6-triclorofenil) acrilato (2a)



Sólido branco

Rendimento: 40,0%

PF: 66 - 67 °C

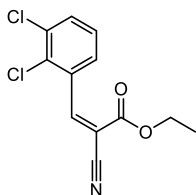
Massa molar: 302,96 g/mol

Fórmula molecular: C₁₂H₈Cl₃NO₂

Fator de retenção: 0,62 (Hex:AcOEt 95:5)

- RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,42 (t, 3H, $J = 7,11$ Hz, CH_3); 4,42 (q, 2H, $J = 7,09$, CH_2); 7,38 (m, 1H, H-Ar); 7,51 (m, 1H, H-Ar); 8,23 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).
- RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14,12; 63,22; 106,10; 114,44; 128,68; 132,68; 133,99; 136,11; 151,58; 161,58. (Apêndice 2)

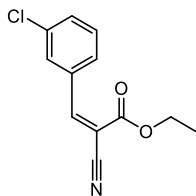
4.7.1.3 Dados e caracterização de etil 2-ciano-3-(2,3-diclorofenil) acrilato (3a)



Sólido branco
 Rendimento: 60,0%
 PF: 77 - 78 °C
 Massa molar: 296,0 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NO}_2$
 Fator de retenção: 0,65 (Hex:AcOEt 95:5)

- RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,41 (t, 3H, $J = 7,10$ Hz, CH_3); 4,42 (q, 2H, $J = 7,22$, CH_2); 7,37 (t, 1H, $J = 7,95$ Hz, H-Ar); 7,63 (m, 1H, H-Ar); 8,05 (m, 1H, H-Ar); 8,65 (s, 1H, H-Ar).
- RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14,12; 63,16; 107,65; 114,37; 127,86; 128,04; 132,08; 133,87; 134,12; 134,37; 151,15; 161,46. (Apêndice 3)

4.7.1.4 Dados e caracterização de etil 3-(3-clorofenil)-2-cianoacrilato (4a)

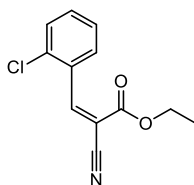


Sólido branco
 Rendimento: 52,0%
 PF: 97 - 98 °C
 Massa molar: 235,04 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClNO}_2$
 Fator de retenção: 0,625 (Hex:AcOEt 95:5)

- RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,40 (t, 3H, $J = 7,13$ Hz, CH_3); 4,39 (q, 2H, $J = 7,07$, CH_2); 7,43-7,47 (m, 1H, H-Ar); 7,51-7,54 (m, 1H, H-Ar); 7,90-7,93 (m, 2H, H-Ar); 8,18 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).
- RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14,12; 62,96; 104,76; 114,90; 128,60; 130,52; 130,82; 133,03; 133,09; 135,38; 153,15; 161,99. (Apêndice 4)

4.7.1.5 Dados e caracterização de etil 3-(2-clorofenil)-2-cianoacrilato (5a)

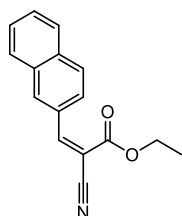
Óleo amarelo claro
 Rendimento: 54,0%
 PF: 44 - 45 °C



Massa molar: 235,04 g/mol
 Fórmula molecular: C₁₂H₁₀ClNO₂
 Fator de retenção: 0,6 (Hex:AcOEt 95:5)

- RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,41 (*t*, 3H, *J*= 7,15 Hz, CH₃); 4,40 (*qua*, 2H, *J*= 7,23, CH₂); 7,33-7,42 (*m*, 1H, H-Ar); 7,45-7,51 (*m*, 2H, H-Ar); 8,23 (*d*, 1H, *J*= 7,84, H-Ar); 8,69 (*s*, 1H, CH=C).
- RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14,11; 62,93; 106,26; 114,78; 127,45; 129,87; 129,94; 130,33; 133,62; 136,44; 151,13; 161,81. (Apêndice 5)

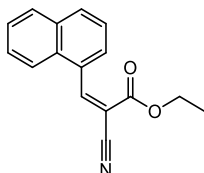
4.7.1.6 Dados e caracterização de etil 2-ciano-3-(naftalen-2-il) acrilato (6a)



Sólido branco
 Rendimento: 64,0%
 PF: 95,5 - 96,5 °C
 Massa molar: 251,09 g/mol
 Fórmula molecular: C₁₆H₁₃NO₂
 Fator de retenção: 0,57 (Hex:ActOEt 95:5)

- RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,33 (*t*, 3H, *J*= 7,1 Hz, CH₃); 4,34 (*qua*, 2H, *J*= 7,27 Hz, CH₂); 7,63-7,67 (*m*, 1H, H-Ar); 7,69-7,73 (*m*, 1H, H-Ar); 8,01-8,05 (*m*, 2H, H-Ar); 8,09-8,11 (*m*, 1H, H-Ar); 8,20-8,22 (*m*, 1H, H-Ar); 8,53 (*s*, 1H, CH=C); 8,59 (*s*, 1H, H-Ar).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 14,48; 62,86; 102,81; 116,27; 125,00; 127,91; 128,32; 129,42; 129,45; 129,73; 129,77; 132,80; 134,92; 135,27; 155,41; 162,40. (Apêndice 6)

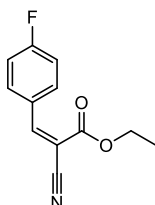
4.7.1.7 Dados e caracterização de etil 2-ciano-3-(naftalen-1-il) acrilato (7a)



Sólido amarelo claro
 Rendimento: 20,0%
 PF: 76,5 - 77,5 °C
 Massa molar: 251,09 g/mol
 Fórmula molecular: C₁₆H₁₃NO₂
 Fator de retenção: 0,5 (Hex:ActOEt 95:5)

- Sólido amarelo claro; Rendimento: 20,0%; Massa molar: 251,09 g/mol; Fórmula molecular: C₁₆H₁₃NO₂; Fator de retenção: 0,5 (Hexano: ActOEt 95:5).
- RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,36 (t, 3H, J= 7,09 Hz, CH₃); 4,38 (q, 2H, J= 7,12 Hz, CH₂); 7,65-7,72 (m, 3H, H-Ar); 8,06-8,09 (m, 2H, H-Ar); 8,14-8,16 (m, 1H, H-Ar); 8,19-8,21 (m, 1H, H-Ar); 9,09 (s, 1H, CH=C);
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 14,47; 62,6; 107,13; 115,78; 123,92; 125,93; 127,48; 128,31; 128,36; 129,09; 129,36; 131,22; 133,42; 133,49; 153,88; 161,97. (Apêndice 7)

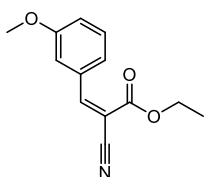
4.7.1.8 Dados e caracterização de etil 2-ciano-3-(4-fluorofenil) acrilato (8a)



Sólido branco
 Rendimento: 70,0%
 PF: 93 - 94 °C
 Massa molar: 219,07 g/mol
 Fórmula molecular: C₁₂H₁₀FNO₂
 Fator de retenção: 0,5 (Hex:ActOEt 95:5)

- RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,31 (t, 3H, J= 7,11 Hz, CH₃); 4,32 (q, 2H, J= 7,10 Hz, CH₂); 7,45-7,49 (m, 2H, H-Ar); 8,14-8,18 (m, 2H, H-Ar); 8,42 (s, 1H, CH=C).
- RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14,45; 62,85; 102,68; 116,06; 117,00; 117,22; 128,59; 134,23; 154,29; 162,24; 163,87; 166,39. (Apêndice 8)

4.7.1.9 Dados e caracterização de etil 2-ciano-3-(3-metoxifenil) acrilato (9a)

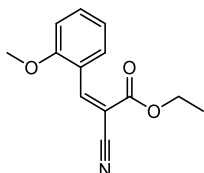


Sólido amarelo claro
 Rendimento: 57,0%
 PF: 79 - 80 °C
 Massa molar: 231,09 g/mol
 Fórmula molecular: C₁₃H₁₃NO₃
 Fator de retenção: 0,45 (Hex:ActOEt 95:5)

- RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,40 (t, 3H, J= 6,97 Hz, CH₃); 3,87 (s, 3H, CH₃); 4,39 (q, 2H, J= 7,32 Hz, CH₂); 7,09-7,12 (m, 1H, H-Ar); 7,38-7,42 (m, 1H, H-Ar); 7,50-7,52 (m, 1H, H-Ar); 7,60 (m, 1H, H-Ar); 8,22 (s, 1H, CH=C).

- RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 14,17; 55,47; 62,77; 103,12; 114,52; 115,55; 120,10; 124,23; 130,24; 132,65; 155,08; 159,96; 162,49. (Apêndice 9)

4.7.1.10 Dados e caracterização de etil 2-ciano-3-(2-metoxifenil) acrilato (10a)



Sólido amarelo claro

Rendimento: 77,0%

PF: 119 - 121 °C

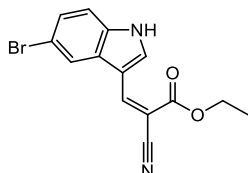
Massa molar: 231,09 g/mol

Fórmula molecular: $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_3$

Fator de retenção: Hex:ActOEt 95:5

- RMN ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 1,29 (t, 3H, $J = 7,11$ Hz, CH_3); 3,90 (s, 3H, CH_3); 4,30 (q, 2H, $J = 7,16$ Hz, CH_2); 7,14 (t, 1H, $J = 7,60$ Hz, H-Ar); 7,21-7,22 (m, 1H, H-Ar); 7,62-7,65 (m, 1H, H-Ar); 8,10-8,12 (m, 1H, H-Ar); 8,58 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 14,45; 56,61; 62,8; 102,77; 112,72; 116,08; 120,29; 121,31; 129,02; 136; 149,54; 159,36; 162,45. (Apêndice 10)

4.7.1.11 Dados e caracterização de etil 3-(5-bromo-1H-indol-3-il)-2-cianoacrilato (11a)



Sólido amarelo claro

Rendimento: 44,0%

PF: 203 - 205 °C

Massa molar: 318,0 g/mol

Fórmula molecular: $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{O}_2$

Fator de retenção: 0,4 (Hex:ActOEt 8:2)

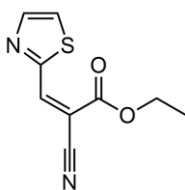
- RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 1,30 (t, 3H, $J = 6,29$ Hz, CH_3); 4,28 (q, 2H, $J = 7,15$ Hz, CH_2); 7,39-7,41 (m, 1H, H-Ar); 7,51-7,53 (m, 1H, H-Ar); 8,24-8,25 (m, 1H, $\text{CH}=\text{C}$); 8,57 (d, 2H, H-Ar).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 14,62; 61,97; 93,81; 109,98; 115,36; 115,41; 126,68; 129,20; 133,95; 147,05; 163,50. (Apêndice 11)

4.7.1.12 Dados e caracterização de etil 2-ciano-3-(tiazol-2-il) acrilato (12a)

Sólido branco

Rendimento: 40,0%

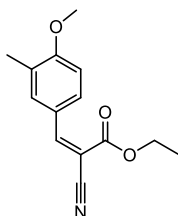
PF: 112 - 113 °C



Massa molar: 208,0 g/mol
 Fórmula molecular: C₉H₈N₂O₂S
 Fator de retenção: 0,25 (Hex: ActOEt 95:5)

- RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,41 (t, 3H, J= 7,11 Hz, CH₃); 4,41 (q, 2H, J= 7,08 Hz, CH₂); 7,79-7,80 (m, 1H, H-Ar); 8,18-8,19 (m, 1H, H-Ar); 8,49 (s, 1H, CH=C).
- RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14,11; 63,17; 105,59; 114,58; 125,78; 145,81; 145,83; 159,08; 161,50. (Apêndice 12)

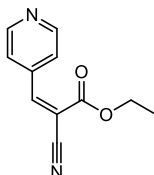
4.7.1.13 Dados e caracterização de etil 2-ciano-3-(4-metoxi-3-metilfenil) acrilato (13a)



Sólido branco
 Rendimento: 92,76%
 PF: 108 - 108,6 °C
 Massa molar: 245,11 g/mol
 Fórmula molecular: C₁₄H₁₅NO₃
 Fator de retenção: 0,6 (Hex:ActOEt 95:5)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 1,34 (t, 3H, J= 7,11 Hz, CH₃); 2,23 (s, 3H, CH₃); 3,97 (s, 3H, OCH₃); 4,33 (q, 2H, J= 7,11 Hz, CH₂); 7,13 (d, 1H, J= 8,65 Hz, H-Ar); 7,91-7,92 (m, 1H, H-Ar); 7,98-8,02 (m, 1H, H-Ar); 8,19 (s, 1H, CH=CCN).
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 13,56; 15,38; 55,41; 61,89; 99,01; 110,69; 115,92; 124,05; 127,35; 131,79; 133,43; 154,11; 162,20; 162,61. (Apêndice 13)

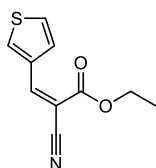
4.7.1.14 Dados e caracterização de etil 2-ciano-3-(piridin-4-il) acrilato (14a)



Sólido cinza
 Rendimento: 70,49 %
 PF: 90 - 91 °C
 Massa molar: 202,07 g/mol
 Fórmula molecular: C₁₁H₁₀N₂O₂
 Fator de retenção: 0,2 (Hex:ActOEt 9:1)

- RMN ^1H (400MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 1,37 (*t*, 3H, J = 7,12 Hz, CH_3); 4,39 (*q*, 2H, J = 7,11 Hz, CH_2); 7,89-7,91 (*m*, 2H, H-Ar); 8,38 (*s*, 1H, $\text{CH}=\text{CCN}$); 8,83-8,86 (*m*, 2H, H-Ar).
- RMN ^{13}C (100MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 13,43; 62,72; 108,29; 114,28; 123,21; 138,51; 150,97; 152,25; 161,10. (Apêndice 14)

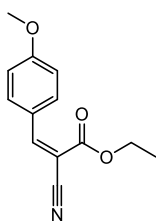
4.7.1.15 Dados e caracterização de etil 2-ciano-3-(tiofen-3-il) acrilato (15a)



Sólido amarelo
 Rendimento: 80,55%
 PF: 64,5 - 66 °C
 Massa molar: 207,04 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}$
 Fator de retenção: 0,26 (CyHex:ActOEt 95:5)

- RMN ^1H (400MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 1,34 (*t*, 3H, J = 7,11 Hz, CH_3); 4,33 (*q*, 2H, J = 7,11 Hz, CH_2); 7,73-7,76 (*m*, 1H, H-Tiofeno); 7,95-7,97 (*m*, 1H, H-Tiofeno); 8,36 (*s*, 1H, $\text{CH}=\text{CCN}$); 8,49-8,50 (*m*, 1H, H-Tiofeno).
- RMN ^{13}C (100MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 13,53; 62,08; 100,96; 115,72; 126,80; 128,31; 134,73; 136,76; 147,59; 162,30. (Apêndice 15)

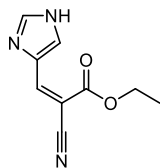
4.7.1.16 Dados e caracterização de etil 2-ciano-3-(4-metoxifenil) acrilato (16a)



Sólido amarelo claro
 Rendimento: 98,33%
 PF: 78,5 - 79 °C
 Massa molar: 231,09 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_3$
 Fator de retenção: 0,6 (Hex:ActOEt 95:5)

- RMN ^1H (400MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 1,35 (*t*, 3H, J = 7,11 Hz, CH_3); 3,94 (*s*, 3H, OCH_3); 4,34 (*q*, 2H, J = 7,11 Hz, CH_2); 7,13-7,16 (*m*, 2H, H-Ar); 8,09-8,12 (*m*, 2H, H-Ar); 8,24 (*s*, 1H, $\text{CH}=\text{CCN}$).
- RMN ^{13}C (100MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 13,56; 55,28; 61,96; 99,40; 114,80; 115,86; 124,41; 133,51; 153,95; 162,53; 163,95. (Apêndice 16)

4.7.1.17 Dados e caracterização de Etil 2-ciano-3-(1H-imidazol-4-il) acrilato (17a)



Sólido amarelo

Rendimento: 73,97%

PF: 175 - 176 °C

Massa molar: 191,07 g/mol

Fórmula molecular: C₉H₉N₃O₂

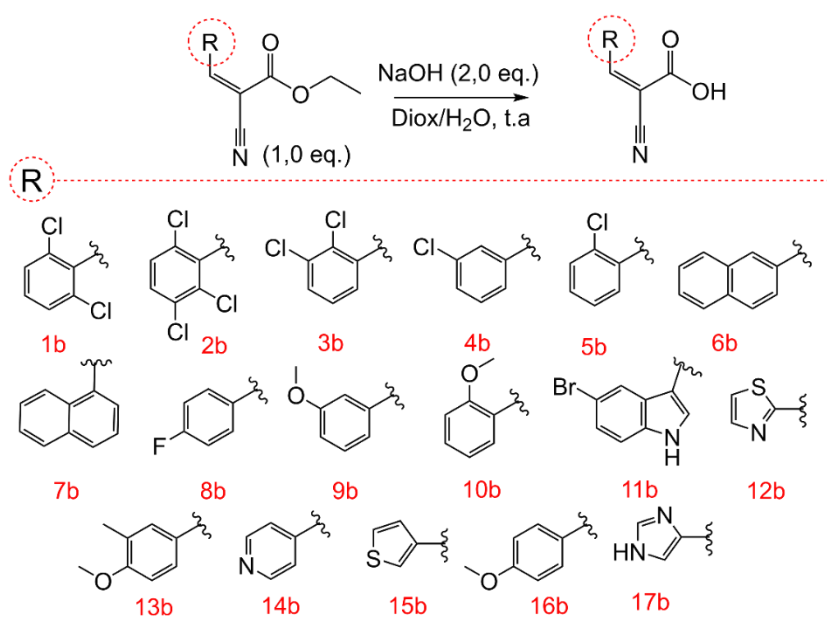
Fator de retenção: 0,2 (Hex:ActOEt 9:1)

- RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,27 (t, 3H, J= 7,10 Hz, CH₃); 4,26 (q, 2H, J= 7,10 Hz, CH₂); 7,99 (s, 1H, H-Imidazol); 8,09 (s, 1H, H-Imidazol); 8,17 (s, 1H, CH=CCN).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 14,51; 62,17; 96,60; 116,35; 128,65; 134,60; 139,52; 147,10; 163,39. (Apêndice 17)

4.7.2 Síntese dos ácidos acrílicos α-substituídos por CN (1b-17b)

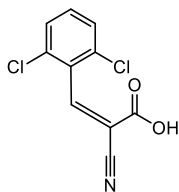
A hidrólise dos ésteres (1b-17b) foi realizada em meio alcalino, onde 4,5 mmol (1,0 eq.) do éster e 2,0 eq. de NaOH foram adicionados a 5 mL de uma mistura de dioxano e água (1:1) e mantidos sob agitação a temperatura ambiente por 3 horas. Após o término da reação ser constatado por CCD, o solvente orgânico foi seco sob pressão reduzida. O líquido restante foi então acidificado com uma solução de HCl 3M até pH 2. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada para obtenção do ácido puro.

Esquema 3. Metodologia de síntese dos derivados ácidos acrílicos substituídos com ciano.



Fonte: Autora, 2025.

4.7.2.1 Dados e caracterização de Ácido 2-ciano-3-(2,6-diclorofenil) acrílico (1b)



Sólido branco

Rendimento: 40,0%

PF: 149 – 150 °C

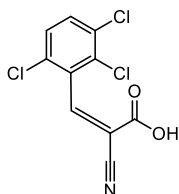
Massa molar: 240,97 g/mol

Fórmula molecular: C₁₀H₅Cl₂NO₂

Fator de retenção: 0,55 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7,52-7,56 (*m*, 1H, H-Ar); 7,64-7,66 (*m*, 2H, H-Ar); 8,37 (*s*, 1H, CH=C).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 114,35; 115,27; 129,17; 131,04; 132,85; 133,20; 151,85; 161,98.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para C₁₀H₅Cl₂NO₂: 240,97 g/mol; Massa observada: 240,0 g/mol [M]⁻; Pureza (CLAE): 88,25%; Tempo de retenção: 8,315 min. (Apêndice 18)

4.7.2.2 Dados e caracterização de Ácido 2-ciano-3-(2,3,6-triclorofenil) acrílico (2b)



Sólido branco

Rendimento: 53,0%

PF: 172 – 174 °C

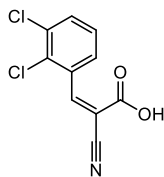
Massa molar: 274,95 g/mol

Fórmula molecular: C₁₀H₄Cl₃NO₂

Fator de retenção: 0,52 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7,69 (*m*, 1H, H-Ar); 7,82-7,85 (*m*, 1H, H-Ar); 8,38 (*s*, 1H, CH=C).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 114,18; 115,58; 130,18; 131,36; 131,66; 131,76; 132,83; 133,13; 151,60; 161,83.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para C₁₀H₃Cl₃NO₂⁻: 273,92 g/mol; Massa observada: 273,90 g/mol [M-H]⁻; Pureza (CLAE): 98,95%; Tempo de retenção: 8,154 min. (Apêndice 19)

4.7.2.3 Dados e caracterização de ácido 2-ciano-3-(2,3-diclorofenil) acrílico (3b)



Sólido amarelo claro

Rendimento: 25,0%

PF: 165 – 166 °C

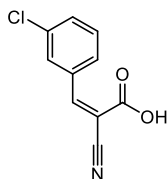
Massa molar: 240,97 g/mol

Fórmula molecular: C₁₀H₅Cl₂NO₂

Fator de retenção: 0,475 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7,56-7,60 (*m*, 1H, H-Ar); 7,85-7,88 (*m*, 1H, H-Ar); 7,97-7,99 (*m*, 1H, H-Ar); 8,46 (*s*, 1H, CH=C).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 110,06; 115,23; 128,98; 129,30; 132,43; 132,98; 133,20; 134,01; 150,72; 162,72.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para C₁₀H₅Cl₂NO₂: 240,97 g/mol; Massa observada: 240,0 g/mol [M]⁻; Pureza (CLAE): 100,0%; Tempo de retenção: 8,025 min. (Apêndice 20)

4.7.2.4 Dados e caracterização de ácido 3-(3-clorofenil) -2-cianoacrílico (4b)



Sólido branco

Rendimento: 30,0%

PF: 223 – 225 °C

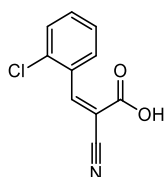
Massa molar: 207,01 g/mol

Fórmula molecular: C₁₀H₆ClNO₂

Fator de retenção: 0,5 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7,59-7,63 (*m*, 1H, H-Ar); 7,66-7,69 (*m*, 1H, H-Ar); 7,98-8,0 (*m*, 1H, H-Ar); 8,06-8,07 (*m*, 1H, H-Ar); 8,33 (*s*, 1H, CH=H).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 106,47; 116,31; 129,28; 130,43; 131,56; 132,85; 134,11; 134,26; 152,92; 163,31.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para C₁₀H₅ClNO₂⁻: 206,00 g/mol; Massa observada: 206,0 g/mol [M-H]⁻; Pureza (CLAE): 94,58%; Tempo de retenção: 8,08 min. (Apêndice 21)

4.7.2.5 Dados e caracterização de ácido 3-(2-clorofenil) -2-cianoacrílico (5b)



Sólido rosa claro

Rendimento: 57,0%

PF: 164 – 166 °C

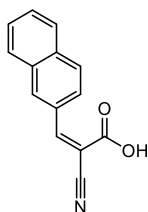
Massa molar: 207,01 g/mol

Fórmula molecular: C₁₀H₆ClNO₂

Fator de retenção: 0,625 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,54-7,69 (*m*, 3H, H-Ar); 8,09-8,11 (*m*, 1H, H-Ar); 8,49 (*s*, 1H, CH=C).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 108,44; 115,61; 128,39; 130,20; 130,26; 130,69; 134,42; 135,02; 150,53; 163,00.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{ClNO}_2^-$: 206,00 g/mol; Massa observada: 206,0 g/mol $[\text{M-H}]^-$; Pureza (CLAE): 88,29%; Tempo de retenção: 8,536 min. (Apêndice 22)

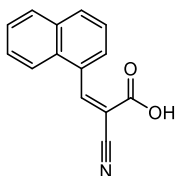
4.7.2.6 Dados e caracterização de Ácido 2-ciano-3-(naftalen-2-il) acrílico (6b)



Sólido branco
Rendimento: 42,0%
PF: Degradou em 220 °C
Massa molar: 223,23 g/mol
Fórmula molecular: $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_2$
Fator de retenção: 0,625 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,56-7,63 (*m*, 2H, H-Ar); 7,95-8,02 (*m*, 3H, H-Ar); 8,09-8,11 (*m*, 2H, H-Ar); 8,33 (*s*, 1H, CH=C).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 114,79; 119,94; 125,40; 127,33; 128,12; 128,90; 129,08; 131,08; 131,53; 133,14; 134,09; 147,35; 163,34.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{NO}_2^-$: 222,06 g/mol; Massa observada: 222,0 g/mol $[\text{M-H}]^-$; Pureza (CLAE): 98,77%; Tempo de retenção: 7,671 min. (Apêndice 23)

4.7.2.7 Dados e caracterização de ácido 2-ciano-3-(naftalen-1-il) acrílico (7b)

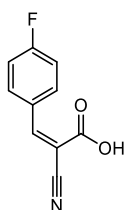


Sólido amarelo escuro
Rendimento: 43,0%
PF: 198 – 199 °C
Massa molar: 223,06 g/mol
Fórmula molecular: $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_2$
Fator de retenção: 0,525 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,65-7,90 (*m*, 3H, H-Ar); 8,05-8,07 (*m*, 2H, H-Ar); 8,13-8,19 (*m*, 2H, H-Ar); 9,03 (*s*, 1H, CH=C).

- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 108,36; 116,21; 123,84; 125,92; 127,41; 128,12; 128,30; 129,25; 129,37; 131,21; 133,12; 133,49; 153,13; 163,39.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{NO}_2^-$: 222,06 g/mol; Massa observada: 222,0 g/mol $[\text{M}-\text{H}]^-$; Pureza (CLAE): 99,11%; Tempo de retenção: 8,217 min. (Apêndice 24)

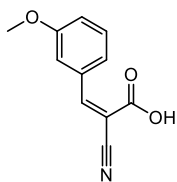
4.7.2.8 Dados e caracterização de Ácido 2-ciano-3-(4-fluorofenil)acrílico (8b)



Sólido branco
 Rendimento: 73,0%
 PF: > 350 °C
 Massa molar: 191,04 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{FNO}_2$
 Fator de retenção: 0,5 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,34 (*t*, 2H, J = 8,81 Hz, H-Ar); 7,91 (*s*, 1H, CH=C); 7,92-7,96 (*m*, 2H, H-Ar).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 114,43; 116,35; 116,57; 119,76; 130,53; 130,56; 132,07; 132,16; 146,03; 162,23; 163,04; 164,70.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{FNO}_2^-$: 190,15 g/mol; Massa observada: 190,0 g/mol $[\text{M}-\text{H}]^-$; Pureza (CLAE): 100,0%; Tempo de retenção: 3,858 min. (Apêndice 25)

4.7.2.9 Dados e caracterização de ácido 2-ciano-3-(3-metoxifenil)acrílico (9b)

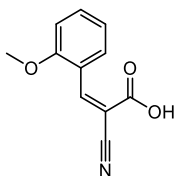


Sólido amarelo claro
 Rendimento: 25,0%
 PF: 156,6 – 158 °C
 Massa molar: 203,06 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NO}_3$
 Fator de retenção: 0,625 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,03 (*s*, 3H, CH₃); 7,19-7,21 (*m*, 1H, H-Ar); 7,49 (*t*, 1H, J = 8,29 Hz, H-Ar); 7,61-7,63 (*m*, 1H, H-Ar); 8,32 (*s*, 1H, CH=C).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 55,79; 104,46; 115,90; 116,53; 119,52; 123,47; 130,86; 133,20; 154,81; 159,91; 163,65.

- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $C_{11}H_8NO_3^-$: 202,05 g/mol; Massa observada: 202,1 g/mol $[M-H]^-$; Pureza (CLAE): 96,58%; Tempo de retenção: 8,521. (Apêndice 26)

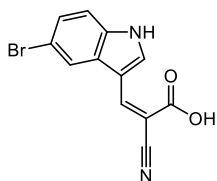
4.7.2.10 Dados e caracterização de ácido 2-ciano-3-(2-metoxifenil) acrílico (10b)



Sólido amarelo escuro
 Rendimento: 40,0%
 Massa molar: 203,06 g/mol
 Fórmula molecular: $C_{11}H_9NO_3$
 Fator de retenção: 0,675 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN 1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,90 (s, 3H, CH₃); 7,13 (t, 1H, $J=7,44$ Hz, H-Ar); 7,20-7,21 (m, 1H, H-Ar); 7,60-7,63 (m, 1H, H-Ar); 8,10-8,12 (m, 1H, H-Ar); 8,55 (s, 1H, CH=C).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 56,56; 103,98; 112,65; 116,55; 120,46; 121,27; 128,91; 135,63; 148,89; 159,19; 163,82.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $C_{11}H_8NO_3^-$: 202,05 g/mol; Massa observada: 202,0 g/mol $[M-H]^-$; Pureza (CLAE): 93,65%; Tempo de retenção: 9,293 min. (Apêndice 27)

4.7.2.11 Dados e caracterização de ácido 3-(5-bromo-1H-indol-3-il) -2-ciano acrílico (11b)

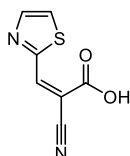


Sólido amarelo
 Rendimento: 65,0%
 PF: 183 – 184 °C
 Massa molar: 289,97 g/mol
 Fórmula molecular: $C_{12}H_7BrN_2O_2$
 Fator de retenção: 0,2 (ActOEt:MeOH 8:2)

- RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,38-7,40 (m, 1H, H-Ar); 7,48-7,50 (m, 1H, H-Ar); 8,21 (d, 1H, H-Ar); 8,34 (m, 1H, H-Ar); 9,92 (s, 1H, CH=C); 12,30 (s, 1H, NH).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 115,03; 115,28; 117,89; 123,04; 123,38; 126,35; 126,527; 135,94; 136,21; 139,73; 164,61; 185,62.

- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $C_{12}H_6BrN_2O_2^-$: 288,96 g/mol; Massa observada: 288,9 g/mol; Pureza (CLAE): 100,0%; Tempo de retenção: 8,908 min. (Apêndice 28)

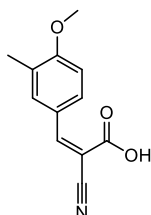
4.7.2.12 Dados e caracterização de ácido 2-ciano-3-(tiazol-2-il) acrílico (12b)



Sólido marrom claro
Rendimento: 25,0%
Massa molar: 180,0 g/mol
Fórmula molecular: $C_7H_4N_2O_2S$
Fator de retenção: 0,64 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8,04-8,05 (*m*, 2H, CH=H e H-tiazol); 8,08 (*m*, 1H, H-tiazol).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 117,23; 118,64; 124,70; 139,41; 144,84; 161,38; 162,14. (Apêndice 29)

4.7.2.13 Dados e caracterização de ácido 2-ciano-3-(4-metoxi-3-metilfenil) acrílico (13b)

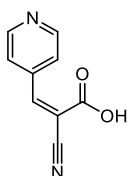


Sólido amarelo
Rendimento: 76,76%
PF: 200 – 202 °C
Massa molar: 217,07 g/mol
Fórmula molecular: $C_{12}H_{11}NO_3$
Fator de retenção: 0,75 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN 1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2,17 (*s*, 3H, CH_3); 3,89 (*s*, 3H, OCH_3); 7,14 (*s*, 1H, $J = 8,7$ Hz, H-Ar); 7,87-7,97 (*m*, 2H, H-Ar); 8,18 (*s*, 1H, CH=CCN).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 16.45; 56.33; 99.88; 111.50; 117.18; 124.13; 127.15; 132.08; 133.46; 154.40; 162.02; 164.29.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $C_{12}H_{10}NO_3^-$: 216,07 g/mol; Massa observada: 216,1 g/mol $[M-H]^-$; Pureza (CLAE): 100,0%; Tempo de retenção: 9,639 min. (Apêndice 30)

4.7.2.14 Dados e caracterização de ácido 2-ciano-3-(piridin-4-il) acrílico (14b)

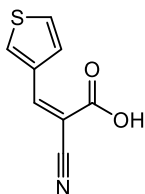
Sólido rosa
Rendimento: 50,00%
PF: 167 – 167 °C
Massa molar: 174,04 g/mol



Fórmula molecular: $C_9H_6N_2O_2$
Fator de retenção: 0,13 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN 1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,85-7,87 (*m*, 2H, H-Ar); 8,36 (*s*, 1H, CH=CCN); 8,79-8,81 (*m*, 2H, H-Ar).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 109,51; 115,62; 123,69; 139,10; 151,13; 152,44; 162,85.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $C_9H_5N_2O_2^-$: 173,04 g/mol; Massa observada: 173,0 g/mol $[M-H]^-$; Pureza (CLAE): 82,36%; Tempo de retenção: 8,574 min. (Apêndice 31)

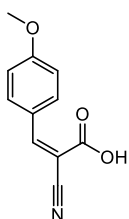
4.7.2.15 Dados e caracterização de ácido 2-ciano-3-(tiofen-3-il) acrílico (15b)



Sólido marrom
Rendimento: 25,00%
PF: 178 – 179 °C
Massa molar: 179,00 g/mol
Fórmula molecular: $C_8H_5NO_2S$
Fator de retenção: 0,66 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN 1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,78-7,81 (*m*, 1H, H-Tiofeno); 7,85-7,87 (*m*, 1H, H-Tiofeno); 8,34 (*s*, 1H, CH=CCN); 8,53-8,54 (*m*, 1H, H-Tiofeno).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 164,08; 148,05; 137,86; 134,85; 129,47; 126,75; 117,01; 101,71.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $C_8H_4NO_2S^-$: 178,0 g/mol; Massa observada: 178,0 g/mol $[M-H]^-$; Pureza (CLAE): 98,93%; Tempo de retenção: 8,658 min. (Apêndice 32)

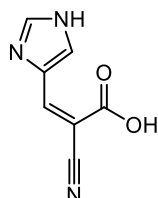
4.7.2.16 Dados e caracterização de ácido 2-ciano-3-(4-metoxifenil) acrílico (16b)



Sólido branco
Rendimento: 65,90%
PF: 207 – 208 °C
Massa molar: 203,06 g/mol
Fórmula molecular: $C_{11}H_9NO_3$
Fator de retenção: 0,7 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,86 (s, 3H, OCH_3); 7,13 (d, 2H, $J=8,95$ Hz, H-Ar); 8,05 (d, 2H, $J=8,85$ Hz, H-Ar); 8,25 (s, 1H, $\text{CH}=\text{CCN}$).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 56,18; 100,28; 115,37; 117,14; 124,56; 133,71; 154,32; 163,73; 164,24.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{NO}_3^+$: 204,20 g/mol; Massa observada: 204,0 g/mol $[\text{M}+\text{H}]^+$; Pureza (CLAE): 98,22%; Tempo de retenção: 8,476 min. (Apêndice 33)

4.7.2.17 Dados e caracterização de ácido 2-ciano-3-(1H-imidazol-4-il) acrílico (17b)



Sólido branco
 Rendimento: 83,80%
 PF: 209 – 210 °C
 Massa molar: 163,04 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$
 Fator de retenção: 0,25 (ActOEt:AcOH 99:1)

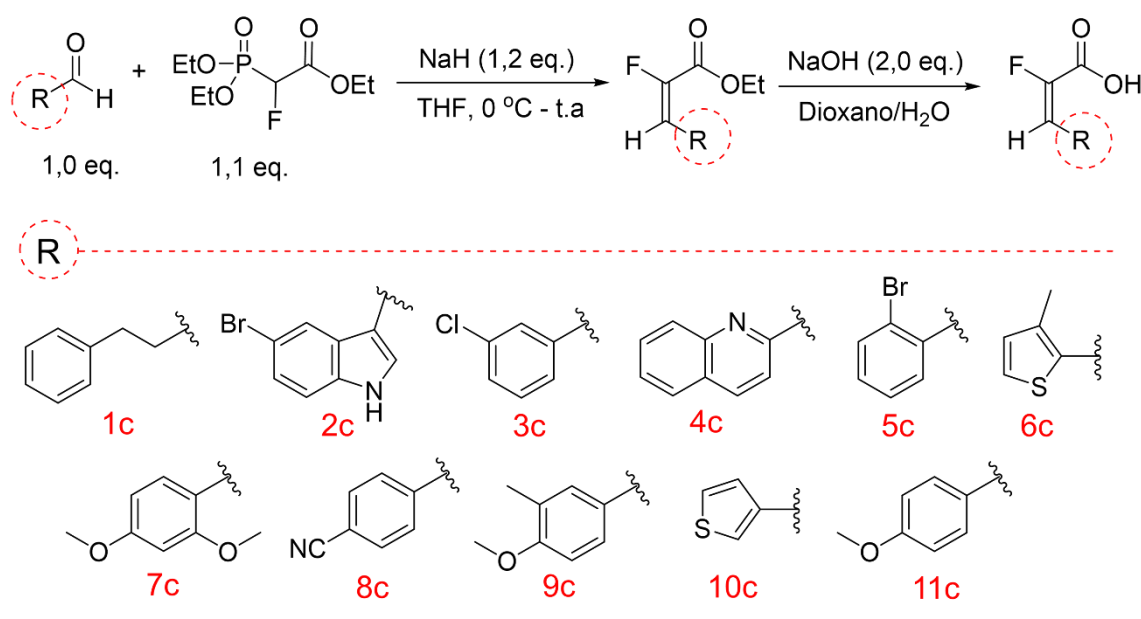
- RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,99 (s, 1H, $\text{CH}=\text{CCN}$); 8,04 (d, 1H, $J=0,57$ Hz, H-Imidazol); 8,12 (s, 1H, H-Imidazol).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 97,92; 116,84; 127,93; 134,38; 139,30; 146,60; 164,72.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_3\text{O}_2^-$: 162,03 g/mol; Massa observada: 162,0 g/mol $[\text{M}-\text{H}]^-$; Pureza (CLAE): 100,0%; Tempo de retenção: 3,089 min. (Apêndice 34)

4.7.3 Síntese dos ácidos acrílicos α -substituídos por flúor (1c-11c)

Seguindo a metodologia descrita por Liu et al., (2022) NaH (60% mineral, 1,2 eq.) foi adicionado a um balão de fundo redondo, onde posteriormente foram adicionados 20 mL de THF seco. O balão foi resfriado a 0 °C sob condição livre de oxigênio. Trietil 2-fluoro-2-fosfoacetato (1,1 eq.) foi adicionado gota a gota. Após agitação por 15 minutos, 1,2 eq. do aldeído foi adicionado lentamente, e a temperatura foi gradualmente elevada até a temperatura ambiente, e a solução final foi mantida em agitação por 4 horas. Após o término da reação ser constatado por CCD, a reação foi extinta por água, extraída com acetato de etila (3 x 15 mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada a vácuo. O produto bruto foi

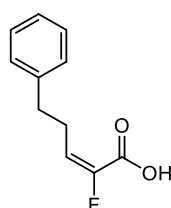
usado diretamente para hidrólise subsequente, onde NaOH (2 eq.) e o produto bruto da etapa anterior foram solubilizados a uma mistura de dioxano e água (1:1). A mistura foi mantida em agitação à temperatura ambiente por 3-8 horas. Após o término da reação, o solvente orgânico foi evaporado e foram adicionadas gotas de uma solução 3M de HCl até pH 2-3. O sólido formado foi então filtrado e lavado com água.

Esquema 4. Metodologia de síntese dos derivados ácidos acrílicos substituídos com flúor.



Fonte: Autora, 2025.

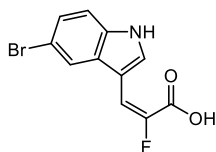
4.7.3.1 Dados e caracterização de ácido 2-fluoro-5-fenilpent-2-enoico (1c)



Cristal higroscópico branco
 Rendimento: 55,70%
 Massa molar: 194,07 g/mol
 Fórmula molecular: C₁₁H₁₁FO₂
 Fator de retenção: 0,62 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 2,80-2,81 (*m*, 4H, CH₂); 5,95-6,19 (*m*, 1H, CH=CF); 7,15-7,32 (*m*, 5H, H-Ar).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 27,35 (*d*, *J*= 4,79 Hz); 34,97 (*d*, *J*= 2,23 Hz); 122,48 (*d*, *J*= 18,90 Hz); 126,46; 128,73; 128,80; 141,34; 147,77 (*d*, *J*= 248,85 Hz); 162,23 (*d*, *J*= 36,43 Hz). (Apêndice 35)

4.7.3.2 Dados e caracterização de 3-(5-bromo-1H-indol-3-il) -2-fluoroacrílico (2c)



Sólido amarelo claro

Rendimento: 71,44%

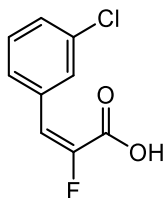
Massa molar: 282,96 g/mol

Fórmula molecular: C₁₁H₇BrFNO₂

Fator de retenção: 0,7 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 7,29-7,41 (*m*, 2H, H-Ar e CH=CF); 7,45-7,48 (*m*, 1H, H-Ar); 8,01 (*d*, 1H, *J*= 1,86 Hz, H-Ar); 8,61 (*d*, 1H, *J*= 2,79 Hz, H-Ar); 10,69 (*s*, 1H, OH).
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 105,38 (*d*, *J*= 9,23 Hz); 113,33; 113,68; 114,02 (*d*, *J*= 30,44 Hz); 120,59; 124,96; 130,04; 131,10 (*d*, *J*= 4,65 Hz); 134,78; 144,05 (*d*, *J*= 247,16 Hz); 166,99 (*d*, *J*= 34,83 Hz).
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para C₁₁H₆BrFNO₂⁻: 281,96 g/mol; Massa observada: 281,9 g/mol [M-H]⁻; Pureza (CLAE): 100,0%; Tempo de retenção: 9,039 min. (Apêndice 36)

4.7.3.3 Dados e caracterização de ácido 3-(3-clorofenil) -2-fluoro acrílico (3c)



Sólido branco

Rendimento: 76,01%

Massa molar: 200,0 g/mol

Fórmula molecular: C₉H₆ClFO₂

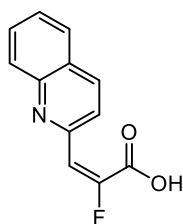
Fator de retenção: 0,72 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 6,99-7,11 (*m*, 1H, CH=CF); 7,35-7,52 (*m*, 3H, H-Ar); 7,67-7,77 (*m*, 1H, H-Ar).
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 119,72 (*d*, *J*= 27,83 Hz); 128,44 (*d*, *J*= 2,89 Hz); 128,4635; 129,52 (*d*, *J*= 2,97 Hz); 129,5849; 133,2714; 133,3764; 133,5180; 147,83 (*d*, *J*= 256,66 Hz); 160,50 (*d*, *J*= 36,79 Hz).
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para C₉H₆ClFO₂: 200,0 g/mol; Massa observada: 200,0 g/mol [M]⁻; Pureza (CLAE): 88,25%; Tempo de retenção: 7,821. (Apêndice 37)

4.7.3.4 Dados e caracterização de ácido 2-fluoro-3-(quinolin-2-il) acrílico (4c)

Sólido amarelo

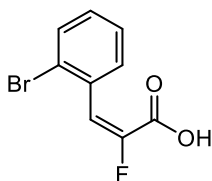
Rendimento: 71,52%



Massa molar: 217,05 g/mol
 Fórmula molecular: C₁₂H₈FNO₂
 Fator de retenção: 0,21 (CyHex:ActOEt + AcOH 2:8)

- RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7,35 (*d*, 1H, *J*= 34,43 Hz, CH=CF); 7,72-7,77 (*m*, 1H, H-Ar); 7,89-7,94 (*m*, 1H, H-Ar); 8,05-8,20 (*m*, 3H, H-Ar); 8,68 (*d*, 1H, *J*= 8,67 Hz, H-Ar).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 114,44; 122,73 (*d*, *J*= 11,91 Hz); 126,88; 127,77; 128,66; 128,89; 132,26; 140,38; 144,95; 149,89 (*d*, *J*= 4,47 Hz); 151,44 (*d*, *J*= 276,34 Hz); 161,70 (*d*, *J*= 34,77 Hz). (Apêndice 38)

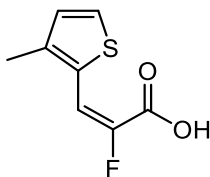
4.7.3.5 Dados e caracterização de ácido 3-(2-bromophenyl) -2-fluoro acrílico (5c)



Sólido branco
 Rendimento: 80,21%
 Massa molar: 243,95 g/mol
 Fórmula molecular: C₉H₆BrFO₂
 Fator de retenção: 0,7 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7,01 (*d*, 1H, *J*= 19,90 Hz, CH=CF); 7,24-7,30 (*m*, 1H, H-Ar); 7,33-7,39 (*m*, 1H, H-Ar); 7,44 (*dd*, 1H, *J*= 7,60 e 1,70 Hz, H-Ar); 7,65 (*dd*, 1H, *J*= 7,90 e 1,06 Hz, H-Ar).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 119,82 (*d*, *J*= 27,71 Hz); 123,10 (*d*, *J*= 3,32 Hz); 127,63; 130,50; 132,01 (*d*, *J*= 2,00 Hz); 132,31; 132,99 (*d*, *J*= 11,01 Hz); 148,79 (*d*, *J*= 256,08 Hz); 161,20 (*d*, *J*= 36,20 Hz). (Apêndice 39)

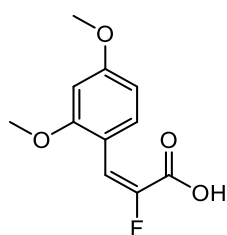
4.7.3.6 Dados e caracterização de ácido 2-fluoro-3-(3-metiltiofen-2-il) acrílico (6c)



Sólido branco
 Rendimento: 98,61%
 Massa molar: 186,02 g/mol
 Fórmula molecular: C₈H₇FO₂S
 Fator de retenção: 0,46 (CyHex:ActOEt + AcOH 8:2)

- RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2,27 (s, 3H, CH_3); 6,96 (d, 1H, $J= 5,16$ Hz, H-Tiofeno); 7,21 (d, 1H, $J= 24,82$ Hz, $\text{CH}=\text{CF}$); 7,60 (d, 1H, $J= 5,16$ Hz, H-Tiofeno).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 14,80; 114,59 (d, $J= 32,78$ Hz); 126,68 (d, $J= 8,93$ Hz); 130,11 (d, $J= 4,38$ Hz); 130,23; 142,66 (d, $J= 6,33$ Hz); 144,64 (d, $J= 251,08$ Hz); 162,29 (d, $J= 34,81$ Hz). (Apêndice 40)

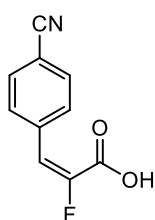
4.7.3.7 Dados e caracterização de ácido 3-(2,4-dimetoxifenil) -2-fluoro acrílico (7c)



Sólido branco
 Rendimento: 94,98%
 Massa molar: 226,06 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{FO}_4$
 Fator de retenção: 0,62 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,78-3,79 (m, 6H, OCH_3); 6,88 (d, 1H, $J= 23,53$ Hz, $\text{CH}=\text{CF}$); 6,49-6,56 (m, 2H, H-Ar); 7,46 (d, 1H, $J= 8,52$ Hz, H-Ar).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 55,75; 56,03; 98,22; 105,21; 112,31 (d, $J= 9,71$ Hz); 116,22 (d, $J= 28,31$ Hz); 132,31 (d, $J= 2,24$ Hz); 146,95 (d, $J= 248,70$ Hz); 158,47 (d, $J= 2,67$ Hz); 161,81; 162,30. (Apêndice 41)

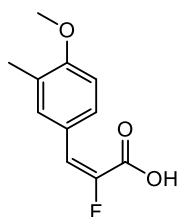
4.7.3.8 Dados e caracterização de ácido 3-(4-cianofenil) -2-fluoro acrílico (8c)



Sólido branco
 Rendimento: 73,98%
 Massa molar: 191,16 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{FNO}_2$
 Fator de retenção: 0,4 (Hex:ActOEt + AcOH 2:8)

- RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,09-7,22 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CF}$); 7,55-7,92 (m, 4H, H-Ar).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 111,18; 119,20 (d, $J= 6,46$ Hz); 119,61; 130,96 (d, $J= 2,98$ Hz); 132,20; 136,89 (d, $J= 11,13$ Hz); 148,83 (d, $J= 257,92$ Hz); 161,41 (d, $J= 36,16$ Hz).
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{FNO}_2^-$: 190,03 g/mol; Massa observada: 190,0 g/mol $[\text{M}-\text{H}]^-$; (Apêndice 42)

4.7.3.9 Dados e caracterização de ácido 2-fluoro-3-(4-metoxi-3-metilfenil) acrílico (9c)



Sólido branco

Rendimento: 65,48%

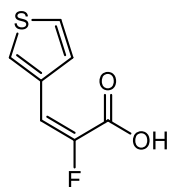
Massa molar: 210,07 g/mol

Fórmula molecular: C₁₁H₁₁FO₃

Fator de retenção: 0,7 (Hex:ActOEt + AcOH 99:1)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 2,17-2,21 (*m*, 3H, CH₃); 3,86-3,90 (*m*, 3H, OCH₃); 6,89-7,03 (*m*, 2H, H-Ar e CH=CF); 7,51-7,59 (*m*, 2H, H-Ar).
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 15,37; 54,85; 109,51; 117,37 (*d*, *J*= 4,75 Hz); 121,66; 122,70 (*d*, *J*= 9,67 Hz); 129,73 (*d*, *J*= 2,94 Hz); 132,65 (*d*, *J*= 2,75 Hz); 145,61 (*d*, *J*= 244,55 Hz); 160,89; 161,60 (*d*, *J*= 34,19 Hz).
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para C₁₁H₁₀FO₃⁻: 209,06 g/mol; Massa observada: 209,1 g/mol [M-H]⁻; Pureza (CLAE): 100,0%; Tempo de retenção: 3,723. (Apêndice 43)

4.7.3.10 Dados e caracterização de ácido 2-fluoro-3-(tiofen-3-il) acrílico (10c)



Sólido branco

Rendimento: 55,14%

PF: 122 – 124 °C

Massa molar: 172,00 g/mol

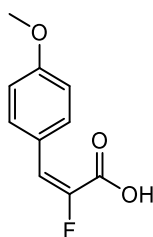
Fórmula molecular: C₇H₅FO₂S

Fator de retenção: 0,6 (Hex:ActOEt + AcOH 2:8)

- RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7,08 (*d*, 1H, *J*= 21,12 Hz, CH=CF); 7,41-7,66 (*m*, 2H, H-Tiofeno); 7,96-8,02 (*m*, 1H, H-Tiofeno).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 115,95 (*d*, *J*= 30,54 Hz); 126,31; 129,86 (*d*, *J*= 5,10 Hz); 130,11 (*d*, *J*= 1,99 Hz); 131,76 (*d*, *J*= 10,43 Hz); 146,52 (*d*, *J*= 251,29 Hz); 162,09 (*d*, *J*= 35,64 Hz).
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para C₇H₄FO₂S⁻: 170,99 g/mol; Massa observada: 171,0 g/mol [M-H]⁻; Pureza (CLAE): 96,04%; Tempo de retenção: 3,766. (Apêndice 44)

4.7.3.11 Dados e caracterização de ácido 2-fluoro-3-(4-metoxifenil) acrílico (11c)

Sólido branco



Rendimento: 77,91%

PF: 115 – 116 °C

Massa molar: 196,05 g/mol

Fórmula molecular: C₁₀H₉FO₃

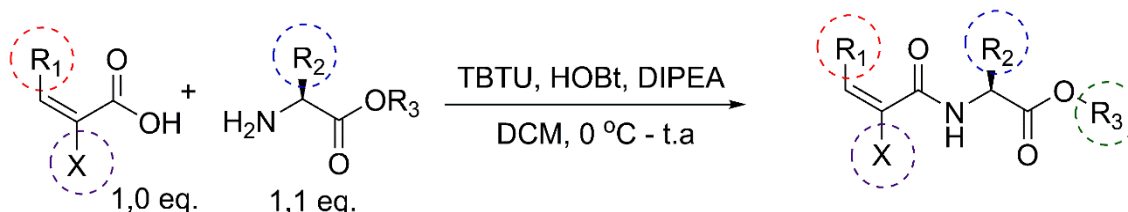
Fator de retenção: 0,75 (Hex:ActOEt 1:1)

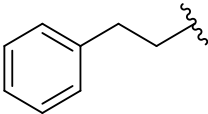
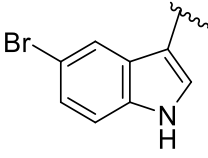
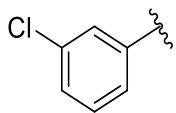
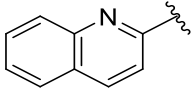
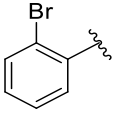
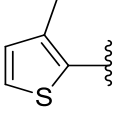
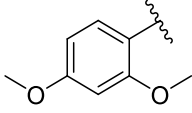
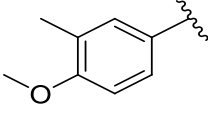
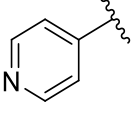
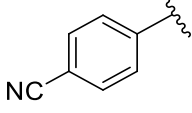
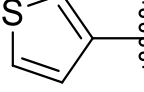
- RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 3,77-3,79 (*m*, 3H, OCH₃); 6,91-7,05 (*m*, 3H, H-Ar e CH=CF); 7,58-7,67 (*m*, 2H, H-Ar).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 55,63; 113,96; 121,31 (*d*, *J*= 27,76 Hz); 123,38 (*d*, *J*= 10,43 Hz); 132,26 (*d*, *J*= 2,73 Hz); 146,28 (*d*, *J*= 249,59 Hz); 160,13; 162,11 (*d*, *J*= 36,00 Hz).
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para C₁₀H₈FO₃⁻: 195,05 g/mol; Massa observada: 195,1 g/mol [M-H]⁻; Pureza (CLAE): 99,15%; Tempo de retenção: 7,735. (Apêndice 45)

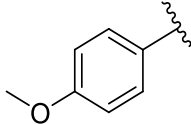
4.7.4 Reações de acoplamento de amida através de agentes de acoplamento (1d-25d)

Em uma adaptação da metodologia de Fuchs et al. (2023), 3 mmol (1,0 eq.) do requerido ácido carboxílico (1b-17b/1c-11c), 1,2 eq. de HOBt e 1,2 eq. de TBTU foram adicionados a 10 mL de DCM em um balão de fundo redondo selado. O sistema foi purgado com gás argônio e a mistura foi resfriada a 0°C. Uma segunda mistura foi preparada contendo DIPEA (3,5 eq.), a respectiva amina (1,0 eq.) e 5 mL de DCM. O segundo sistema também foi purgado com gás argônio e após esse processo, o conteúdo foi gotejado no primeiro balão, dissolvendo todo o conteúdo. A mistura foi mantida sob agitação por 12-24 horas, e após o consumo dos reagentes ser constatado por CCD, a reação foi interrompida pela adição de água, extraída com DCM (3 x 15 mL). A fase orgânica foi separada, tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada a vácuo. O produto foi então purificado por cromatografia em coluna.

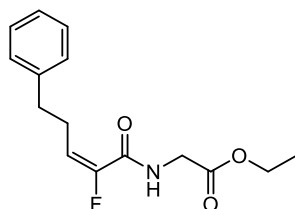
Esquema 5. Metodologia da reação de acoplamento de amida (1d-25d).



Código	X	R ₁	R ₂	R ₃
1d	F		H	Etil
2d	F		CH ₃	Metil
3d	F		CH ₂ Phe	Metil
4d	F		H	Etil
5d	F		CH ₃	Metil
6d	F		CH ₂ Phe	Metil
7d	CN		CH ₂ Indol	Etil
24d	F		CH ₂ CH ₂ Phe	Etil
25d	CN		CH ₂ CH ₂ Phe	Etil
8d	F		H	Etil
15d	CN		CH ₂ CH ₂ Phe	Etil
16d	F		CH ₂ CH ₂ Phe	Etil
9d	F		CH ₃	Metil
10d	F		H	Etil
11d	F		H	Etil
12d	F		H	Etil
13d	CN		CH ₂ CH ₂ Phe	Etil
14d	F		CH ₂ CH ₂ Phe	Etil
17d	CN		CH ₂ CH ₂ Phe	Etil
18d	F		CH ₂ CH ₂ Phe	Etil
19d	F		CH ₂ CH ₂ Phe	Etil
20d	CN		CH ₂ CH ₂ Phe	Etil
21d	F		CH ₂ CH ₂ Phe	Etil
22d	CN		CH ₂ CH ₂ Phe	Etil

23d	F		CH ₂ CH ₂ Phe	Etil
-----	---	---	-------------------------------------	------

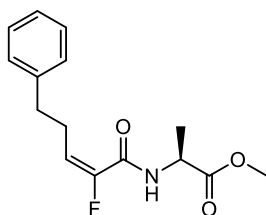
4.7.4.1 Dados e caracterização de etil 2-fluoro-5-fenilpent-2-enoil glicinato (1d)



Óleo transparente
 Rendimento: 55,00%
 Massa molar: 279,13 g/mol
 Fórmula molecular: C₁₅H₁₈FNO₃
 Fator de retenção: 0,42 (CyHex:ActOEt 8:2)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 1,24 (*d*, 3H, *J*= 7,12 Hz, CH₃); 2,73-2,78 (*m*, 2H, CH₂); 2,90-2,98 (*m*, 2H, CH₂); 4,03 (*d*, 2H, *J*= 6,01 Hz, CH₂); 4,16 (*q*, 2H, *J*= 7,12 Hz, CH₂); 5,83 (*dt*, 1H, *J*= 24,16 e 8,01 Hz, CH=CF); 7,16-7,32 (*m*, 5H, H-Ar); 7,86 (*sl*, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 14,53; 27,47 (*d*, *J*= 5,85 Hz); 36,02 (*d*, *J*= 1,95 Hz); 41,26; 61,56; 119,84 (*d*, *J*= 17,73 Hz); 126,85; 129,24; 129,29; 142,26; 150,28 (*d*, *J*= 256,70 Hz); 161,51 (*d*, *J*= 32,77 Hz); 170,07. (Apêndice 46)

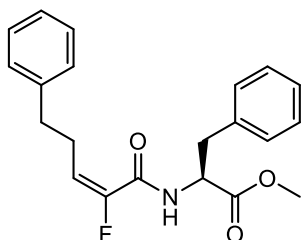
4.7.4.2 Dados e caracterização de metil (2-fluoro-5-fenilpent-2-enoil) -L-alaninato (2d)



Óleo transparente
 Rendimento: 64,20%
 Massa molar: 279,13 g/mol
 Fórmula molecular: C₁₅H₁₈FNO₃
 Fator de retenção: 0,43 (CyHex:ActOEt 8:2)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 1,43 (*d*, 3H, *J*= 7,29 Hz, CH₃); 2,72-2,78 (*m*, 2H, CH₂); 2,82-2,98 (*m*, 2H, CH₂); 3,70 (*qui*, 3H, CH₃); 4,50-4,60 (*m*, 1H, CH); 5,81 (*dt*, 1H, *J*= 24,10 e 8,0 Hz, CH=CF); 7,16-7,32 (*m*, 5H, H-Ar); 7,75 (*sl*, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 16,59; 26,51 (*d*, *J*= 5,96 Hz); 35,07 (*d*, *J*= 2,23 Hz); 47,56; 51,56; 118,85 (*d*, *J*= 17,79 Hz); 125,91; 128,29; 128,36; 141,31; 149,27 (*d*, *J*= 256,77 Hz); 159,97 (*d*, *J*= 33,07 Hz); 172,44. (Apêndice 47)

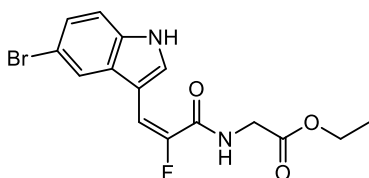
4.7.4.3 Dados e caracterização de metil (2-fluoro-5-fenilpent-2-enoil) -L-fenil alaninato (3d)



Óleo transparente
Rendimento: 48,10%
Massa molar: 355,16 g/mol
Fórmula molecular: C₂₁H₂₂FN₂O₃
Fator de retenção: 0,49 (CyHex:ActOEt 8:2)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 2,66-2,74 (*m*, 2H, CH₂); 2,84-2,92 (*m*, 2H, CH₂); 3,09-3,28 (*m*, 2H, CH₂); 3,70 (*s*, 3H, CH₃); 4,77-4,84 (*m*, 1H, CH); 5,78 (*dt*, 1H, *J*= 24,10 e 7,97 Hz, CH=CF); 7,16-7,34 (*m*, 10H, H-Ar); 7,60 (*sl*, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 27,40 (*d*, *J*= 5,90 Hz); 35,97 (*d*, *J*= 2,13 Hz); 37,74; 52,56; 54,19; 119,97 (*d*, *J*= 17,58 Hz); 126,85; 127,67; 129,22; 129,29; 129,31; 130,10; 137,99; 142,20; 150,07 (*d*, *J*= 256,91 Hz); 160,95 (*d*, *J*= 32,93 Hz); 172,30. (Apêndice 48)

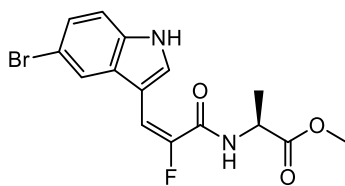
4.7.4.4 Dados e caracterização de etil (3-(5-bromo-1H-indol-3-il) -2-fluoroacrilóil) glicinato (4d)



Óleo vermelho
Rendimento: 47,23%
Massa molar: 368,02 g/mol
Fórmula molecular: C₁₅H₁₄BrFN₂O₃
Fator de retenção: 0,56 (CyHex:ActOEt 1:1)

- RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,21 (*t*, 3H, *J*= 7,0 Hz, CH₃); 3,95 (*d*, 2H, *J*= 5,91 Hz, CH₂); 4,12 (*q*, 2H, *J*= 7,1v0 Hz, CH₂); 7,20-7,29 (*m*, 2H, H-Ar e CH=CF); 7,38-7,41 (*m*, 1H, H-Ar); 8,04 (*d*, 1H, *J*= 1,74 Hz, H-Ar); 8,60 (*d*, 1H, *J*= 2,70 Hz, H-Ar); 8,72-8,73 (*m*, 1H, NH); 11,76 (*sl*, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 14,55; 41,15; 61,02; 105,00 (*d*, *J*= 10,62 Hz); 110,86 (*d*, *J*= 29,80 Hz); 113,11; 114,32; 121,03; 124,77; 130,10 (*d*, *J*= 2,21 Hz); 131,57 (*d*, *J*= 4,21 Hz); 134,84; 146,67 (*d*, *J*= 248,58 Hz); 161,36 (*d*, *J*= 32,82 Hz); 169,98. (Apêndice 49)

4.7.4.5 Dados e caracterização de metil (3-(5-bromo-1H-indol-3-il) -2-fluoroacrilóil)-L-alaninato (5d)



Óleo vermelho

Rendimento: 39,73%

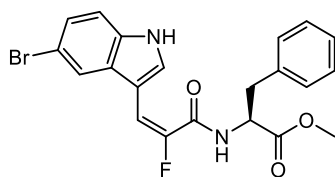
Massa molar: 368,02 g/mol

Fórmula molecular: C₁₅H₁₄BrFN₂O₃

Fator de retenção: 0,47 (CyHex:ActOEt 1:1)

- RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,48 (*d*, 3H, *J*= 7,28 Hz, CH₃); 3,71 (*s*, 3H, CH₃); 4,68-4,78 (*m*, 1H, CH); 7,15 (*d*, 1H, *J*= 27,55 Hz, CH=CF); 7,27-2,45 (*m*, 2H, H-Ar); 7,81 (*d*, 1H, *J*= 5,13 Hz, NH aa); 7,97 (*d*, 1H, *J*= 1,80 Hz, H-Ar); 8,80 (*m*, 1H, H-Ar); 10,90 (*sl*, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 16,67; 47,82; 51,56; 105,20; 110,20 (*d*, *J*= 30,44 Hz); 113,07; 113,57 (*d*, *J*= 3,71 Hz); 120,43; 124,65; 130,05; 131,39 (*d*, *J*= 80,03 Hz); 134,74 (*d*, *J*= 11,50 Hz); 149,66 (*d*, *J*= 206,02 Hz); 160,24; 172,63. (Apêndice 50)

4.7.4.6 Dados e caracterização de metil (3-(5-bromo-1H-indol-3-il)-2-fluoroacrilóil)-L-fenil alaninato (6d)



Sólido rosa claro

Rendimento: 30,00%

Massa molar: 444,05 g/mol

Fórmula molecular: C₂₁H₁₈BrFN₂O₃

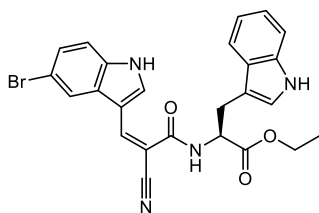
Fator de retenção: 0,70 (CyHex:ActOEt 1:1)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 3,15-3,32 (*m*, 2H, CH₂); 3,71 (*s*, 1H, CH₃); 4,84-4,92 (*m*, 1H, CH); 7,13 (*d*, 1H, *J*= 27,53 Hz, CH=CF); 7,21-7,31 (*m*, 6H, H-Ar); 7,43-7,46 (*m*, 1H, H-Ar); 7,65 (*d*, 1H, *J*= 5,99 Hz, NH aa); 7,95 (*d*, 1H, *J*= 1,84 Hz, H-Ar); 8,75 (*s*, 1H, H-Ar); 10,88 (*s*, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 36,90; 51,61; 53,51; 105,21 (*d*, *J*= 10,55 Hz); 110,40 (*d*, *J*= 30,62 Hz); 113,11; 113,57 (*d*, *J*= 3,63 Hz); 120,43; 124,67; 126,73; 128,38; 129,17; 130,03; 131,50 (*d*, *J*= 4,27 Hz); 134,80; 137,15; 146,49 (*d*, *J*= 248,26 Hz); 160,49 (*d*, *J*= 32,60 Hz); 171,53. (Apêndice 51)

4.7.4.7 Dados e caracterização de etil (3-(5-bromo-1H-indol-3-il)-2-cianoacrilóil)-L-triptofanato (7d)

Sólido amarelo

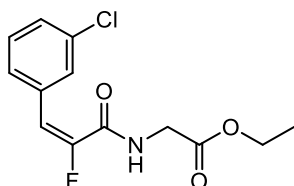
Rendimento: 35,00%



Massa molar: 504,08 g/mol
 Fórmula molecular: C₂₅H₂₁BrN₄O₃
 Fator de retenção: 0,37 (CyHex:ActOEt 1:1)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 1,22 (t, 3H, J= 7,12 Hz, CH₃); 3,413,44 (m, 2H, CH₂); 4,16 (q, 2H, J= 7,12 Hz, CH₂); 4,89-4,96 (m, 1H, CH); 7,02-7,14 (m, 2H, H-Ar); 7,30 (s, 1H, H-Ar); 7,39-7,44 (m, 2H, H-Ar); 7,56-7,58 (m, 1H, H-Ar); 7,63-7,67 (m, 1H, H-Ar); 8,10-8,11 (m, 1H, CH=CCN); 8,48-8,58 (m, 2H, H-Ar); 10,16 (sl, 1H, NH); 11,58 (sl, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 13,52; 27,17; 54,03; 60,91; 97,77; 109,76; 109,97; 111,41; 114,40; 114,87; 118,00; 118,30; 118,86; 121,18; 121,44; 123,47; 126,27; 127,73; 129,26; 131,32; 135,09; 136,72; 142,61; 161,39; 171,39. (Apêndice 52)

4.7.4.8 Dados e caracterização de etil (3-(3-clorofenil)-2-fluoroacrilóil) glicinato (8d)

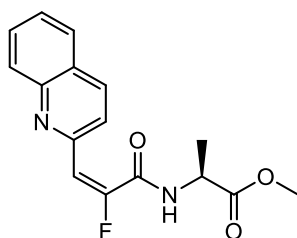


Sólido branco
 Rendimento: 74,55%
 Massa molar: 285,06 g/mol
 Fórmula molecular: C₁₃H₁₃ClFNO₃
 Fator de retenção: 0,34 (CyHex:ActOEt 8:2)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 1,24 (t, 3H, J= 7,12 Hz, CH₃); 4,09 (d, 2H, J= 5,94 Hz, CH₂); 4,16 (q, 2H, J= 7,12 Hz, CH₂); 6,83 (d, 1H, J= 26,69 Hz, CH=CF); 7,35-7,37 (m, 2H, H-Ar); 7,61-7,65 (m, 1H, H-Ar); 7,92-7,94 (m, 1H, H-Ar); 8,14 (sl, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 13,58; 40,63; 60,72; 117,06 (d, J= 28,31 Hz); 128,36 (d, J= 1,06 Hz); 128,98 (d, J= 2,87 Hz); 129,47; 130,01 (d, J= 2,89 Hz); 133,21 (d, J= 11,43 Hz); 133,25; 149,57 (d, J= 260,88 Hz); 159,83 (d, J= 33,26 Hz); 168,93. (Apêndice 53)

4.7.4.9 Dados e caracterização de metil (2-fluoro-3-(quinolin-2-il) acrilóil) -L-alaninato (9d)

Sólido amarelo
 Rendimento: 43,00%



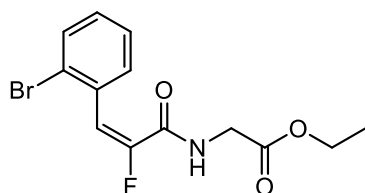
Massa molar: 302,11 g/mol

Fórmula molecular: C₁₆H₁₅FN₂O₃

Fator de retenção: 0,50 (CyHex:ActOEt 1:1)

- RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,41 (*d*, 3H, *J*= 7,30 Hz, CH₃); 3,67 (*s*, 3H, CH₃); 4,45-4,54 (*m*, 1H, CH); 7,10 (*d*, 1H, *J*= 37,34 Hz, CH=CF); 7,62-7,67 (*m*, 1H, H-Ar); 7,77-7,83 (*m*, 1H, H-Ar); 7,91 (*d*, 1H, *J*= 8,56 Hz, H-Ar); 7,99-8,04 (*m*, 2H, H-Ar); 8,45 (*d*, 1H, *J*= 8,61 Hz, H-Ar); 9,19 (*d*, 1H, *J*= 7,14 Hz, NH).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 16,97; 48,50 (*d*, *J*= 7,72 Hz); 52,55; 114,19 (*d*, *J*= 2,98 Hz); 122,48 (*d*, *J*= 10,43 Hz); 127,39; 127,91; 128,29; 129,50; 130,68; 137,46; 148,02; 151,56 (*d*, *J*= 4,05 Hz); 152,66 (*d*, *J*= 281,77 Hz); 159,76 (*d*, *J*= 31,06 Hz); 172,84. (Apêndice 54)

4.7.4.10 Dados e caracterização de etil (3-(2-bromo fenil)-2-fluoro acrilóil) glicinato (10d)



Sólido branco

Rendimento: 81,10%

Massa molar: 329,01 g/mol

Fórmula molecular: C₁₃H₁₃BrFNO₃

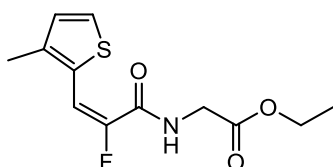
Fator de retenção: 0,27 (CyHex:ActOEt 8:2)

- RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,18 (*t*, 3H, *J*= 7,11 Hz, CH₃); 3,85 (*d*, 2H, *J*= 5,94 Hz, CH₂); 4,08 (*q*, 2H, *J*= 7,11 Hz, CH₂); 6,83 (*d*, 1H, *J*= 6,69 Hz, CH=CF); 7,22-7,34 (*m*, 2H, H-Ar); 7,45-7,48 (*m*, 1H, H-Ar); 7,62-7,65 (*m*, 1H, H-Ar); 8,99 (*t*, 1H, *J*= 5,79 Hz, NH).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 14,49; 41,08; 61,06; 116,89 (*d*, *J*= 26,82 Hz); 123,40 (*d*, *J*= 3,43 Hz); 127,46; 130,40; 132,22 (*d*, *J*= 2,23 Hz); 132,28; 132,43 (*d*, *J*= 11,47 Hz); 150,52 (*d*, *J*= 264,94 Hz); 159,66 (*d*, *J*= 32,73 Hz); 169,52. (Apêndice 55)

4.7.4.11 Dados e caracterização de etil (2-fluoro-3-(3-metil tiofen-2-il) acrilóil) glicinato (11d)

Sólido branco

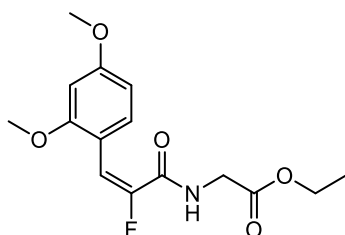
Rendimento: 81,43%



Massa molar: 271,07 g/mol
 Fórmula molecular: C₁₂H₁₄FNO₃S
 Fator de retenção: 0,62 (ActOEt:AcOH 99:1)

- RMN ¹H (400MHz, MeOD) δ (ppm): 1,19 (*t*, 3H, *J*= 7,13 Hz, CH₃); 2,13-2,21 (*m*, 3H, CH₃); 3,96 (*s*, 2H, CH₂); 4,12 (*q*, 2H, *J*= 7,13 Hz, CH₂); 6,80 (*d*, 1H, *J*= 5,18 Hz, H-Tiofeno); 6,89-7,02 (*m*, 1H, CH=CF); 7,31 (*d*, 1H, *J*= 5,16 Hz, H-Tiofeno).
- RMN ¹³C (100MHz, MeOD) δ (ppm): 13,07; 13,21; 40,29; 61,04; 111,65 (*d*, *J*= 32,66 Hz); 126,56 (*d*, *J*= 9,69 Hz); 128,52; 128,57; 141,60 (*d*, *J*= 6,09 Hz); 146,06 (*d*, *J*= 252,81 Hz); 161,41 (*d*, *J*= 33,12 Hz); 169,61. (Apêndice 56)

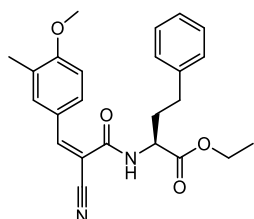
4.7.4.12 Dados e caracterização de etil (3-(2,4-dimetoxi fenil) -2-fluoro acrilóil) glicinato (12d)



Óleo transparente
 Rendimento: 77,30%
 Massa molar: 311,12 g/mol
 Fórmula molecular: C₁₅H₁₈FNO₅
 Fator de retenção: 0,28 (CyHex:ActOEt 8:2)

- RMN ¹H (400MHz, MeOD) δ (ppm): 1,28 (*t*, 3H, *J*= 7,13 Hz, CH₃); 3,81 (*s*, 3H, OCH₃); 3,84 (*s*, 3H, OCH₃); 3,99 (*s*, 2H, CH₂); 4,20 (*q*, 2H, *J*= 7,13 Hz, CH₂); 6,46-6,52 (*m*, 2H, H-Ar); 6,87 (*d*, 1H, *J*= 26,41 Hz, CH=CF); 7,67 (*d*, 1H, *J*= 8,52 Hz, H-Ar).
- RMN ¹³C (100MHz, MeOD) δ (ppm): 13,04; 40,39; 54,41; 54,67; 60,96; 97,17; 104,29; 111,84 (*d*, *J*= 10,24 Hz); 113,52 (*d*, *J*= 28,23 Hz); 131,92; 148,12 (*d*, *J*= 251,90 Hz); 158,56 (*d*, *J*= 2,57 Hz); 161,97; 169,52. (Apêndice 57)

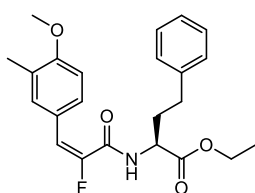
4.7.4.13 Dados e caracterização de etil 2-(2-ciano-3-(4-metoxi-3-metil fenil) acrilamida)-4-fenilbutanoato (13d)



Óleo amarelo claro
 Rendimento: 40,0%
 Massa molar: 406,19 g/mol
 Fórmula molecular: C₂₄H₂₆N₂O₄
 Fator de retenção: 0,33 (CyHex: ActOEt 8:2)

- RMN ^1H (400MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 1,24-1,26 (t, 3H, CH_3); 2,16-2,32 (m, 5H, CH_2 e CH_3); 2,76-2,82 (m, 2H, CH_2); 3,96 (s, 3H, CH_3); 4,16-4,23 (dq, 2H, $J = 7,1$ e $1,76$ Hz, CH_2); 4,58-4,66 (m, 1H, CH); 7,11-7,14 (m, 1H, H-Ar); 7,16-7,33 (m, 5H, H-Ar); 7,62-7,65 (m, 1H, NH); 7,86-7,96 (m, 2H, H-Ar); 8,15 (s, 1H, $\text{CH}=\text{CCN}$).
- RMN ^{13}C (100MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 13,61; 15,44; 31,74; 33,13; 52,95; 55,34; 60,96; 101,24; 110,61; 116,80; 124,35; 126,00; 127,22; 128,38; 128,46; 131,10; 132,90; 141,13; 151,43; 161,25; 161,62; 171,44.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4^+$: 407,20 g/mol; Massa observada: 407,47 g/mol $[\text{M}+\text{H}]^+$; Pureza (LC): 95,37%; Tempo de retenção: 9,298 min. (Apêndice 58)

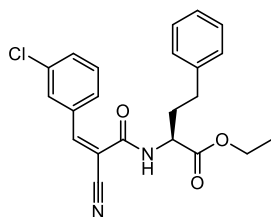
4.7.4.14 Dados e caracterização de etil 2-(2-fluoro-3-(4-metoxi-3-metil fenil) acrilamida) -4-fenilbutanoato (14d)



Óleo transparente
 Rendimento: 37,50%
 Massa molar: 399,18 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{FNO}_4$
 Fator de retenção: 0,63 (CyHex: ActOEt 8:2)

- RMN ^1H (400MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 1,25 (t, $J = 7,11$ Hz, 3H, CH_3); 2,10-2,28 (m, 5H, CH_2 e CH_3); 2,66-2,78 (m, 2H, CH_2); 4,14-4,21 (dq, $J = 7,11$ e $1,54$ Hz, 2H, CH_2); 4,52-4,59 (m, 1H, CH); 6,71 (d, $J = 28,26$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CF}$); 6,89 (d, $J = 8,54$ Hz, 1H, H-Ar); 7,16-7,36 (m, 5H, H-Ar); 7,63 (m, 1H, H-Ar); 7,68-7,71 (m, 1H, H-Ar); 7,85 (d, $J = 6,64$ Hz, 1H, NH).
- RMN ^{13}C (100MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 13,59; 15,40; 31,78; 33,05; 52,00; 54,82; 60,80; 109,52; 118,28 (d, $J = 27,50$ Hz); 122,80 (d, $J = 10,65$ Hz); 125,54; 126,00; 128,36; 128,43; 129,95 (d, $J = 2,76$ Hz); 132,87 (d, $J = 2,66$ Hz); 141,12; 148,13 (d, $J = 253,26$ Hz); 158,34; 160,23 (d, $J = 33,43$ Hz); 171,39.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{FNO}_4^+$: 400,19 g/mol; Massa observada: 400,145 g/mol $[\text{M}+\text{H}]^+$; Pureza (LC): 98,75%; Tempo de retenção: 9,287 min. (Apêndice 59)

4.7.4.15 Dados e caracterização de etil 2-(3-(3-clorofenil) -2-cianoacrilamida) -4-fenilbutanoato (15d)



Óleo amarelo

Rendimento: 55,0%

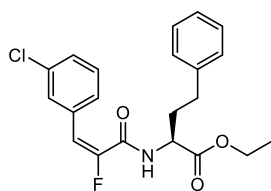
Massa molar: 396,12 g/mol

Fórmula molecular: C₂₂H₂₁ClN₂O₃

Fator de retenção: 0,39 (CyHex: ActOEt 8:2)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 1,26 (t, J= 7,11 Hz, 3H, CH₃); 2,14-2,35 (m, 2H, CH₂); 2,72-2,88 (m, 2H, CH₂); 4,16-4,24 (dq, J= 7,1 e 8,06 Hz, 2H, CH₂); 4,57-4,65 (m, 1H, CH); 7,17-7,33 (m, 5H, H-Ar); 7,6-7,67 (m, 2H, H-Ar); 7,87 (d, J= 7,45 Hz, 1H, NH); 7,97-8,06 (m, 2H, H-Ar); 8,25 (s, 1H, CH=CCN).
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 13,59; 31,74; 32,98; 53,06; 61,01; 107,27; 115,61; 126,02; 128,39; 128,46; 128,61; 129,78; 130,91; 132,04; 134,17; 134,52; 141,07; 149,94; 160,38; 171,22.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para C₂₂H₂₂ClN₂O₃⁺: 397,13 g/mol; Massa observada: 397,09 g/mol [M+H]⁺; Pureza (LC): 96,03%; Tempo de retenção: 9,258 min. (Apêndice 60)

4.7.4.16 Dados e caracterização de etil 2-(3-(3-cloro fenil) -2-fluoro acrilamida) -4-fenilbutanoato (16d)



Óleo branco

Rendimento: 25,13%

Massa molar: 389,12 g/mol

Fórmula molecular: C₂₁H₂₁ClFNO₃

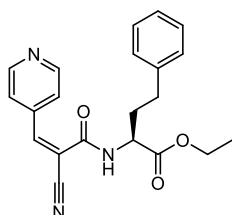
Fator de retenção: 0,62 (CyHex: ActOEt 8:2)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 1,22-1,27 (t, J= 7,11 Hz, 3H, CH₃); 2,09-2,28 (m, 2H, CH₂); 2,67-2,81 (m, 2H, CH₂); 4,13-4,21 (dq, J= 7,11 e 1,69 Hz, 2H, CH₂); 4,50-4,57 (m, 1H, CH); 6,82 (d, J= 26,10 Hz, 1H, CH=CF); 7,16-7,40 (m, 3H, CH₃); 7,59-7,63 (m, 1H, H-Ar); 7,89 (m, 1H, H-Ar); 8,09 (d, J= 6,17 Hz, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 13,58; 31,79; 32,91; 51,98; 60,88; 116,55 (d, J= 28,08 Hz); 126,02; 128,31; 128,38; 128,44; 128,83 (d,

$J = 2,83$ Hz); 129,54; 129,87 (d , $J = 2,83$ Hz); 133,29; 133,30 (d , $J = 11,47$ Hz); 141,05; 150,20 (d , $J = 261,45$ Hz); 159,73 (d , $J = 33,24$ Hz); 171,20.

- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $C_{21}H_{22}ClFNO_3^+$: 390,13 g/mol; Massa observada: 390,03 g/mol $[M+H]^+$; Pureza (LC): 100,0%; Tempo de retenção: 9,235 min. (Apêndice 61)

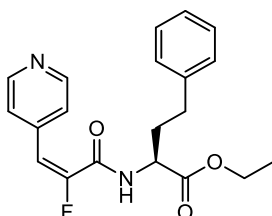
4.7.4.17 Dados e caracterização de etil 2-(2-ciano-3-(piridin-4-il) acrilamida) - 4-fenilbutanoato (17d)



Óleo transparente
Rendimento: 20,0%
Massa molar: 363,16 g/mol
Fórmula molecular: $C_{21}H_{21}N_3O_3$
Fator de retenção: 0,3 (CyHex: ActOEt 8:2)

- RMN 1H (400MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 1,26 (t , $J = 7,11$ Hz, 3H, CH_3); 2,14-2,35 (m , 2H, CH_2); 2,75-2,84 (m , 2H, CH_2); 4,16-4,24 (dq , $J = 7,1$ e 1,75 Hz, 2H, CH_2); 4,59-4,66 (m , 1H, CH); 7,16-7,33 (m , 5H, H-Ar); 7,83-7,85 (m , 2H, H-Ar); 7,99 (d , $J = 7,56$ Hz, 1H, NH); 8,25 (s , 1H, $CH=CCN$); 8,81-8,83 (m , 2H, H-Ar).
- RMN ^{13}C (100MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 13,61; 31,75; 32,92; 53,13; 61,08; 110,45; 115,05; 123,04; 126,05; 128,42; 128,47; 139,03; 141,03; 149,17; 150,89; 160,06 e 171,16.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $C_{21}H_{22}N_3O_3^+$: 364,17 g/mol; Massa observada: 364,20 g/mol $[M+H]^+$; Pureza (LC): 98,61%; Tempo de retenção: 8,987 min. (Apêndice 62)

4.7.4.18 Dados e caracterização de etil 2-(2-fluoro-3-(piridin-4-il) acrilamida) - 4-fenilbutanoato (18d)



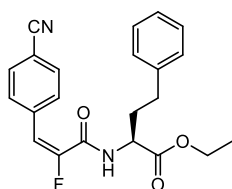
Óleo transparente
Rendimento: 68,40%
Massa molar: 356,15 g/mol
Fórmula molecular: $C_{20}H_{21}FN_2O_3$
Fator de retenção: 0,39 (CyHex: ActOEt 1:1)

- RMN 1H (400MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 1,22-1,28 (m , 3H, CH_3); 2,11-2,29 (m , 2H, CH_2); 2,70-2,83 (m , 2H, CH_2); 4,14-4,22 (m , 2H, CH_2); 4,49-4,63

(*m*, 1H, CH); 6,76-6,99 (*m*, 1H, CH=CF); 7,17-7,33 (*m*, 5H, H-Ar); 7,57-7,60 (*m*, 2H, H-Ar); 8,20 (*m*, 1H, NH); 8,54-8,67 (*m*, 2H, H-Ar).

- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 13,58; 31,78; 32,83; 52,05; 60,92; 115,14 (*d*, *J* = 27,4 Hz); 124,16 (*d*, *J* = 2,9 Hz); 126,04; 128,39; 128,43; 128,47; 138,51; 139,05 (*d*, *J* = 12,0 Hz); 141,05 (*d*, *J* = 4,8 Hz); 149,51; 159,63; 171,17 (*d*, *J* = 8,2 Hz).
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para C₂₀H₂₂FN₂O₃⁺: 357,16 g/mol; Massa observada: 357,11 g/mol [M+H]⁺ (Apêndice 63)

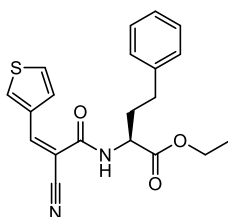
4.7.4.19 Dados e caracterização de etil 2-(3-(4-cianofenil)-2-fluoro acrilamida) -4-fenilbutanoato (19d)



Óleo transparente
Rendimento: 47,62%
Massa molar: 380,15 g/mol
Fórmula molecular: C₂₂H₂₁FN₂O₃
Fator de retenção: 0,64 (CyHex: ActOEt 7:3)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 1,22-1,28 (*m*, 3H, CH₃); 2,10-2,29 (*m*, 2H, CH₂); 2,67-2,81 (*m*, 2H, CH₃); 4,12-4,23 (*m*, 2H, CH₂); 4,49-4,63 (*m*, 1H, CH); 6,87-7,07 (*m*, 1H, CH=CF); 7,17-7,32 (*m*, 5H, H-Ar); 7,73-7,75 (*m*, 2H, H-Ar); 7,84-7,91 (*m*, 2H, H-Ar); 8,16 (*m*, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 13,57; 31,78; 32,85; 52,12; 60,91; 111,58; 116,09; 117,41 (*d*, *J* = 142,04 Hz); 126,04; 128,39; 128,42; 130,92 (*d*, *J* = 2,67 Hz); 131,59; 136,25 (*d*, *J* = 11,87 Hz); 141,01; 150,92 (*d*, *J* = 264,93 Hz); 159,54 (*d*, *J* = 33,22 Hz); 171,15.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para C₂₂H₂₂FN₂O₃⁺: 381,16 g/mol; Massa observada: 381,12 g/mol [M+H]⁺; Pureza (LC): 99,77%; Tempo de retenção: 9,0 min. (Apêndice 64)

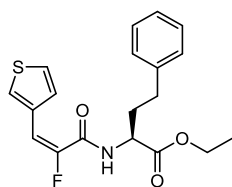
4.7.4.20 Dados e caracterização de etil 2-(2-ciano-3-(tiofen-3-il) acrilamida) -4-fenilbutanoato (20d)



Sólido rosa claro
Rendimento: 42,0%
Massa molar: 368,12 g/mol
Fórmula molecular: C₂₀H₂₀N₂O₃S
Fator de retenção: 0,20 (CyHex: ActOEt 8:2)

- RMN ^1H (400MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 1,26 (*t*, J = 7,11 Hz, 3H, CH_3); 2,14-2,34 (*m*, 2H, CH_2); 2,71-2,83 (*m*, 2H, CH_2); 4,15-4,23 (*dq*, J = 7,11 e 1,67 Hz, 2H, CH_2); 4,57-4,64 (*m*, 1H, CH); 7,16-7,33 (*m*, 5H, H-Ar); 7,71-7,76 (*m*, 2H, H-Tiofeno e NH); 7,91-7,93 (*m*, 1H, H-Tiofeno); 8,28 (*s*, 1H, $\text{CH}=\text{CCN}$); 8,39-8,41 (*m*, 1H, H-Tiofeno).
- RMN ^{13}C (100MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 13,59; 31,73; 33,06; 52,96; 60,95; 103,16; 116,48; 126,00; 126,64; 128,12; 128,38; 128,46; 134,93; 135,22; 141,11; 144,92; 160,94; 171,34.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$: 369,13 g/mol; Massa observada: 369,07 g/mol $[\text{M}+\text{H}]^+$; Pureza (LC): 99,44%; Tempo de retenção: 8,956 min. (Apêndice 65)

4.7.4.21 Dados e caracterização de etil 2-(2-fluoro-3-(tiofen-3-il) acrilamida) -4-fenilbutanoato (21d)

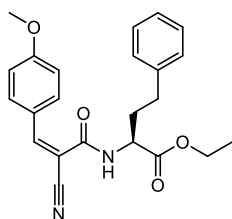


Óleo amarelo
 Rendimento: 27,50%
 Massa molar: 361,43 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{FNO}_3\text{S}$
 Fator de retenção: 0,49 (CyHex: ActOEt 8:2)

- RMN ^1H (400MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 1,25 (*t*, J = 7,11 Hz, 3H, CH_3); 2,1-2,31 (*m*, 2H, CH_2); 2,7-2,82 (*m*, 2H, CH_2); 4,14-4,22 (*dq*, J = 7,11 e 1,86 Hz, 2H, CH_2); 4,55-4,62 (*m*, 1H, CH); 6,89 (*d*, J = 27,79 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CF}$); 7,16-7,32 (*m*, 5H, H-Ar); 7,42-7,45 (*m*, 1H, H-Tiofeno); 7,66-7,68 (*m*, 1H, H-Tiofeno); 7,95 (*d*, J = 6,27 Hz, 1H, NH); 8,20-8,21 (*m*, 1H, H-Tiofeno).
- RMN ^{13}C (100MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 13,59; 31,81; 33,01; 52,03; 60,84; 112,85 (*d*, J = 30,10 Hz); 124,94; 126,01; 128,37; 128,44; 129,03 (*d*, J = 5,16 Hz); 130,41 (*d*, J = 1,76 Hz); 131,69 (*d*, J = 10,95 Hz); 141,11; 148,48 (*d*, J = 255,46 Hz); 160,13 (*d*, J = 33,12 Hz); 171,37.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{FNO}_3\text{S}^+$: 362,12 g/mol; Massa observada: 362,06 g/mol $[\text{M}+\text{H}]^+$; Pureza (LC): 99,45%; Tempo de retenção: 9,078 min. (Apêndice 66)

4.7.4.22 Dados e caracterização de etil 2-(2-ciano-3-(4-metoxi fenil) acrilamida) -4-fenilbutanoate (22d)

Sólido branco



Rendimento: 50,64%

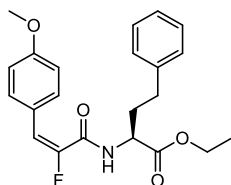
Massa molar: 392,17 g/mol

Fórmula molecular: C₂₃H₂₄N₂O₄

Fator de retenção: 0,25 (CyHex: ActOEt 8:2)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 1,26 (*t*, *J*= 7,11 Hz, 3H, CH₃); 2,14-2,34 (*m*, 2H, CH₂); 2,72-2,87 (*m*, 2H, CH₂); 4,33 (*s*, 3H, CH₃); 4,16-4,23 (*dq*, *J*= 7,11 e 1,66 Hz, 2H, CH₂); 4,57-4,65 (*m*, 1H, CH); 7,12-7,33 (*m*, 7H, H-Ar); 7,64 (*d*, *J*= 7,39 Hz, 1H, NH); 8,03-8,08 (*m*, 2H, H-Ar); 8,19 (*s*, 1H, CH=CCN);
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 13,59; 31,73; 33,11; 52,95; 55,19; 60,95; 101,67; 114,71; 116,69; 124,73; 126,00; 128,38; 128,46; 132,87; 141,13; 151,20; 161,14; 163,40; 171,40.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para C₂₃H₂₅N₂O₄⁺: 393,18 g/mol; Massa observada: 393,117 g/mol [M+H]⁺; Pureza (LC): 92,91%; Tempo de retenção: 9,069 min. (Apêndice 67)

4.7.4.23 Dados e caracterização de etil 2-(2-fluoro-3-(4-metoxifenil) acrilamida)-4-fenilbutanoato (23d)



Óleo transparente

Rendimento: 26,15%

Massa molar: 385,17 g/mol

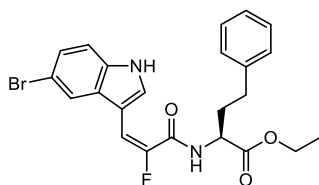
Fórmula molecular: C₂₂H₂₄FN₂O₄

Fator de retenção: 0,34 (CyHex: ActOEt 8:2)

- RMN ¹H (400MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 1,25 (*t*, *J*= 7,11 Hz, 3H, CH₃); 2,10-2,29 (*m*, 2H, CH₂); 2,67-2,79 (*m*, 2H, CH₂); 3,82 (*s*, 3H, CH₃); 4,14-4,21 (*dq*, *J*= 7,11 e 1,90 Hz, 2H, CH₂); 4,52-4,60 (*m*, 1H, CH); 6,76 (*d*, *J*= 28,31 Hz, 1H, CH=CF); 6,89-6,94 (*m*, 2H, H-Ar); 7,16-7,32 (*m*, 5H, H-Ar); 7,79-7,89 (*m*, 2H, H-Ar); 7,88 (*d*, *J*= 6,50 Hz, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 13,59; 31,80; 33,03; 52,02; 54,69; 60,82; 113,39; 118,29 (*d*, *J*= 27,94 Hz); 123,21 (*d*, *J*= 10,97 Hz); 126,00; 128,37; 128,43; 132,28 (*d*, *J*= 2,77 Hz); 141,12; 148,14 (*d*, *J*= 253,87 Hz); 160,22 (*d*, *J*= 33,47 Hz); 160,27; 171,38.

- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $C_{22}H_{25}FNO_4^+$: 386,18 g/mol; Massa observada: 386,125 g/mol $[M+H]^+$; Pureza (LC): 100,0%; Tempo de retenção: 9,089 min. (Apêndice 68)

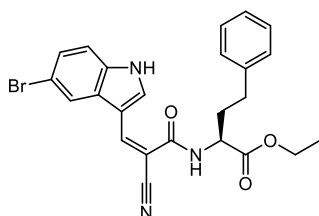
4.7.4.24 Dados e caracterização de etil 2-(3-(5-bromo-1H-indol-3-il)-2-fluoroacrilamida)-4-fenilbutanoato (24d)



Sólido branco
Rendimento: 38,72%
Massa molar: 472,08 g/mol
Fórmula molecular: $C_{23}H_{22}BrFN_2O_3$
Fator de retenção: 0,47 (CyHex: ActOEt 7:3)

- RMN 1H (400MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 1,25 (*t*, J = 7,11 Hz, 3H, CH_3); 2,12-2,32 (*m*, 2H, CH_2); 2,71-2,81 (*m*, 2H, CH_2); 4,15-4,22 (*dq*, J = 7,11 e 1,99 Hz, 2H, CH_2); 4,59-4,66 (*m*, 1H, CH); 7,14-7,32 (*m*, 7H, H-Ar e $CH=CF$); 7,45 (*d*, J = 8,58 Hz, 1H, H-Ar); 7,82 (*d*, J = 6,11 Hz, 1H, NH); 7,98 (*d*, J = 1,83 Hz, 1H, H-Ar); 8,81 (*s*, 1H, H-Ar).
- RMN ^{13}C (100MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 13,60; 31,85; 33,17; 51,95; 60,78; 105,32 (*d*, J = 10,84 Hz); 110,23 (*d*, J = 30,51 Hz); 113,35 (*d*, J = 37,82 Hz); 113,55; 120,45; 124,66; 125,98; 128,36; 128,46; 130,06; 131,46 (*d*, J = 4,49 Hz); 134,83; 141,18; 146,71 (*d*, J = 248,88 Hz); 160,83 (*d*, J = 32,37 Hz); 171,60.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $C_{23}H_{23}BrFN_2O_3^+$: 473,09 g/mol; Massa observada: 473,042 g/mol $[M+H]^+$; Pureza (LC): 96,53%; Tempo de retenção: 9,297 min. (Apêndice 69)

4.7.4.25 Dados e caracterização de etil 2-(3-(5-bromo-1H-indol-3-il)-2-cianoacrilamida)-4-fenilbutanoato (25d)



Sólido amarelo
Rendimento: 57,0%
Massa molar: 479,08 g/mol
Fórmula molecular: $C_{24}H_{22}BrN_3O_3$
Fator de retenção: 0,57 (CyHex: ActOEt 1:1)

- RMN 1H (400MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 1,27 (*t*, J = 7,11 Hz, 3H, CH_3); 2,13-2,34 (*m*, 2H, CH_2); 2,74-2,85 (*m*, 2H, CH_2); 4,16-4,24 (*dq*, J = 7,11 e 1,60 Hz, 2H, CH_2); 4,60-4,63 (*m*, 1H, CH); 7,16-7,31 (*m*, 5H, H-Ar); 7,41-7,45

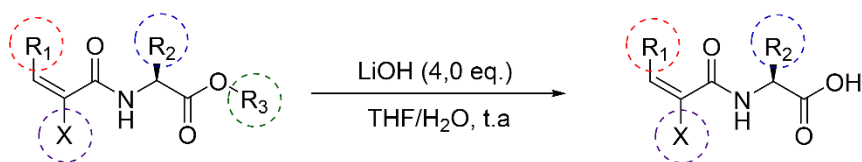
(*m*, 1H, H-Ar); 7,57-7,60 (*m*, 2H, H-Ar e NH); 8,14 (*d*, *J*= 1,81 Hz, 1H, CH=CCN); 8,85 (*s*, 1H, H-Ar); 8,63 (*s*, 1H, H-Ar).

- RMN ¹³C (100MHz, ACETONA-d₆) δ (ppm): 13,60; 31,81; 33,24; 52,77; 52,87; 60,87; 98,02; 109,98; 114,42; 114,85; 118,00; 121,15; 125,98; 126,27; 128,37; 128,46; 129,32; 131,35; 141,19; 142,59; 161,86; 171,64.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para C₂₄H₂₃BrN₃O₃⁺: 480,09 g/mol; Massa observada: 480,322 g/mol [M+H]⁺; Pureza (LC): 93,15%; Tempo de retenção: 9,07 min. (Apêndice 70)

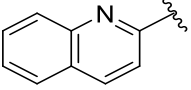
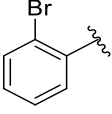
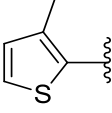
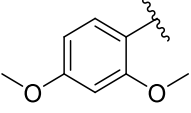
4.7.5 Síntese das acrilamidas α-substituídas através de hidrólise alcalina (1e-13e)

Seguindo o método descrito por Fuchs et al., (2023), os ésteres intermediários 1d-12d (1mmol, 1,0 eq) foram dissolvido em 5 mL de THF e mantidos sob agitação, onde foram adicionados gota a gota 4,0 eq. de LiOH monoidratado dissolvido em 5 mL de água. A mistura foi agitada por 5 h, e após o término da reação, o solvente orgânico foi removido sob pressão reduzida. O pH do líquido resultante foi ajustado com KHSO₄ para 3 e o precipitado formado filtrado.

Esquema 6. Metodologia de hidrólise e formação das acrilamidas (1e-13e)

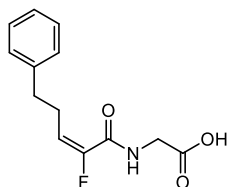


Código	X	R ₁	R ₂
1e	F		H
2e	F		CH ₃
3e	F		CH ₂ Phe
4e	F		H
5e	F		CH ₃
6e	F		CH ₂ Phe
7e	F		CH ₂ Indol
8e	CN		CH ₂ Indol
9e	F		H

10e	F		CH ₃
11e	F		H
12e	F		H
13e	F		H

Fonte: Autora, 2025.

4.7.5.1 Dados e caracterização de 2-fluoro-5-fenilpent-2-enoil glicina (1e)



Sólido branco

Rendimento: 84,70%

PF: 98 – 99 °C

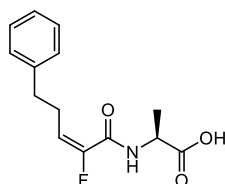
Massa molar: 251,10 g/mol

Fórmula molecular: C₁₃H₁₄FNO₃

Fator de retenção: 0,6 (ActOEt:AcOH 99:1).

- RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 2,66-2,71 (*m*, 2H, CH₂); 2,79-2,86 (*m*, 2H, CH₂); 3,79 (*d*, *J* = 5,97 Hz, 2H, CH₂); 5,82 (*dt*, *J* = 7,82 Hz, 1H, CH=CF); 7,15-7,35 (*m*, 5H, H-Ar); 8,59 (*m*, *J* = 5,68 Hz, 1H, NH); 12,70 (*s*, 1H, OH).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 26,68 (*d*, *J*= 5,78 Hz); 35,12 (*d*, *J*= 1,90 Hz); 40,83; 119,03 (*d*, *J*= 17,59 Hz); 126,39; 128,71; 128,78; 141,51; 149,45 (*d*, *J*= 256,91 Hz); 160,77 (*d*, *J*= 33,09 Hz); 171,18.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para C₁₃H₁₄FNO₃: 251,10 g/mol; Massa observada: 251,98 g/mol [M-H]⁻; Pureza (LC): 93,58%; Tempo de retenção: 4,817 min. (Apêndice 71)

4.7.5.2 Dados e caracterização de 2-fluoro-5-fenil pent-2-enoil-L-alanina (2e)



Sólido branco

Rendimento: 90,7%

PF: 83,5 – 84,5 °C

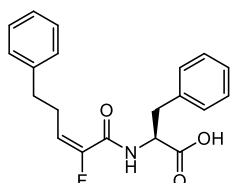
Massa molar: 265,11 g/mol

Fórmula molecular: C₁₄H₁₆FNO₃

Fator de retenção: 0,8 (ActOEt:AcOH 99:1).

- RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,32 (*d*, $J = 7,33$ Hz, 3H, CH_3); 2,65-2,72 (*m*, 2H, CH_2); 2,77-2,85 (*m*, 2H, CH_2); 4,30 (*qui*, $J = 7,21$ Hz, 1H, CH); 5,80 (*dt*, $J = 7,85$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CF}$); 7,15-7,31 (*m*, 5H, H-Ar); 8,51 (*sl*, 1H, NH); 12,63 (*s*, 1H, OH);
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 17,07; 26,68 (*d*, $J = 5,77$ Hz); 35,13 (*d*, $J = 1,85$ Hz); 47,74; 118,85 (*d*, $J = 17,50$ Hz); 126,39; 128,71; 128,78; 141,51; 149,45 (*d*, $J = 257,31$ Hz); 160,28 (*d*, $J = 33,32$ Hz); 174,02.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{FNO}_3^+$: 266,12 g/mol; Massa observada: 266,015 g/mol $[\text{M}+\text{H}]^+$; Pureza (LC): 96,0%; Tempo de retenção: 5,039 min. (Apêndice 72)

4.7.5.3 Dados e caracterização de 2-fluoro-5-fenilpent-2-enoil-L-fenilalanina (3e)

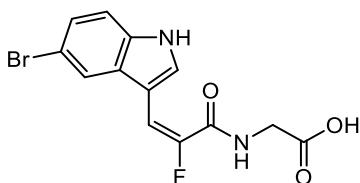


Óleo transparente
 Rendimento: 61,8%
 PF: 82 – 83 °C
 Massa molar: 341,14 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{FNO}_3$
 Fator de retenção: 0,72 (Hex: ActOEt 1:1 + AcOH)

- RMN ^1H (400MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 2,69-2,78 (*m*, 2H, CH_2); 2,81-2,93 (*m*, 2H, CH_2); 3,11-3,35 (*m*, 2H, CH_2); 4,77-4,86 (*m*, 2H, CH); 5,78 (*dt*, $J = 8,16$ Hz; 1H, $\text{CH}=\text{CF}$); 7,15-7,31 (*m*, 10H, H-Ar); 7,49 (*d*, $J = 6,24$ Hz, 1H, NH).
- RMN ^{13}C (100MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 26,47 (*d*, $J = 5,90$ Hz); 35,04 (*d*, $J = 2,14$ Hz); 36,67; 52,97; 118,90 (*d*, $J = 17,78$ Hz); 125,90; 126,68; 128,28; 128,33; 128,36; 129,22; 137,23; 141,29; 149,20 (*d*, $J = 256,85$); 160,01 (*d*, $J = 32,65$ Hz); 171,69.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{FNO}_3^+$: 342,15 g/mol; Massa observada: 342,114 g/mol $[\text{M}+\text{H}]^+$; Pureza (LC): 88,19%; Tempo de retenção: 5,979 min. (Apêndice 73)

4.7.5.4 Dados e caracterização de 3-(5-bromo-1H-indol-3-il) -2-fluoro acrilóil glicina (4e)

Sólido rosa claro
 Rendimento: 84,57%
 PF: 129,5 – 130,5 °C



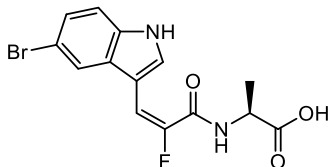
Massa molar: 339,99 g/mol

Fórmula molecular: $C_{13}H_{10}BrFN_2O_3$

Fator de retenção: 0,42 (Hex: ActOEt 1:1 + AcOH)

- RMN 1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,88 (*d*, J = 5,91 Hz, 2H, CH_2); 7,18-7,27 (*m*, 2H, NH (aa); $CH=CF$); 7,38-7,41 (*m*, 1H, $CH-Ar$); 8,04 (*d*, J = 1,69 Hz, 1H, $CH-Ar$); 8,60-8,63 (*m*, 2H, $C=CH$; $CH-Ar$); 11,76 (*d*, J = 1,94 Hz, 1H, NH).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 41,08; 105,02 (*d*, J =10,89 Hz); 110,64 (*d*, J =30,30 Hz); 113,09; 114,31; 121,01; 124,75; 130,12 (*d*, J = 2,1 Hz); 131,54; 134,83; 146,80 (*d*, J = 249,17); 161,23 (*d*, J = 32,58); 171,41.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $C_{13}H_{11}BrFN_2O_3^+$: 340,99 g/mol; Massa observada: 340,90 g/mol $[M+H]^+$; Pureza (LC): 97,85%; Tempo de retenção: 5,078 min. (Apêndice 74)

4.7.5.5 Dados e caracterização de 3-(5-bromo-1H-indol-3-il) -2-fluoro acrilóil) - L-alanina (5e)



Sólido branco

Rendimento: 93,7%

PF: 164,5 – 165,5 °C

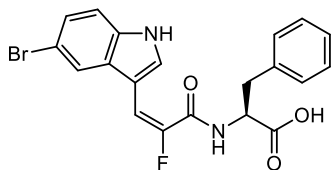
Massa molar: 354,00 g/mol

Fórmula molecular: $C_{14}H_{12}BrFN_2O_3$

Fator de retenção: 0,62 (Hex: ActOEt 1:1 + AcOH)

- RMN 1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,38 (*d*, J = 7,32 Hz, 3H, CH_3); 4,37 (*qui*, J = 7,2 Hz, 1H, CH [$CH-NH$ e $CH-CH_3 \pm 0,1$ Hz]); 7,16-7,27 (*m*, 2H, $CH=F$ e NH (aa)); 7,38-7,41 (*m*, 1H, $H-Ar$); 8,03 (*d*, J = 1,64 Hz, 1H, $H-Ar$); 8,52 (*m*, 1H, $H-Ar$); 8,59 (*m*, 1H, $H-Ar$); 11,74 (*d*, J = 1,94 Hz, 1H, NH).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 17,19; 48,01; 105,08 (*d*, J =10,56 Hz); 110,54 (*d*, J = 29,87 Hz); 113,07; 114,30; 121,02; 124,73; 130,08; 131,51; 134,83; 146,76 (*d*, J = 249,61); 160,75 (*d*, J = 32,89 Hz); 174,24.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $C_{14}H_{12}BrFN_2O_3$: 354,00 g/mol; Massa observada: 354,777 g/mol $[M]^+$; Pureza (LC): 99,04%; Tempo de retenção: 5,317 min. (Apêndice 75)

4.7.5.6 Dados e caracterização de 3-(5-bromo-1H-indol-3-il)-2-fluoro acrilóil)-L-fenilalanina (6e)



Sólido branco

Rendimento: 43,0%

PF: 151,8 – 152 °C

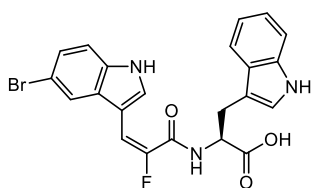
Massa molar: 430,03 g/mol

Fórmula molecular: C₂₀H₁₆BrFN₂O₃

Fator de retenção: 0,55 (Hex: ActOEt 1:1 + AcOH)

- RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 3,06-3,22 (*m*, 2H, CH₂); 4,56-4,63 (*m*, 1H, CH); 7,13-7,22 (*m*, 1H, CH=CF, NH (aa)); 7,23-7,29 (*m*, 5H, H-Ar); 7,37-7,40 (*m*, 1H, H-Ar); 8,02 (*d*, *J*= 1,59 Hz, 1H); 8,50 (*m*, 2H, H-Ar); 11,74 (*d*, *J*= 2,16 Hz, NH); 12,89 (*s*, 1H, OH).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 36,31; 53,94; 104,98 (*d*, *J*= 10,66 Hz); 110,72 (*d*, *J*= 30,07 Hz); 113,08; 114,29; 121,00; 124,74; 126,86; 128,68; 129,50; 130,09; 131,51; 134,80; 138,46; 146,56 (*d*, *J*= 249,27 Hz); 160,90 (*d*, *J*= 32,68 Hz); 173,19.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para C₂₀H₁₆BrFN₂O₃: 430,03 g/mol; Massa observada: 430,767 g/mol [M]⁻; Pureza (LC): 98,66%; Tempo de retenção: 6,154 min. (Apêndice 76)

4.7.5.7 Dados e caracterização de 3-(5-bromo-1H-indol-3-il)-2-fluoro acrilóil)-L-triptofano (7e)



Sólido branco

Rendimento: 93,90%

PF: 97 – 98 °C

Massa molar: 469,04 g/mol

Fórmula molecular: C₂₂H₁₇BrFN₃O₃

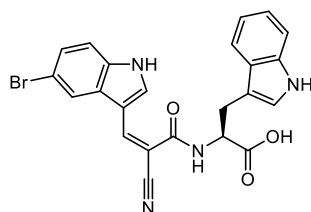
Fator de retenção: 0,75 (Hex: ActOEt 1:1 + AcOH)

- RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 3,26-3,35 (*m*, 2H, CH₂); 4,59-4,67 (*m*, 1H, CH); 6,95-7,09 (*m*, 2H, H-Ar); 7,14-7,26 (*m*, 3H, CH=CF, NH (aa); CH-Ar); 7,32-7,40 (*m*, 2H, H-Ar); 7,57 (*m*, 1H, H-Ar); 8,02 (*d*, *J*= 1,61 Hz, H-Ar); 8,32 (*m*, 1H, H-Ar); 8,54 (*m*, 1H, H-Ar); 10,85 (*m*, 1H, NH); 11,74 (*m*, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 26,78; 53,44; 105,00 (*d*, *J*= 70,76 Hz); 110,56; 110,73 (*d*, *J*= 30,02 Hz); 111,92; 113,08; 114,30; 118,56;

118,88; 120,99; 121,42; 124,09; 124,74; 127,60; 130,08; 131,57; 134,81; 136,57; 146,62 (*d*, *J*= 248,90 Hz); 160,89 (*d*, *J*= 32,45 Hz); 173,54.

- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $C_{22}H_{18}BrFN_3O_3^+$: 470,05 g/mol; Massa observada: 470,012 g/mol $[M+H]^+$; Pureza (LC): 98,37%; Tempo de retenção: 5,964 min. (Apêndice 77)

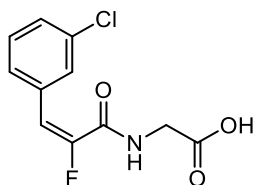
4.7.5.8 Dados e caracterização de 3-(5-bromo-1H-indol-3-il)-2-ciano acrilóil)-L-triptofano (8e)



Sólido amarelo
Rendimento: 40,74%
PF: 135 – 136 °C
Massa molar: 476,05 g/mol
Fórmula molecular: $C_{23}H_{17}BrN_4O_3$
Fator de retenção: 0,67 (Hex: ActOEt 1:1 + AcOH)

- RMN 1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,19-3,27 (*m*, 2H, CH_2); 4,60-4,67 (*m*, 1H, CH); 6,95-7,07 (*m*, 2H, H-Ar); 7,20 (*m*, 1H, H-Ar); 7,32-7,42 (*m*, 2H, H-Ar); 7,52-7,55 (*m*, 1H, H-Ar); 7,64 (*m*, 1H, H-Ar); 8,15 (*m*, 1H, CH=CCN); 8,41-8,46 (*m*, 3H, NH, H-Ar); 10,86 (*sl*, 1H, NH); 12,49 (*sl*, 1H, NH).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 27,22; 54,48; 98,73; 109,47; 110,61; 111,89; 114,79; 115,29; 118,69; 118,74; 118,83; 121,41; 121,48; 124,05; 126,34; 127,78; 129,46; 131,77; 135,26; 136,54; 142,02; 162,60; 173,61.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $C_{23}H_{18}BrN_4O_3^+$: 477,06 g/mol; Massa observada: 477,283 g/mol $[M+H]^+$; Pureza (LC): 98,40%; Tempo de retenção: 8,122 min. (Apêndice 78)

4.7.5.9 Dados e caracterização de 3-(3-cloro fenil)-2-fluoro acrilóil glicina (9e)

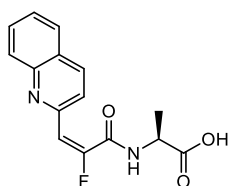


Sólido branco
Rendimento: 30,0%
PF: 68 – 69 °C
Massa molar: 257,03 g/mol
Fórmula molecular: $C_{11}H_9ClFNO_3$
Fator de retenção: 0,57 (Hex: ActOEt 1:1 + AcOH)

- RMN 1H (400MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 4,06 (*d*, *J*= 5,86 Hz, 2H, CH_2); 6,84 (*d*, *J*= 26,73 Hz, 1H, CH=CF); 7,33-7,35 (*m*, 2H, H-Ar); 7,61-7,64 (*m*, 1H, H-Ar); 7,93 (*m*, 1H, H-Ar); 8,08 (*m*, 1H, NH).

- RMN ^{13}C (100MHz, ACETONA- d_6) δ (ppm): 40,30; 117,00 (*d*, J = 28,44 Hz); 128,34; 128,35; 129,00 (*d*, J = 2,86 Hz); 129,47; 130,02 (*d*, J = 2,86 Hz); 133,24 (*t*, J = 5,84 Hz); 149,99 (*d*, J = 261,25 Hz); 159,72 (*d*, J = 33,25 Hz); 169,78.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{ClFNO}_3$: 257,03 g/mol; Massa observada: 257,936 g/mol $[\text{M}]^-$; Pureza (LC): 99,89%; Tempo de retenção: 4,671 min. (Apêndice 79)

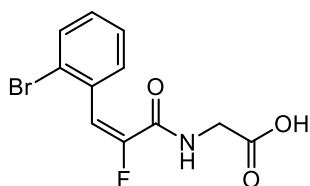
4.7.5.10 Dados e caracterização de 2-fluoro-3-(quinolin-2-il acrilil)-L-alanina (10e)



Sólido amarelo
 Rendimento: 58,0%
 PF: Degradou em 135 °C
 Massa molar: 288,09 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{O}_3$
 Fator de retenção: 0,375 (Hex: ActOEt 1:1 + AcOH)

- RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,40 (*d*, J = 7,27 Hz, 3H, CH_3); 4,41 (*qui*, J = 7,2 Hz, 1H, CH [CH-NH e $\text{CH-CH}_3 \pm 0,1$ Hz]); 7,09 (*d*, J = 37,35 Hz, 1H, CH); 7,62 (*m*, 1H, H-Ar); 7,77-7,82 (*m*, 1H, H-Ar); 7,90-7,93 (*m*, 1H, H-Ar); 7,99-8,04 (*m*, 2H, H-Ar e NH); 8,44-8,47 (*m*, 1H, H-Ar); 9,03-9,06 (*m*, 1H, H-Ar).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 17,09; 48,49; 113,99; 122,47 (*d*, J = 10,66 Hz); 127,39; 127,91; 128,31; 129,49; 130,70; 137,49; 148,02; 151,53 (*d*, J = 15,82 Hz); 152,95 (*d*, J = 261,61 Hz); 159,65 (*d*, J = 30,91 Hz); 173,91.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{FN}_2\text{O}_3^+$: 289,10 g/mol; Massa observada: 289,032 g/mol $[\text{M}+\text{H}]^+$; Pureza (LC): 99,09%; Tempo de retenção: 4,068 min. (Apêndice 80)

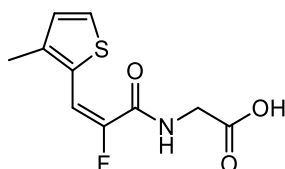
4.7.5.11 Dados e caracterização de 3-(2-bromofenil)-2-fluoroacrilil glicina (11e)



Sólido branco
 Rendimento: 87,45%
 PF: 147 – 148 °C
 Massa molar: 300,97 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{BrFNO}_3$
 Fator de retenção: 0,3 (Hex: ActOEt 1:1 + AcOH)

- RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,77 (*d*, J = 5,89 Hz, 2H, CH_2); 6,81 (*d*, J = 22,8 Hz, $\text{CH}=\text{CF}$); 7,24-7,33 (*m*, 2H, H-Ar); 7,47-7,50 (*m*, 1H, H-Ar); 7,62-7,64 (*m*, 1H, H-Ar); 8,89 (*t*, J = 5,52 Hz, NH).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 40,99; 116,71 (*d*, J = 27,33 Hz); 123,41 (*d*, J = 3,38 Hz); 127,44; 130,38; 132,26; 132,37; 132,53; 150,65 (*d*, J = 265,04 Hz); 159,55 (*d*, J = 32,70 Hz); 170,96.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{BrFNO}_3^+$: 301,98 g/mol; Massa observada: 301,957 g/mol $[\text{M}+\text{H}]^+$; Pureza (LC): 100,0%; Tempo de retenção: 4,587 min. (Apêndice 81)

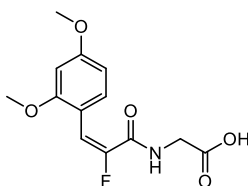
4.7.5.12 Dados e caracterização de 2-fluoro-3-(3-metil tiofen-2-il) acrilóil glicina (12e)



Sólido branco
 Rendimento: 44,0%
 PF: 150 – 151 °C
 Massa molar: 243,04 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{FNO}_3\text{S}$
 Fator de retenção: 0,75 (Hex: ActOEt 1:1 + AcOH)

- RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2,27 (*s*, 3H, CH_3); 3,85 (*d*, J = 5,81 Hz, 2H, CH_2); 6,93 (*d*, J = 5,15 Hz, 1H, H-Tiofeno); 7,06 (*d*, J = 27,35 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CF}$); 7,53 (*d*, J = 5,13 Hz, 1H, H-Tiofeno); 8,73 (*t*, J = 5,50 Hz, 1H, NH).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 14,78; 40,97; 111,69 (*d*, J = 32,25 Hz); 126,80 (*d*, J = 10,03 Hz); 129,92 (*d*, J = 4,52 Hz); 130,05; 142,06 (*d*, J = 6,13 Hz); 146,54 (*d*, J = 255,40 Hz); 160,60 (*d*, J = 32,67 Hz); 171,19.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{FNO}_3\text{S}$: 243,04 g/mol; Massa observada: 243,931 g/mol $[\text{M}]^-$; Pureza (LC): 98,57%; Tempo de retenção: 4,240 min. (Apêndice 82)

4.7.5.13 Dados e caracterização de 3-(2,4-dimetoxi fenil)-2-fluoro acrilóil glicina (13e)



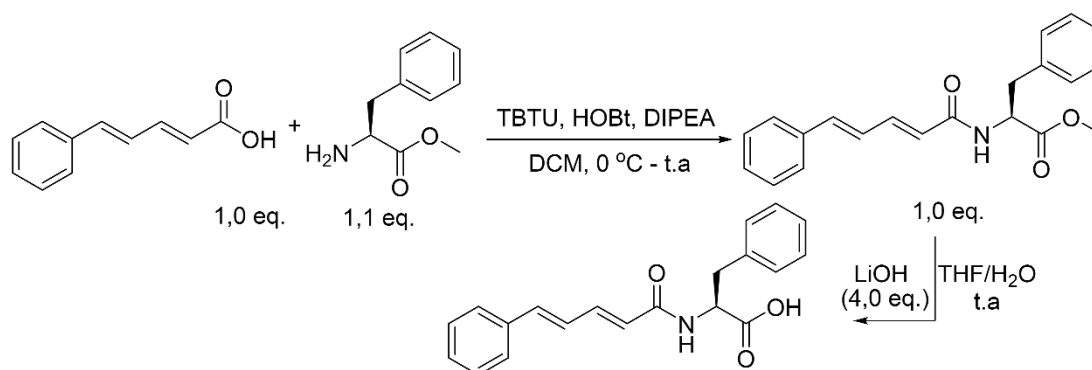
Sólido branco
 Rendimento: 41,20%
 PF: 136,6 – 137 °C
 Massa molar: 283,09 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{FNO}_5$
 Fator de retenção: 0,7 (Hex: ActOEt 1:1 + AcOH)

- RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,79 (*m*, 8H, CH_3 e CH_2); 6,46-6,55 (*m*, 2H, H-Ar); 6,77 (*d*, $J = 27,30$ Hz, $\text{CH}=\text{CF}$); 7,72 (*d*, $J = 8,61$ Hz, 1H, H-Ar); 8,69 (*t*, $J = 5,50$ Hz, 1H, NH); 12,66 (*s*, 1H, OH).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 41,03; 55,73; 56,09; 98,07; 105,17; 111,91 (*d*, $J = 10,44$ Hz); 112,75 (*d*, $J = 27,95$ Hz); 132,53; 148,81 (*d*, $J = 255,03$ Hz); 158,50 (*d*, $J = 2,78$ Hz); 160,52 (*d*, $J = 33,56$ Hz); 161,70; 171,16.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{FNO}_5$: 283,09 g/mol; Massa observada: 283,767 g/mol $[\text{M}]^-$; Pureza (LC): 99,62%; Tempo de retenção: 4,326 min. (Apêndice 83)

4.7.6 Síntese do derivado não substituído por CN ou F (1f e 2f)

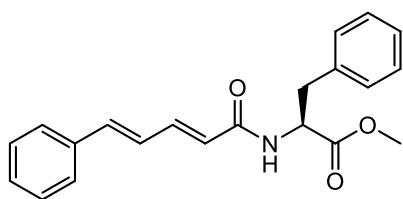
Para fins de comparação, um derivado não substituído por F ou CN foi sintetizado. A metodologia da reação de acoplamento utilizada foi a mesma anteriormente descrita, bem como a metodologia de hidrólise.

Esquema 7. Síntese do composto 2f – Derivado não α -substituído



Fonte: Autora, 2025.

4.7.6.1 Dados e caracterização de metil 5-fenilpenta-2,4-dienoil) -L-fenil alaninato (1f)



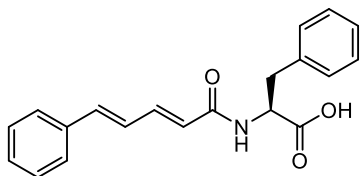
Sólido amarelo claro
 Rendimento: 89,29%
 Massa molar: 333,15 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_3$
 Fator de retenção: 0,13 (CyHex:ActOEt 8:2)

- RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2,90-3,11 (*m*, 2H, CH_2); 3,61 (*s*, 3H, CH_3); 4,64-4,61 (*m*, 1H, CH); 6,19 (*d*, 1H, $J = 14,67$ Hz, CH); 6,92-7,13 (*m*,

2H, CH); 7,17-7,40 (*m*, 9H, H-Ar e CH); 7,54-7,57 (*m*, 2H, H-Ar); 8,58 (*d*, 1H, $J = 7,80$ Hz, NH).

- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 37,17; 52,35; 54,23; 124,98; 127,02; 127,27; 127,47; 128,72; 129,08; 129,23; 129,49; 136,66; 137,73; 138,98; 140,49; 165,58; 172,63. (Apêndice 84)

4.7.6.2 Dados e caracterização de 5-phenilpenta-2,4-dienoil-L-fenil alanina (2f)



Sólido rosa claro
Rendimento: 99,14%
PF: 179 – 180 °C

Massa molar: 321,14 g/mol
Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_3$
Fator de retenção: 0,62 (ActOEt:AcOH 99:1)

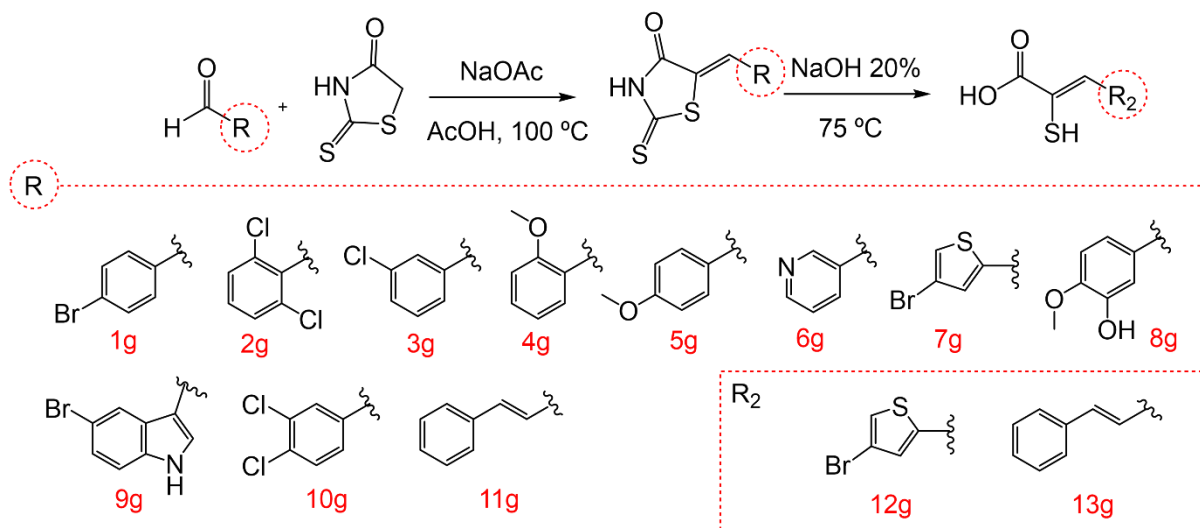
- RMN ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2,90 (*dd*, $J = 13,8$; 9,7 Hz, 1H, CH_2); 3,11 (*dd*, $J = 13,8$; 4,8 Hz, 1H, CH_2); 4,53 (*ddd*, $J = 9,7$; 8,0; 4,7 Hz, 1H, CH); 6,20 (*m*, 1H, CH-CO); 6,91–7,39 (*m*, 11H, H-Ar, CH=CH); 7,55 (*m*, 2H, H-Ar); 8,45 (*d*, $J = 8,1$ Hz, 1H, NH); 12,52 (*s*, 1H, OH).
- RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 37,22; 54,12; 125,34; 126,88; 127,32; 127,45; 128,65; 129,04; 129,22; 129,52; 136,69; 138,18; 138,79; 140,19; 165,50; 173,59.
- LC MS (ESI) Método A: Massa calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_3^+$: 322,14 g/mol; Massa observada: 322,957 g/mol $[\text{M}+\text{H}]^+$; Pureza (LC): 98,45%; Tempo de retenção: 5,472 min. (Apêndice 85)

4.7.7 Síntese de derivados de rodanina (1g-10g)

A síntese dos derivados de rodanina foi feita através de uma condensação de Knoevenagel bem descrita na literatura (BREM et al., 2014; INAMOTO et al., 2008; ZHANG et al., 2018). Em um balão de fundo redondo foram adicionados 5mmol (1,0 eq.) de rodanina, 1,0 eq. do aldeído requerido, 2,5 eq. de acetato de sódio e 10 mL de ácido acético glacial. A mistura foi mantida sob agitação a 100 °C por 3 horas. Após o término da reação ser constatado por CCD, a reação foi resfriada à temperatura ambiente e foram adicionados 10 mL de água destilada. O precipitado formado foi filtrado sob vácuo e lavado com água. Para os compostos 7g e 11g, uma nova etapa foi realizada. Essa etapa foi a hidrólise do anel rodanina para formação de um novo composto α,β -insaturado substituído por tiol. Para tanto, 1,3

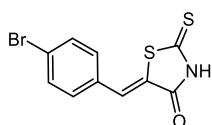
mmol do requerido intermediário foi adicionado a um balão de fundo redondo contendo 10 mL de uma solução de NaOH 20% (p.v). A mistura foi aquecida a 75 °C e mantida sob agitação por 2 horas. Ao fim da reação, a solução foi neutralizada com HCl (P.A) e o precipitado formado foi filtrado e seco.

Esquema 8. Metodologia de síntese dos derivados de rodanina.



Fonte: Autora, 2025.

4.7.7.1 Dados e caracterização de 5-(4-bromobenzilideno) -2-tioxotiazolidin-4-ona (1g)



Sólido marrom escuro

Rendimento: 74,0%

PF: 221 – 222 °C

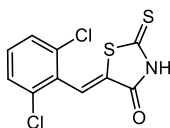
Massa molar: 298,91 g/mol

Fórmula molecular: C₁₀H₆BrNOS₂

Fator de retenção: 0,22 (Hex:ActOEt 95:5)

- RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7,53-7,52 (*m*, 2H, H-Ar); 7,62 (*s*, 1H, CH=C); 7,73-7,75 (*m*, 2H, H-Ar); 13,89 (*s*, 1H, NH).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 124,79; 126,83; 130,75; 132,68; 132,91; 169,81; 195,88.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para C₁₀H₆BrNOS₂: 298,91 g/mol; Massa observada: 298,2 g/mol [M]⁻; Pureza (CLAE): 97,267%; Tempo de retenção: 8,183 min. (Apêndice 86)

4.7.7.2 Dados e caracterização de 5-(2,6-diclorobenzilideno) -2-tioxotiazolidin-4-ona (2g)



Sólido amarelo escuro

Rendimento: 80,0%

PF: 173 – 175 °C

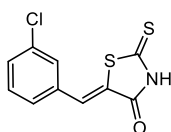
Massa molar: 288,92 g/mol

Fórmula molecular: C₁₀H₅Cl₂NOS₂

Fator de retenção: 0,33 (Hex:ActOEt 95:5)

- RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7,49-7,52 (*m*, 1H, H-Ar); 7,60-7,61 (*m*, 2H, H-Ar e CH=C).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 127,20; 129,32; 131,68; 132,48; 133,44; 134,70; 168,50; 195,73.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para C₁₀H₄Cl₂NOS₂⁻: 287,91 g/mol; Massa observada: 287,90 g/mol [M-H]⁻; Pureza (CLAE): 100,0%; Tempo de retenção: 7,654 min. (Apêndice 87)

4.7.7.3 Dados e caracterização de 5-(3-clorobenzilideno) -2-tioxotiazolidin-4-ona (3g)



Sólido amarelo escuro

Rendimento: 40,0%

PF: 225 – 226 °C

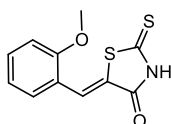
Massa molar: 254,96 g/mol

Fórmula molecular: C₁₀H₆ClNOS₂

Fator de retenção: 0,25 (Hex:ActOEt 95:5)

- RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7,52-7,57 (*m*, 3H, H-Ar); 7,64 (*s*, 1H, H-Ar); 7,69 (*s*, 1H, CH=C).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 56,04; 115,58; 122,75; 125,97; 132,35; 133,14; 161,84; 169,90; 195,98.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para C₁₀H₆ClNOS₂: 254,96 g/mol; Massa observada: 254,0 g/mol [M]⁻; Pureza (CLAE): 100,0%; Tempo de retenção: 3,861 min. (Apêndice 88)

4.7.7.4 Dados e caracterização de 5-(2-metoxibenzilideno) -2-tioxotiazolidin-4-ona (4g)



Sólido amarelo

Rendimento: 20,0%

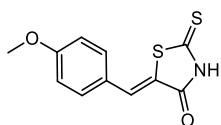
PF: 219 – 220 °C

Massa molar: 251,01 g/mol

Fórmula molecular: C₁₁H₉NO₂S₂
Fator de retenção: 0,22 (Hex:ActOEt 95:5)

- RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 3,90 (s, 3H, CH₃); 7,0-7,16 (m, 2H, H-Ar); 7,38-7,40 (m, 1H, H-Ar); 7,48-7,52 (m, 1H, H-Ar); 7,79 (s, 1H, CH=C).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 56,25; 112,46; 121,67; 121,79; 125,82; 127,19; 130,14; 133,45; 138,45; 158,61; 169,90; 196,53.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para C₁₁H₈NO₂S₂⁻: 250,00 g/mol; Massa observada: 250,0 g/mol [M-H]⁻; Pureza (CLAE): 100,0%; Tempo de retenção: 3,450 min. (Apêndice 89)

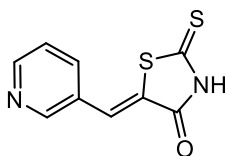
4.7.7.5 Dados e caracterização de 5-(4-metoxibenzilideno) -2-tioxotiazolidin-4-ona (5g)



Sólido amarelo escuro
Rendimento: 50,0%
PF: 240 – 241 °C
Massa molar: 251,32 g/mol
Fórmula molecular: C₁₁H₉NO₂S₂
Fator de retenção: 0,15 (Hex:ActOEt 95:5)

- RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 3,84 (s, 3H, CH₃); 7,11 (d, 2H, H-Ar); 7,57 (d, 2H, H-Ar); 7,61 (s, 1H, CH=C).
- RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 56,04; 115,58; 122,75; 125,97; 132,35; 133,14; 161,84; 169,90; 195,98.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para C₁₁H₈NO₂S₂⁻: 250,00 g/mol; Massa observada: 250,0 g/mol [M-H]⁻; Pureza (CLAE): 97,41%; Tempo de retenção: 8,116 min. (Apêndice 90)

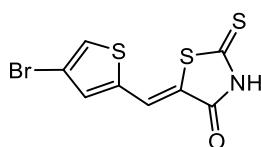
4.7.7.6 5-(piridin-3-ilmetileno) -2-tioxotiazolidin-4-ona (6g)



Sólido amarelo
Rendimento: 76,14%
PF: 242 – 243 °C
Massa molar: 221,99 g/mol
Fórmula molecular: C₉H₆N₂OS₂
Fator de retenção: 0,2 (Hex:ActOEt 1:1)

- RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 6,68 (s, 1H, CH=C); 7,56 (dd, $J=8,16$ e 4,77 Hz, H-Ar); 7,93-7,97 (m, 1H, H-Ar); 8,63 (dd, $J=4,78$ e 1,51 Hz, H-Ar); 8,84 (d, $J=2,28$ Hz, H-Ar).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 124,80; 128,38; 128,49; 129,62; 136,78; 151,15; 152,16; 169,84; 195,88.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_2\text{OS}_2^+$: 223,00 g/mol; Massa observada: 222,9 g/mol $[\text{M}+\text{H}]^+$; Pureza (CLAE): 100,0%; Tempo de retenção: 3,194. (Apêndice 91)

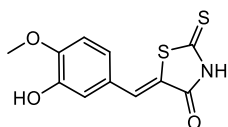
4.7.7.7 5-((4-bromotiofen-2-il) metileno) -2-tioxotiazolidin-4-ona (7g)



Sólido amarelo
 Rendimento: 72,00%
 PF: 236 - 238 °C
 Massa molar: 304,86 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_8\text{H}_4\text{BrNOS}_3$
 Fator de retenção: 0,32 (CyHex:ActOEt 8:2)

- RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,70-7,71 (m, 1H, H-Tiofeno); 7,86 (s, 1H, CH=C); 8,14-8,15 (m, 1H, H-Tiofeno).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 111,79; 123,53; 125,27; 131,23; 136,57; 139,15; 169,47; 194,72.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $\text{C}_8\text{H}_4\text{BrNOS}_3 + \text{Na}^+$: 327,85 g/mol; Massa observada: 327,00 g/mol $[\text{M}+\text{Na}]^+$; Pureza (CLAE): 97,86%; Tempo de retenção: 7,757 min. (Apêndice 92)

4.7.7.8 5-(3-hidroxi-4-metoxibenzilideno) -2-tioxotiazolidin-4-ona (8g)

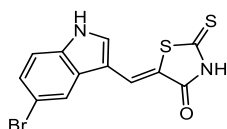


Sólido laranja
 Rendimento: 74,59%
 PF: 210 – 211 °C
 Massa molar: 267,00 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}_2$
 Fator de retenção: 0,12 (CyHex:ActOEt 8:2 + AcOH)

- RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3,83 (s, 3H, CH_3); 7,00 (d, 1H, $J=1,92$ Hz, H-Ar); 7,06-7,09 (m, 2H, H-Ar); 7,46 (s, 1H, CH=C); 9,54 (s, 1H, OH).

- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 56,17; 112,98; 116,45; 123,55; 124,67; 126,36; 131,93; 147,52; 150,74; 171,39; 196,80.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{NO}_3\text{S}_2^+$: 268,01 g/mol; Massa observada: 268,9 g/mol $[\text{M}+\text{H}]^+$; Pureza (CLAE): 100,0%; Tempo de retenção: 8,064 min. (Apêndice 93)

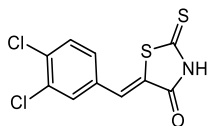
4.7.7.9 5-((5-bromo-1H-indol-3-il)metileno)-2-tioxotiazolidin-4-ona (9g)



Sólido vermelho escuro
 Rendimento: 50,0%
 PF: Degradou em 296 °C
 Massa molar: 337,92 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{BrN}_2\text{OS}_2$
 Fator de retenção: 0,26 (Hex:ActOEt 9:1)

- RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,34-7,37 (*m*, 1H, H-Ar); 7,44-7,47 (*m*, 1H, H-Ar); 7,82 (*d*, $J=2,74$ Hz, 1H, H-Ar); 7,93 (*s*, 1H, CH=C); 8,18 (*m*, 1H, H-Ar); 12,41 (*s*!, 1H, NH).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 111,02; 114,54; 114,90; 119,25; 121,71; 124,84; 126,29; 129,08; 131,31; 135,54; 169,56; 195,12.
- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{BrN}_2\text{OS}_2^-$: 336,91 g/mol; Massa observada: 336,9 g/mol $[\text{M}-\text{H}]^-$; Pureza (CLAE): 88,543%; Tempo de retenção: 8,977 min. (Apêndice 94)

4.7.7.10 Dados e caracterização de 5-(3,4-diclorobenzilideno) -2-tioxotiazolidin-4-ona (10g)

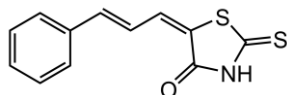


Sólido amarelo
 Rendimento: 82,26%
 PF: 318 – 320 °C
 Massa molar: 288,92 g/mol
 Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{Cl}_2\text{NOS}_2$
 Fator de retenção: 0,27 (CyHex:ActOEt 8:2)

- RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,49-7,53 (*m*, 1H, H-Ar); 7,60 (*s*, 1H, CH=C); 7,76-7,79 (*m*, 1H, H-Ar); 7,88 (*d*, 1H, $J=2,11$ Hz, H-Ar).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 128,50; 128,99; 129,71; 131,97; 132,59; 132,90; 133,42; 134,21; 169,97; 195,72.

- LC MS (ESI) Método B: Massa calculada para $C_{10}H_5Cl_2NOS_2 + K^+$: 327,92 g/mol; Massa observada: 328,92 g/mol $[M+K]^+$; Pureza (CLAE): 100,0%; Tempo de retenção: 4,339 min. (Apêndice 95)

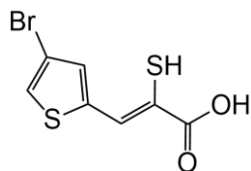
4.7.7.11 Dados e caracterização de 5-(3-fenilalilideno)-2-tioxotiazolidin-4-ona (11g)



Sólido amarelo escuro
 Rendimento: 63,0%
 Massa molar: 247,01 g/mol
 Fórmula molecular: $C_{12}H_9NOS_2$
 Fator de retenção: 0,41 (CyHex:ActOEt 8:2)

- RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 6,96-7,05 (*m*, 1H, CH); 7,31-7,42 (*m*, 5H, CH e H-Ar); 7,67-7,70 (*m*, 2H, H-Ar).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 124,20; 127,59; 128,47; 129,41; 130,43; 132,47; 136,03; 145,13; 169,22; 195,73. (Apêndice 96)

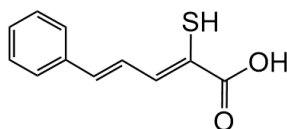
4.7.7.12 Dados e caracterização de ácido 3-(4-bromotiofen-2-il)-2-mercaptopacrilico (12g)



Sólido amarelo
 Rendimento: 86,21%
 Massa molar: 263,89 g/mol
 Fórmula molecular: $C_7H_5BrO_2S_2$

- RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,73-7,74 (*m*, 1H, H-Tiofeno); 8,00 (*m*, 1H, H-Tiofeno); 8,15 (*s*, 1H, CH=C).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 110,33; 125,31; 131,64; 139,05; 139,34; 139,53; 166,10. (Apêndice 97)

4.7.7.13 Dados e caracterização de ácido 2-mercaptop-5-fenilpenta-2,4-dienoico (13g)



Sólido amarelo
 Rendimento: 86,0%
 Massa molar: 206,04 g/mol
 Fórmula molecular: $C_{11}H_{10}O_2S$

- RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,18-7,53 (*m*, 7H, H-Ar e CH=CH); 7,71-7,75 (*m*, 1H, H-Ar).
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 124, 94; 127, 36; 128, 02; 129, 46; 130, 13; 136, 20; 143, 42; 148, 70; 166, 65. (Apêndice 98)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

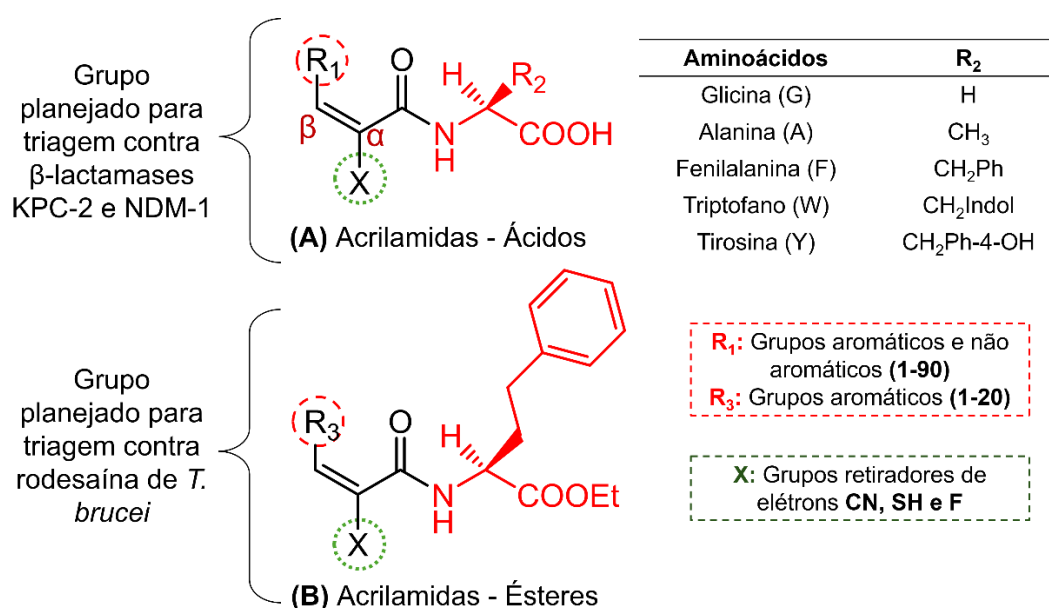
5.1 Planejamento baseado na estrutura de carbonilas α,β -insaturadas

Estruturalmente, uma molécula projetada como potencial inibidor de proteases do tipo serina e cisteína, deve conter um centro eletrofílico (*warhead*) que atue formando uma ligação com o resíduo catalítico, ligação essa que pode ser hidrolisada (inibidores reversíveis) ou permanecer covalentemente ligada ao sítio ativo da enzima (inibidores irreversíveis). Entre os muitos *warheads* já relatados, os aceptores de Michael são frequentemente considerados na busca por inibidores potenciais (POWERS et al., 2002), uma vez que as reações de Michael ocorrem através da adição conjugada de um nucleófilo (como tióis, enolatos e enaminas) a um composto α,β -insaturado (LITTLE et al., 1995). Os resíduos de Ser e Cys são nucleófilos que apresentam potencial como doadores de Michael (POWERS et al., 2002; SANTOS; MOREIRA, 2007), o que nos levou a propor a classe de derivados carbonílicos α,β -insaturadas como aceptores de Michael inibidores de proteases. Pensando nisso, uma biblioteca de compostos foi planejada, baseada na estrutura de acrilamidas e ésteres α,β -insaturados, de forma a desenhar potenciais aceptores de Michael, que possam atuar como inibidores de serino e cisteíno proteases.

Dois grupos de compostos foram planejados, são eles as acrilamidas (**A**) e ésteres acrilamida contendo o aminoácido HomoPhe (**B**), planejados como potenciais inibidores de β -lactamase e rodesaína, respectivamente. Para as estruturas de acrilamidas (**A**), inicialmente foram selecionados 90 grupos aromáticos diferentes para a posição R_1 (Apêndice 99), de forma a construir uma biblioteca variada de compostos, em que diversas propriedades químicas fossem comparadas. Em seguida, a fim de tornar a ligação dupla ainda mais susceptível ao ataque nucleofílico característico de reações de adição de Michael, foram avaliados grupos eletroretiradores a serem adicionados ao carbono α , tais como os grupos ciano ($C\equiv N$), tiol (SH) e flúor (Figura 31, página 141). Para adicionar a função amida, foram selecionados aminoácidos que pudessem atuar como unidade de reconhecimento na enzima, sendo eles: Glicina (G), Alanina (A), Fenil alanina (F), Triptofano (W) e Tirosina (Y), levando ao desenho de 1350 novos compostos. Outra característica importante dessa nova série de compostos é o seu potencial de atuar também como inibidores de metalo- β -lactamases. Como mencionado anteriormente, o grupo tiol apresenta um potencial de ligação com o átomo de zinco

(LI et al., 2022). Adicionalmente, o grupo ciano também pode formar uma coordenação com o metal, o que é conhecido em complexos de cianeto de zinco (CARVER, 2019), assim como derivados de ácido carboxílico. Dessa forma, o potencial dos compostos aqui planejados também foi avaliado contra uma MBL clinicamente relevante, a MBL de classe B1 NDM-1.

Figura 31. Alterações estruturais propostas no planejamento de novos derivados ésteres acrílicos e acrilamidas.



Fonte: Autora, 2025.

Pensando na atividade contra a cisteíno protease rodesaína, o grupo de compostos de ésteres acrilamida **(B)**, foi planejado com 20 substituintes aromáticos em R₃ (Apêndice 100) e apenas os grupos elétron retiradores F e CN na posição X (Figura 31, página 141). Essa restrição foi pensada com o objetivo de apresentar uma série que permitisse a comparação entre os dois grupos eletroretiradores. Além disso, pensando em uma provável interação com o sítio hidrofóbico S1 da enzima, apenas o aminoácido HomoPhe foi utilizado, uma vez que este já foi relatado em outros estudos do grupo de pesquisa (FUCHS et al., 2023; JUNG et al., 2021). Adicionalmente, a função ácida do aminoácido HomoPhe foi protegida através da manutenção do éster etílico correspondente.

5.2 Triagem virtual

5.2.1 Preparação de ligantes e enzimas

Uma vez desenhadas as modificações estruturais planejadas, o segundo passo consistiu na realização de uma triagem virtual baseada na estrutura do receptor para selecionar os candidatos a potenciais *hits*.

Sobre o grupo de compostos triados frente β -lactamases, a primeira etapa no estabelecimento da triagem virtual aqui realizada, foi o desenho dos ligantes, em que uma atenção especial foi dada a estereoquímica dos compostos e ao estado de protonação dos grupos ácidos. A próxima etapa consistiu na seleção da proteína a ser utilizada para os testes. As enzimas utilizadas para esse ensaio foram as do tipo KPC-2 (17 estruturas) e NDM-1 (25 estruturas), representantes de serino e metalo- β -lactamases respectivamente. A seleção da enzima foi feita através de um ensaio de *re-docking* em que foram calculados os valores de RMSD em cada algoritmo de cada um dos ligantes, o que permitiu a construção de um mapa de calor para cada enzima (Tabela 6, página 142 e Tabela 7, página 143). Através dos valores de média e somatório foi possível escolher qual algoritmo a ser utilizado, uma vez que um menor valor para ambos, reflete uma boa reprodutibilidade do ensaio em comparação à estrutura cristalizada. Dessa forma, foi escolhido o PDB de código 6TD0 para SBL junto ao algoritmo ChemScore (RMSD: 0,129), e PDB 4EY2 para MBL com o algoritmo ChemPLP (RMSD: 0,06).

O grupo de compostos triados para rodesaína teve a seleção da enzima a ser utilizada de forma diferente. Foi selecionado o PDB de código 2P7U, uma vez que ensaios computacionais anteriores já tinham sido realizados e publicados dentro do grupo de pesquisa AK Schirmeister, onde os testes foram realizados. Assim, foi realizado o ensaio de *re-docking* com esse PDB apenas no intuito de decidir qual algoritmo seria utilizado, sendo este o ChemScore, com RMSD de 1,4455 (Tabela 8, página 144).

Tabela 6. Mapa de calor contendo as estruturas cristalinas de SBLs e seus resultados de RMSD.

Serino β -lactamase (KPC-2)						
PDB	Ligante	Res. (Å)	Valor de RMSD (Software PyMol)			
			ChemPLP	GOLDScore	ChemScore	ASP
3RXX	3-NPBA	1.62	0,84	0,09	0,6	0,28
6MLL	composto 7	1.86	0,65	0,28	0,28	0,29
6D19	composto 9	1.45	0,391	1	1,178	1,153
6D17	composto 3	1.45	0,392	0,679	0,36	0,95

6TD0	vaborbactam	0.99	1,686	1,832	0,129	0,29
5LL7	fenil borônico	1.4	0,586	0,142	0,553	0,277
5UJ4	faropenem hidrolisado	1.4	1,252	1,012	0,89	0,258
6JN5	MS23	1.97	1,586	0,36	0,929	0,981
6D18	composto 6	1.35	0,404	0,829	1,246	0,846
6D16	composto 2	1.4	0,462	1,174	0,428	1,6
6J8Q	WL-001	1.787	0,528	0,597	0,935	0,99
6D15	composto 1	1.3	0,751	1,219	0,651	0,912
6JN3	MS05	2.216	0,657	1,337	0,892	0,729
6TD1	ácido fenil borônico	1.2	0,731	2,326	1,99	2,503
5UJ3	cefotaxima hidrolisada	1.45	2,898	1,393	0,897	1,607
3RXW	PSR3-226	1.26	1,999	1,454	1,995	1,95
5EEC	S02030 ácido borônico	1.87	2,641	3,619	3,512	2,786
Média			1,085529	1,13782	1,027352	1,082
Somatório			18,454	19,343	17,465	18,402

Cores mais próximas de verde indicam menores valores de RMSD; Cores mais próximas de vermelho indicam altos valores de RMSD.

Fonte: Autora, 2025.

Tabela 7. Mapa de calor contendo as estruturas cristalinas de MBLs e seus resultados de RMSD.

Metallo β-lactamase (NDM-1)						
PDB	Ligante	Res. (Å)	Valor de RMSD (Software PyMol)			
			ChemPLP	GOLDScore	ChemScore	ASP
4EYF	Benzilpenicilina hidrolisada	1.8	0,303	2,036	0,671	0,666
4EYL	meropenem hidrolisado	1.9	1,115	2,249	0,649	2,393
6IBV	inibidor borônico cpd 1	1.4	1,27	0,997	1,4	0,346
4EY2	metecilina hidrolisada	1.17	0,06	0,311	0,374	0,51
5N0H	meropenem hidrolisado	1.9	0,901	1,287	2,018	1,268
4EYB	oxacilina hidrolisada	1.16	0,532	0,432	0,918	0,764
6D1A	composto 1	1.25	0,281	0,871	0,932	1,023
6D1B	composto 2	1.25	1,654	1,432	1,895	1,482
6D1C	composto 3	1.25	1,123	1,682	1,718	1,975
6D1D	composto 4	1.4	1,132	1,234	1,421	1,548

6D1E	composto 7	1.15	0,532	0,432	0,918	0,764
6D1F	composto 8	1.15	0,981	0,871	0,36	1,023
6D1G	composto 9	1.15	0,398	0,456	0,829	0,985
6D1H	composto 11	1.25	1,341	1,682	1,174	1,975
6D1I	composto 12	1.1	1,453	1,234	0,597	1,548
6D1J	composto 13	1.15	0,532	0,432	1,219	0,764
6D1K	composto 14	1.2	0,981	0,871	1,337	1,023
6EFJ	composto 9	1.65	0,859	1,356	2,326	0,89
6MDU	composto 7	1.15	2,898	1,393	1,393	0,929
6RMF	VNRX-5133	1.51	1,999	1,454	1,995	1,246
6IBS	inibidor borônico cpd 6	1.37	2,641	3,109	3,012	2,428
6Q30	inibidor borônico cpd 5	1.5	0,731	0,697	0,872	0,935
6O3R	composição 7	1.3	1,523	1,732	1,992	0,651
5O2E	cefuroxima hidrolisada	1.3	1,239	1,432	1,895	0,892
4U4L	bistiazolidina	1.9	1,181	1,082	1,718	1,99
Média			1,1064	1,23056	1,34532	1,200
Somatório			27,66	30,764	33,633	30,01

Cores mais próximas de verde indicam menores valores de RMSD; Cores mais próximas de vermelho indicam altos valores de RMSD.

Fonte: Autora, 2025.

Tabela 8. Valores de RMSD calculados para a cisteína protease rodesaína nos diferentes algoritmos.

Cisteína protease Rodesaína						
PDB	Ligante	Res. (Å)	Valor de RMSD (Software PyMol)			
			ChemPLP	GOLDScore	ChemScore	ASP
2P7U	K777	1.65	4,2337	1,6596	1,4455	12,1823

Cores mais próximas de verde indicam menores valores de RMSD; Cores mais próximas de vermelho indicam altos valores de RMSD.

Fonte: Autora, 2025.

5.2.2 Critérios de seleção dos aprovados na triagem virtual

5.2.2.1 Grupo de acrilamidas contra β -lactamase

Como critério de seleção para os compostos triados inicialmente para KPC-2, foram selecionados apenas os ligantes que apresentaram pontuação superior ao ligante de referência, o fármaco vaborbactam (pontuação: 20,97). Dessa forma,

entre os 1350 compostos analisados, foram removidos apenas 6 compostos. O segundo filtro adicionado foi o cálculo da distância entre o carbono β dos ligantes e o oxigênio do resíduo de Ser70. Considerou-se uma distância máxima de 4,0 Å para uma provável interação catalítica. Dessa forma, foram aprovados apenas 37 compostos, sendo estes 2 α -substituídos com o grupo ciano, 15 com flúor, e 20 com o grupo tiol. Visando uma possível atividade dual, um terceiro filtro foi adicionado: os compostos selecionados também deveriam apresentar pontuação superior ao fármaco de referência na enzima NDM-1 (pontuação: 26,49), e coordenação com os dois átomos de zinco presentes no sítio catalítico da metalo enzima, resultando em 36 compostos aprovados.

Tabela 9. Compostos aprovados no grupo de acrilamidas. Pontuação dos complexos formados com KPC-2 e NDM-1; distância calculada entre o resíduo de Ser70/átomos de zinco e o carbono β da estrutura do ligante. Os compostos estão ordenados de acordo com a coluna distância da enzima KPC-2.

Códigos	KPC-2		NDM-1		
	Pontuação	Distância (Å)	Pontuação	Distância (Å) Zn302	Distância (Å) Zn303
AMSG2	22,10	3,107	58,27	2,54/2,57	2,43
AMFG33	21,73	3,127	66,41	2,51/2,53	2,45
AMFA33	22,77	3,212	66,78	2,54/2,61	2,61
AMFF23	25,10	3,249	83,45	2,51	2,43/2,89
AMSA58	22,08	3,264	62,93	2,61	2,31/2,54
AMSG16	23,25	3,364	67,61	2,51/2,57	2,53
AMSG58	21,97	3,365	62,71	2,54/2,57	2,45
AMSG23	23,36	3,372	64,94	2,51/2,57	2,47
AMFG81	26,03	3,395	67,87	2,51/2,61	2,43
AMSF23	25,38	3,452	80,37	2,37	3,51
AMFG46	22,52	3,486	66,27	2,51	2,48/3,85
AMSG43	22,65	3,514	60,85	2,47/2,54	2,54
AMSW33	26,88	3,526	91,61	2,61/2,15	2,64/2,94
AMFG83	26,34	3,533	67,84	2,46/2,54	2,48
AMSW16	28,79	3,566	88,61	1,99/2,64	2,64/2,85
AMSG27	23,57	3,571	56,98	2,57/2,60	2,47
AMFA72	22,48	3,630	68,30	2,49/2,54	2,83/3,97
AMSY59	25,43	3,633	71,90	2,51	2,45/3,86
AMFA81	25,48	3,710	64,66	2,48/2,50	2,56/2,61
AMFF81	28,86	3,717	82,04	2,44	2,47
AMSG47	23,76	3,731	62,04	2,40/2,64	2,40

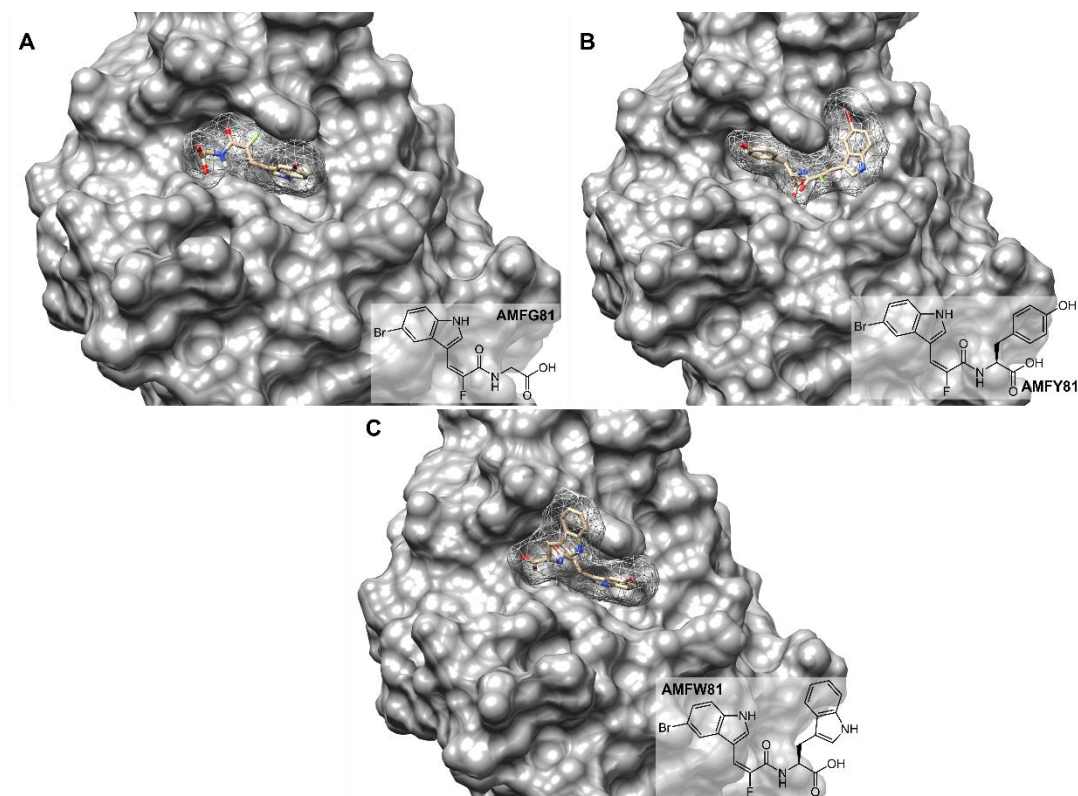
AMFW81	28,43	3,776	89,98	2,39	2,32/2,36
AMSF81	28,86	3,831	83,60	2,48/2,67	2,54
AMSG67	28,65	3,842	62,10	2,58	2,54
AMFG90	23,80	3,891	59,57	2,50/2,57	2,46
AMSG32	26,60	3,898	56,13	2,38/2,44	3,89
AMSW63	31,18	3,912	91,93	2,19/2,61	2,47/2,61
AMSW3	28,77	3,922	82,57	2,02/2,54	2,22
AMFG86	23,55	3,937	63,61	2,46/2,58	2,46/3,84
AMSG9	26,24	3,939	72,63	2,47/2,47	2,39/3,40
AMSA44	22,45	3,950	65,52	2,52/2,57	2,70
AMFG32	24,89	3,957	63,33	2,47/2,57	2,50/3,72
AMFG9	25,72	3,976	70,29	2,50/2,57	2,44/3,44
AMFG24	22,63	3,979	58,46	2,54/2,61	2,74/3,94
AMCW72	29,31	3,902	84,57	2,489	2,525

Legenda do código: O código é composto por três partes - AM código geral; X= C (ciano), F (flúor) ou S (tiol); A terceira parte é uma letra (A, G, W, F ou Y) a qual corresponde ao aminoácido que foi inserido (R₂); o número final, corresponde a qual substituinte aromático ou não aromático está em R₁.

Fonte: Autora, 2025.

A partir da lista de compostos aprovados, algumas características podem ser destacadas nos compostos triados para as β -lactamases. Embora diferentes aminoácidos tenham sido empregados de forma a permitir contatos dentro da estrutura que auxiliem a fixação do IBL potencial, a maioria dos compostos aprovados em todos os filtros (19 compostos de 36 aprovados) apresenta o aminoácido glicina (R₂= H) na sua estrutura. Essa tendência pode ser justificada pelo tamanho do sítio catalítico da KPC-2, o qual já foi citado como estreito e profundo, o que faria com que grupos volumosos dificultassem a aproximação do carbono β ao resíduo catalítico Ser70. A comparação entre os complexos de AMFG81 e AMFY81 demonstra essa tendência (Figura 32, página 147). AMFG81 é um composto aprovado na triagem que contém o aminoácido glicina. A distância entre o carbono β da estrutura e o resíduo catalítico de Ser70 é de 3,395 Å, enquanto para o composto contendo o aminoácido tirosina (AMFY81) a distância calculada foi de 8,269 Å. Apesar disso, 6 candidatos contendo o grupo triptofano foram selecionados. A análise do complexo revela que embora também seja um grupo volumoso, o anel indol desse aminoácido projeta-se para fora do bolso da enzima, o que permite um encaixe próximo ao resíduo catalítico (C, Figura 32, página 147).

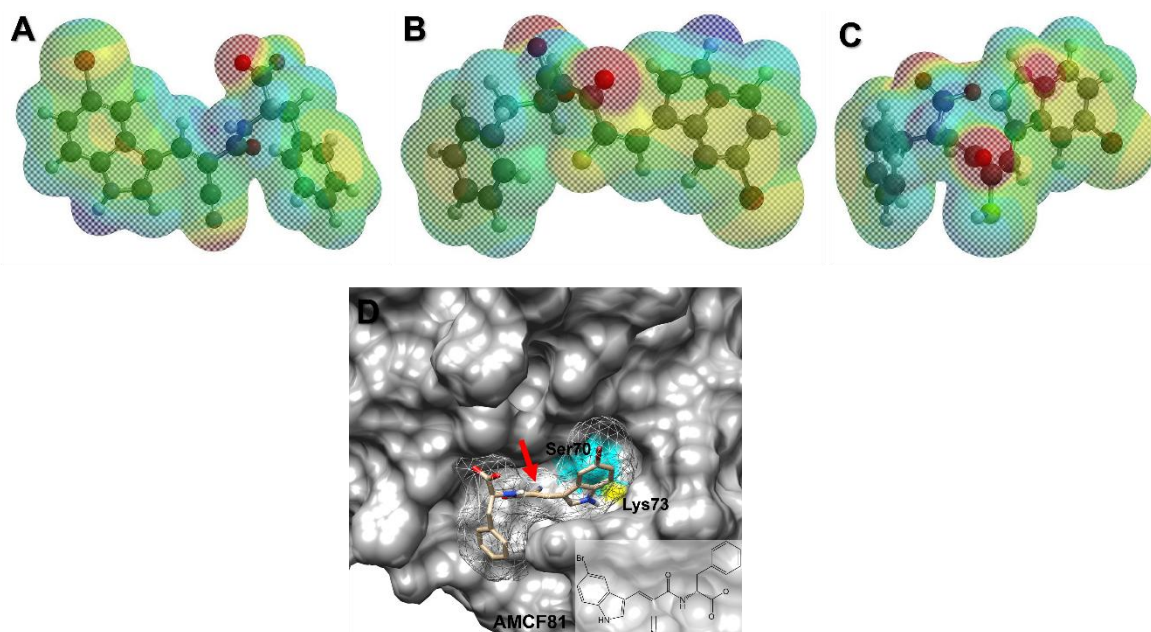
Figura 32. Comparação entre os complexos gerados para AMFG81 (A), AMFY81 (B) e AMFW81 (C) na enzima KPC-2 após o ensaio de *docking* molecular.



Fonte: Autora, 2025.

Outra tendência observada ao analisar os resultados de *docking*, é a ausência de compostos contendo o grupo ciano como substituinte em X. Todos os compostos triados nesse grupo apresentaram distâncias entre o carbono β e o resíduo de Ser70 superior ao limite de 4,0 Å. Uma teoria para esse resultado é levantada ao analisar as características de resíduos próximos a Ser70, como o aminoácido Lys73. Esse resíduo encontra-se protonado, o que pode levar a uma repulsão eletrostática entre Lys73 e as acrilamidas α substituídas por CN. Repulsão que não ocorre para as séries substituídas com SH e F, uma vez que a densidade eletrônica sobre esses átomos é menor comparado a CN, conforme demonstrado nos mapas de potencial eletrostático da Figura 33 (página 149). Além disso, o grupo ciano é linear e volumoso em comparação ao átomo de flúor e tiol, o que pode dificultar a aproximação do carbono eletrofílico ao resíduo de Ser70.

Figura 33. Mapas de potencial eletrostático* dos compostos AMCF81 (A), AMFF81 (B) e AMSF81 (C) demonstrando a densidade sobre o substituinte ciano. Em (D) a distância do substituinte ciano dos resíduos Ser70 e Lys73.

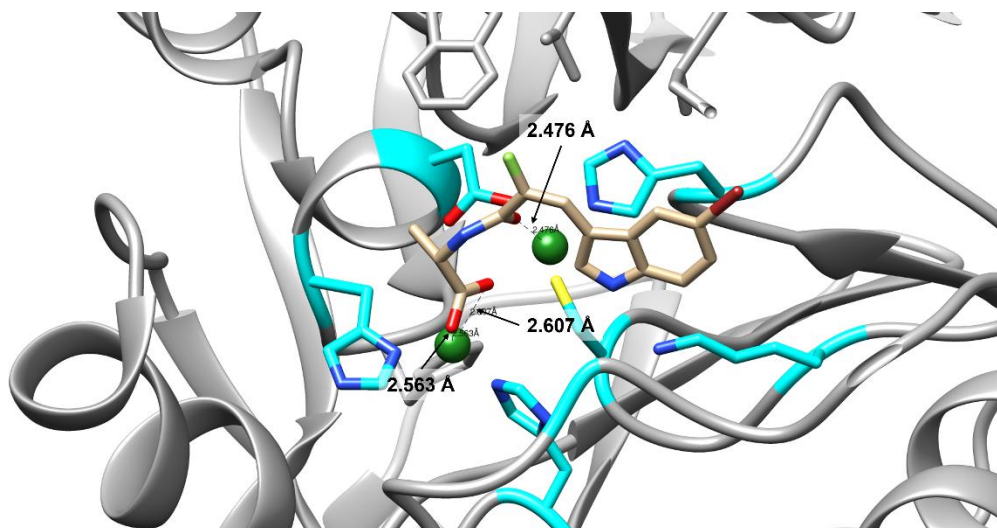


*O mapa de potencial eletrostático foi feito no *software* Spartan '14 V1.1.4 (Wavefunction, Inc., Irvine, Califórnia, EUA).

Fonte: Autora, 2025.

Os resultados de *docking* para a metalo β -lactamase NDM-1 demonstraram uma tendência adicional. A maioria dos complexos formados (representados por distâncias na Tabela 9, página 145) constavam em interações entre os átomos de zinco do sítio catalítico e as carbonilas dos aminoácidos presentes na estrutura (Figura 34, página 148).

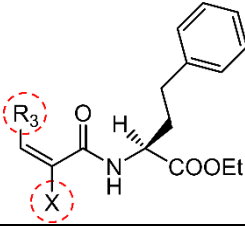
Figura 34. Complexo formado entre NDM-1 e o composto AMFA81. As distâncias demonstram as interações entre a molécula e os átomos de zinco.



5.2.2.2 Grupo de ésteres acrilamida contra rodesaína

Uma vez que a série de ésteres de acrilamida contém apenas 40 ligantes, todos foram inspecionados visualmente e as distâncias para o resíduo catalítico de Cys25 foram calculados (Tabela 10, página 149). Dessa forma, apenas 6 compostos não apresentaram distância inferior a 4,0 Å, sendo assim rejeitados na triagem. Um detalhe especial para essa série, é que com exceção dos compostos ROCE4 e ROFE20, todos os aprovados na série substituída com o grupo ciano tiveram seu respectivo derivado α substituído por flúor também aprovados. Observando essa tendência no grupo, procuramos selecionar as combinações para a síntese, de forma a fornecer um comparativo futuro para ensaios biológicos. Finalmente, 34 compostos foram considerados aprovados, 17 de cada série.

Tabela 10. Compostos aprovados no grupo de ésteres acrilamidas. Pontuação dos complexos formados com rodesaína; distância calculada entre o resíduo de Cys25 e o carbono β da estrutura do ligante. Os compostos estão ordenados de acordo com a coluna distância.



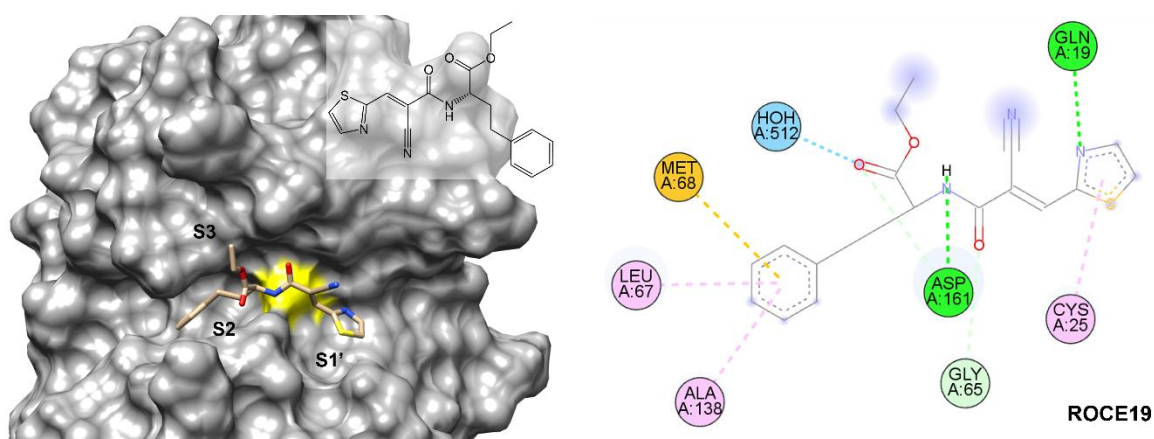
SÉRIE CIANO (X= CN)			SÉRIE FLÚOR (X= F)		
Código	Pontuação	Distância (Å)	Código	Pontuação	Distância (Å)
ROCE19	22,97	3,354	ROFE17	20,68	3,337
ROCE17	20,44	3,378	ROFE19	22,95	3,431
ROCE16	26,22	3,392	ROFE5	25,51	3,445
ROCE13	26,50	3,426	ROFE13	27,31	3,452
ROCE14	24,86	3,436	ROFE14	24,77	3,456
ROCE15	24,08	3,508	ROFE16	25,14	3,519
ROCE2	26,02	3,514	ROFE3	22,45	3,531
ROCE9	26,07	3,546	ROFE18	26,19	3,541
ROCE4	27,05	3,553	ROFE15	24,00	3,558
ROCE5	25,33	3,553	ROFE9	25,80	3,558
ROCE3	23,86	3,564	ROFE11	27,33	3,567
ROCE11	26,44	3,566	ROFE12	27,19	3,593
ROCE8	25,31	3,567	ROFE2	26,19	3,611
ROCE10	26,94	3,647	ROFE10	26,89	3,653
ROCE18	26,68	3,663	ROFE8	25,11	3,658
ROCE12	26,81	3,701	ROFE20	26,88	3,714

Legenda do código: O código é composto por três partes - RO código geral; X= C (ciano) ou F (flúor); A terceira parte é a letra E, que corresponde a identificação do grupo funcional éster; o número final, corresponde a qual substituinte aromático ou não aromático está em R₃.

Fonte: Autora, 2025.

Como esperado, os ensaios de *docking* demonstraram um perfil de interação semelhante em todos os compostos da série. O aminoácido hidrofóbico HomoPhe encaixou-se no sítio S2 e foi estabilizado por interações hidrofóbicas com Leu67, Ala138, Ala208 e Met68. Por outro lado, o substituinte aromático na posição R₃ acomodou-se no sítio S1' promovendo interações com diferentes aminoácidos. Adicionalmente, o sítio S3 foi ocupado pela função éster, onde alguns compostos da série promoveram interações com os aminoácidos de Gly65 e Gly66. A Figura 35 (página 150) demonstra as interações e o encaixe um compostos modelo.

Figura 35. *Docking* do composto ROCE19 na enzima rodesaína. Os bolsos ocupados pelos diferentes substituintes da enzima e as interações são representados. O resíduo Cys25 foi destacado em amarelo.



Fonte: Autora, 2025.

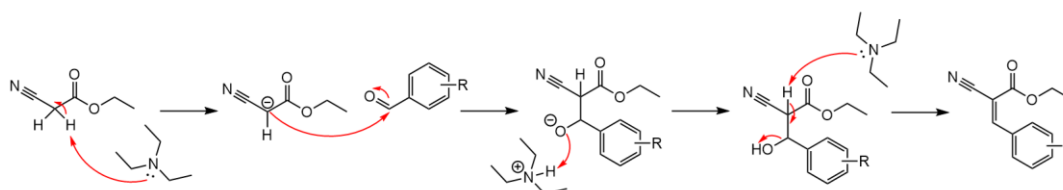
5.3 Síntese e caracterização dos compostos planejados

5.3.1 Síntese e caracterização dos ácidos acrílicos α -substituídos por CN

A síntese dos ácidos acrílicos intermediários α -substituídos por ciano ocorreu através de reações de Knoevenagel. Esta reação é bem descrita na literatura, e consiste na adição nucleofílica de um composto de hidrogênio ativo a um grupo carbonila, seguida por uma etapa de desidratação (JONES, 2011). É necessária a presença de um grupo retirador de elétrons, como o grupo ciano, a fim de facilitar a desproteção do hidrogênio α ou metileno ativo para a formação do

íon enolato. Para os derivados ciano, a base trietilamina (Et_3N) foi utilizada para iniciar a reação, que tem o mecanismo proposto na Figura 36 (página 151). A reação é iniciada pela formação de um íon enolato através da desprotonação pela base. O íon então reage com o aldeído, para formação de um intermediário que sofre uma nova eliminação induzida pela base, para por fim, promover a formação de uma nova ligação dupla $\text{C}=\text{C}$ (LI et al., 2017c).

Figura 36. Mecanismo de condensação de aldeídos aromáticos a cianoacetato de etila.



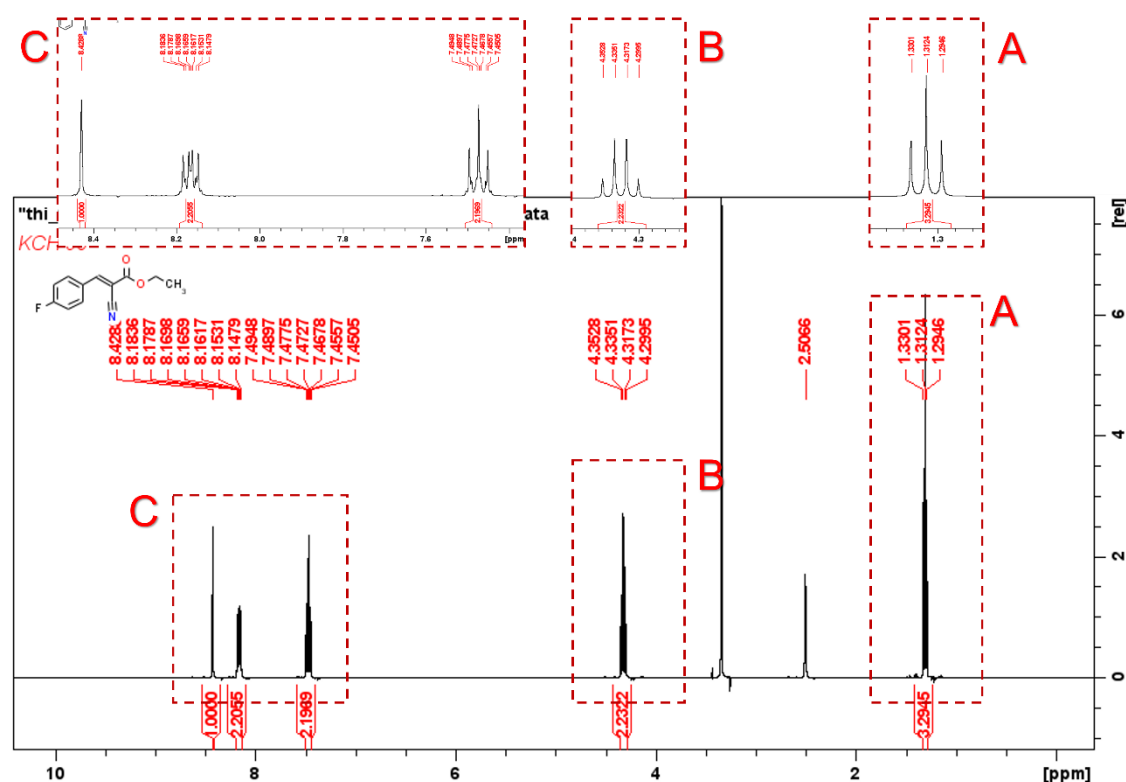
Fonte: Autora, 2025.

Essa rota de síntese já foi relatada por outros trabalhos (DENMARK; IBRAHIM; AMBROSI, 2017; LI et al., 2017c), sendo algumas modificações relacionadas ao catalisador para formação do enolato (KOLAHDOOZAN et al., 2013; YADAV et al., 2004). Entretanto, a utilização da Et_3N como base forneceu bons rendimentos (40-90%), sendo, portanto, uma metodologia prática e eficaz para a síntese desses compostos.

As reações de Knoevenagel consistem em uma síntese sob condições brandas que fornecem altos rendimentos. Uma característica importante para nosso trabalho, no entanto, é a caracterização do isômero que é formado a partir da nova ligação dupla. Os estudos de cristalografia do grupo de Al-Refai et al. (2019) fornecem evidências da estereoquímica para ciano acrilatos. Assim como em outros estudos, a síntese desses a partir do cianoacetato de etila e aldeídos em condições brandas, como a temperatura ambiente e bases fracas ou moderadamente fracas, fornece o isômero E. Resultados semelhantes foram observados para um derivado (E)-etil 3-(3-bromofenil)-2-cianoacrilato (YE; SHEN; WEI, 2009) ou ainda para o tiofeno etil (E)-2-ciano-3-(tiofen-2-il) acrilato (CASTRO AGUDELO et al., 2017). Esses resultados nos fornecem segurança no desenho das estruturas α substituídas por ciano planejadas. Adicionalmente, as análises físico-químicas como CCD e CLAE demonstraram a presença de apenas uma banda ou sinal característico.

Quanto à caracterização, o espectro de RMN ^1H apresentou sinais característicos à condensação. Tomando como exemplo a estrutura do ciano-éster 8a, observamos a presença de sinais característicos da função éster etílico, onde foram identificados um tripleto em 1,31 ppm e um quarteto em 4,32 ppm, correspondentes a três e dois hidrogênios respectivamente. Além disso, multipletos relacionados aos hidrogênios aromáticos também foram identificados. Para 8a estes apresentam-se em 7,45-7,49 e 8,14-8,18 ppm, para dois hidrogênios cada. Finalmente, o simpleto que representa o hidrogênio β foi identificado em 8,42 ppm, indicando que a condensação foi bem-sucedida. Um resumo dos principais sinais de RMN para os ésteres sintetizados é representado na Figura 37 (página 152). No espectro de RMN ^{13}C alguns dos sinais característicos que podem ser observados são os que correspondem aos carbonos da função éster, que foram identificados próximos a 14 e 60 ppm, além do sinal que pode ser atribuído ao carbono $\text{HC}=\text{C}$ que foi identificado próximo a 150 ppm para a maioria dos compostos.

Figura 37. Representação do espectro de RMN do ciano-éster 8a.

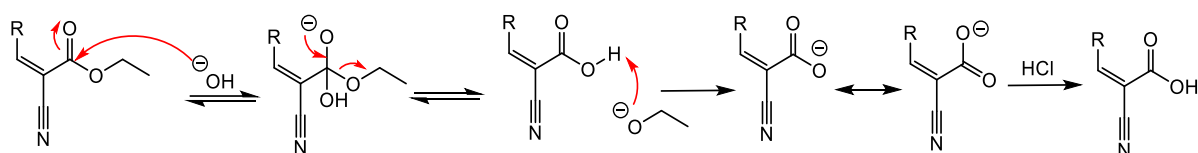


Fonte: Autora, 2025.

A segunda etapa de síntese dos ácidos acrílicos consistiu na hidrólise básica dos derivados éster e posterior formação da função ácida. Em geral a hidrólise de

ésteres pode ser feita empregando um ácido (BELL; DOWDING; NOBLE, 1955) ou uma base (NEWLING; HINSHELWOOD, 1936). Aqui empregamos o hidróxido de sódio como base para essas reações, através do mecanismo demonstrado na Figura 38 (página 153). Este mecanismo inicia com a adição nucleofílica da base à carbonila, seguida da eliminação da função $-OCH_2CH_3$ e formação do ácido carboxílico. O íon eliminado promove a desprotonação do ácido carboxílico e formação do íon carboxilato. Ao término da reação, é possível promover a formação do ácido carboxílico desejado através da acidificação do meio; nesse trabalho utilizamos uma solução de HCl para produzir o ácido desejado Figura 38 (página 153).

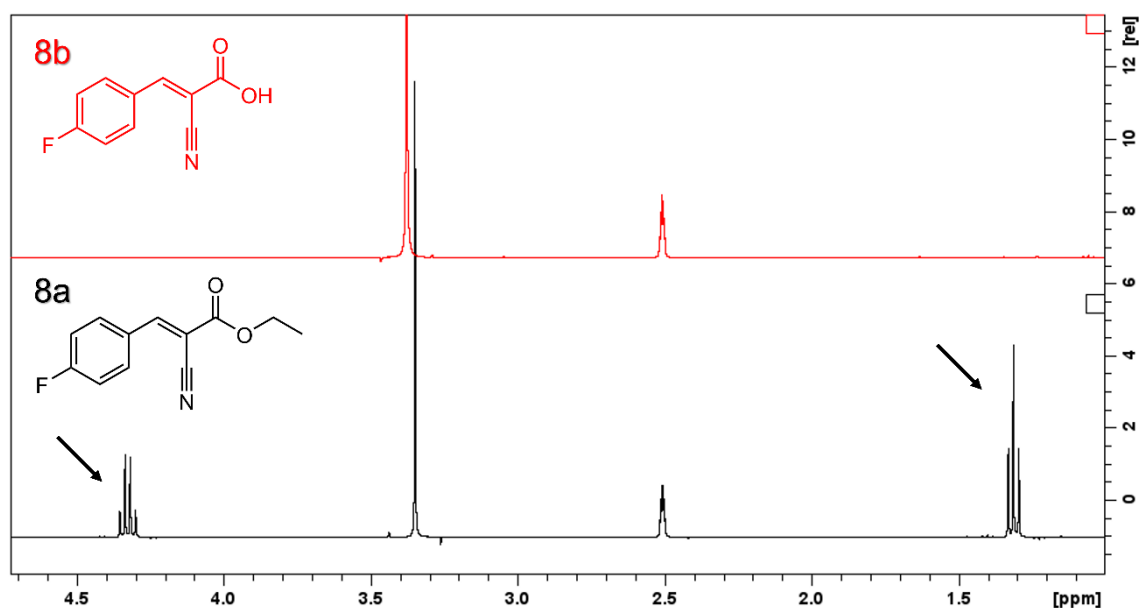
Figura 38. Mecanismo de hidrólise básica dos ésteres de ciano.



Fonte: Autora, 2025.

A metodologia de hidrólise foi eficiente para obtenção dos compostos sintetizados, com rendimentos de 25-73%. Nos espectros de RMN 1H , o sucesso da hidrólise é caracterizado pela ausência dos sinais referentes ao grupo éster. A Figura 39 (página 153) faz uma comparação entre o éster 8a e sua hidrólise 8b.

Figura 39. Comparação entre o composto hidrolisado e seu éster correspondente. Espectro ampliado de 1,0-4,5 ppm.

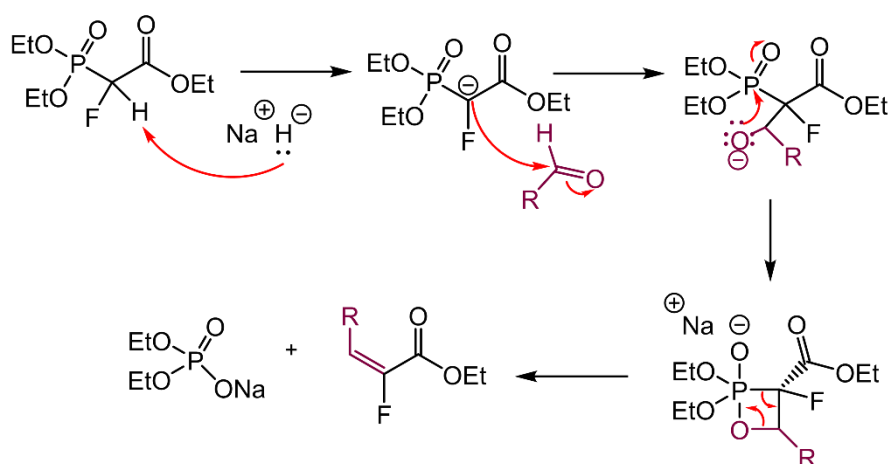


Fonte: Autora, 2025.

5.3.2 Síntese e caracterização dos ácidos acrílicos α -substituídos por flúor

A síntese dos ácidos acrílicos α substituídos por flúor foi realizada empregando o reagente trietil 2-fluoro-2-fosfonoacetato. Fosfonatos são utilizados com frequência em reações de olefinação a partir de reações de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE), onde formam carbânions fosfonatos estabilizados que atuam como nucleófilos, reagindo prontamente com uma ampla gama de aldeídos e cetonas sob condições mais brandas (KOBAYASHI; TANAKA; KOGEN, 2018; ROMAN; SAUER; BEEMELMANN, 2021). Essa síntese estereoseletiva inicia pela desprotonação do fosfonato, gerando um carbânion fosfonato que promove uma adição nucleofílica ao aldeído, levando a um alcóxido que ataca o átomo de fósforo, gerando um intermediário cíclico que sofre rearranjo liberando o alceno final e um subproduto fosfato (Figura 40, página 154).

Figura 40. Mecanismo para olefinação por reações de HWE.



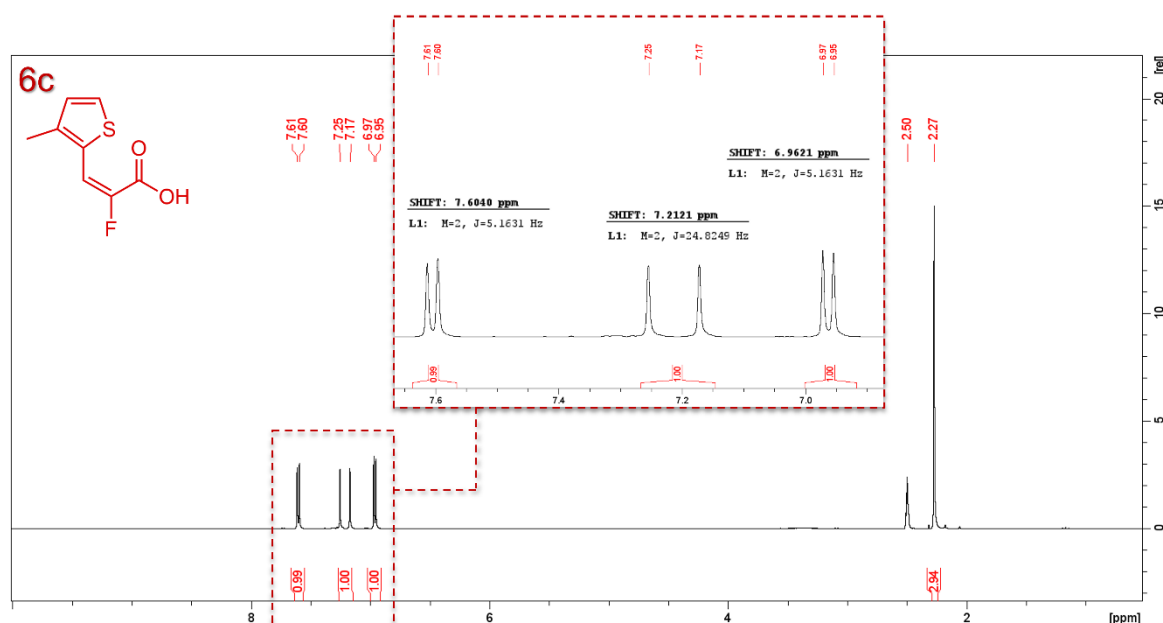
Fonte: Autora, 2025.

Esse método já foi empregado para os ácidos acrílicos de interesse no trabalho desenvolvido por Liu et al. (2022). Os autores sintetizaram uma série de mono fluoro alcenos como intermediários para análogos deuterados e relatam uma proporção *Z/E* próxima a 1:99, constatada por cristalografia para boa parte dos compostos sintetizados. A hidrólise básica é realizada apenas depois de uma extração utilizando hidróxido de sódio, assim como para os intermediários α substituídos por CN. Os rendimentos dos ácidos produzidos foram de 50-90%.

Os espectros de RMN de ^1H dos derivados acrílicos α -substituídos por flúor apresentaram multipletos complexos nas regiões correspondentes aos hidrogênios

vinílicos e aromáticos. Essa multiplicidade é atribuída, em grande parte, à presença do átomo de flúor diretamente ligado ao carbono α , o qual é um núcleo altamente abundante e magneticamente ativo, promovendo acoplamentos heteronucleares ^1H – ^{19}F bem resolvidos (SAN FABIÁN; GUILLEME; DÍEZ, 1998). Para esses compostos, o hidrogênio vinílico apresentou constante de acoplamento ^3J -HF de aproximadamente 20 Hz, valor esse consistente com uma estereoquímica *E*. Essa ideia pode ser racionalizada com base na regra de Karplus, a qual estabelece uma correlação empírica entre o ângulo diedro formado pelos orbitais e a intensidade do acoplamento magnético. No caso dos ácidos acrílicos dessa série, a configuração *E* entre o hidrogênio e o flúor na dupla ligação corresponde a um ângulo diedro próximo de 180° , o qual favorece o máximo acoplamento vicinal entre os dois núcleos. O composto 6c representado na Figura 41 (página 155) destaca as constantes de acoplamento dos dupletos identificados.

Figura 41. Espectro de RMN ^1H do composto 6c, destacando as constantes de acoplamento dos sinais identificados.

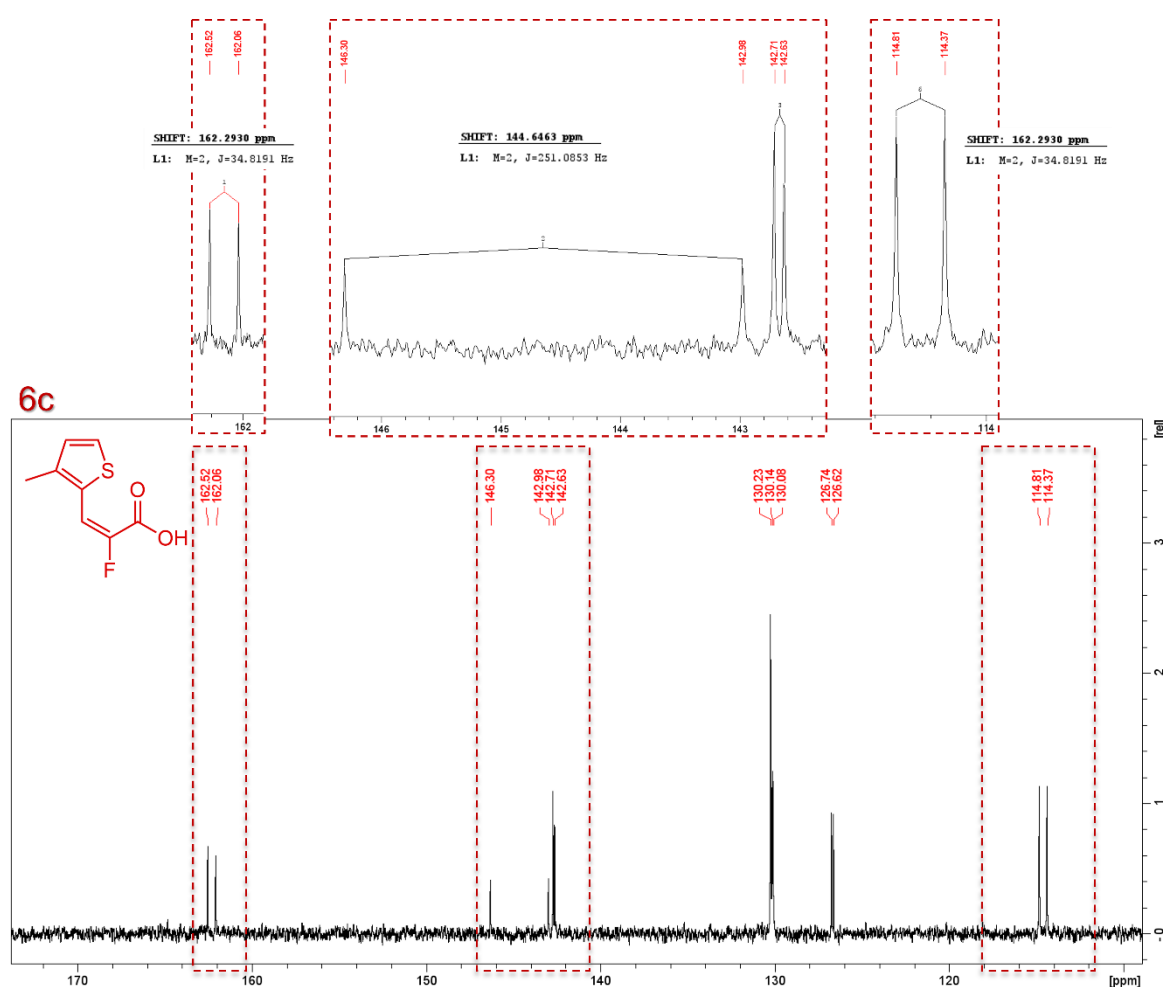


Fonte: Autora, 2025.

Em adição, os dados de RMN ^{13}C também evidenciaram importantes interações de acoplamento entre o núcleo de flúor e os carbonos vizinhos, resultando em múltiplos sinais de dupletos. Ainda tomando como exemplo o composto 6c, o sinal mais característico foi observado em 144,64 ppm, apresentando um constante de acoplamento ^1J -CF = 251,08 Hz, atribuída ao carbono diretamente ligado ao flúor (carbono α da dupla ligação). O carbono vinílico

β (114,59 ppm) exibiu um acoplamento vicinal $^2J\text{-CF} = 32,78$ Hz, compatível com estereoquímica *E*, já que valores dessa ordem são esperados quando o flúor e o hidrogênio estão em relação *trans*, assim como o relatado anteriormente (LIU et al., 2022). O carbono do grupo carboxílico apresentou-se em 162,29 ppm com acoplamento $^3J\text{-CF} = 34,81$ Hz, indicando a propagação eletrônica do efeito do flúor por conjugação π . Outros sinais dupletos com constantes de acoplamento entre 4–9 Hz (126,68; 130,11; 142,66 ppm) foram atribuídos a carbonos do sistema aromático, ainda influenciados por acoplamentos com flúor

Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C do composto 6c, destacando as constantes de acoplamento dos sinais identificados.



Fonte: Autora, 2025.

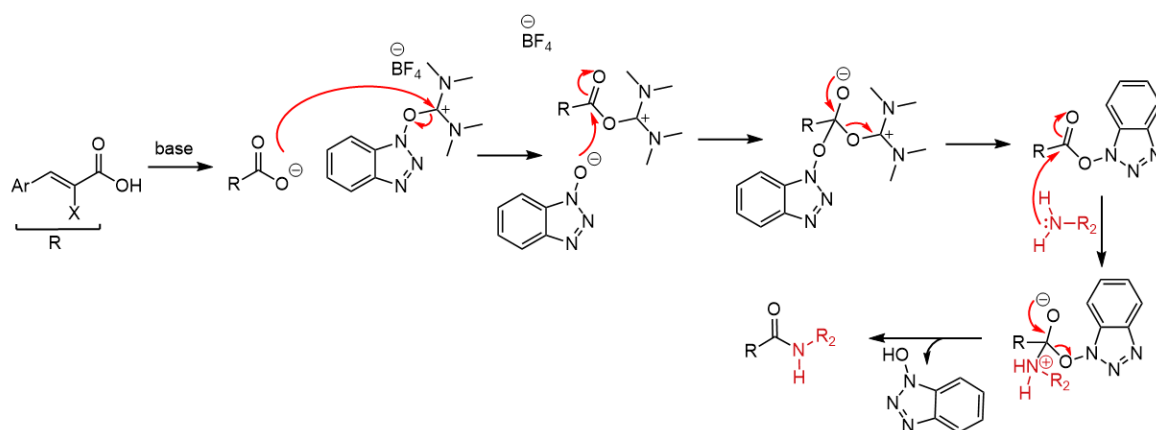
5.3.3 Síntese e caracterização de acrilamidas α -substituídas por ciano e flúor

Ligações do tipo amida ocorrem a partir da união de ácidos carboxílicos e aminas. No entanto, a reação entre esses dois grupos funcionais não ocorre de forma espontânea. Em geral são necessárias altas temperaturas, o que muitas

vezes é prejudicial à integridade dos substratos (VALEUR; BRADLEY, 2009). Por esse motivo, geralmente é necessário ativar o ácido carboxílico através da conversão do -OH em um bom grupo de saída antes do tratamento com a amina. Para tanto, frequentemente são utilizados os chamados agentes de acoplamento, que atuam gerando compostos como cloretos de acila, anidridos mistos ou carbônicos, ou ésteres ativos. Para esse trabalho, assim como descrito por Fuchs et al. (2023) empregamos o agente de acoplamento baseado em sais de urônio/amínio O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronium tetrafluoroborato (TBTU), o qual reage com ácidos carboxílicos para formar ésteres ativos que são então susceptíveis a reações com aminas.

Em presença de uma base (como DIPEA), o ácido carboxílico ataca o centro de carbono eletrofílico do TBTU, ligando-se a parte tetrametilurônio da estrutura. O intermediário reativo gerado é rapidamente atacado pelo OBt, formando um éster ativado de benzotriazol, mais estável que o intermediário urônio. A etapa posterior é o ataque da amina nucleofílica ao carbono do grupo acila do éster, resultando na amida desejada e liberação de HOBT (VALEUR; BRADLEY, 2009) (Figura 43, página 157).

Figura 43. Mecanismo de acoplamento de amida utilizando TBTU e HOBT.

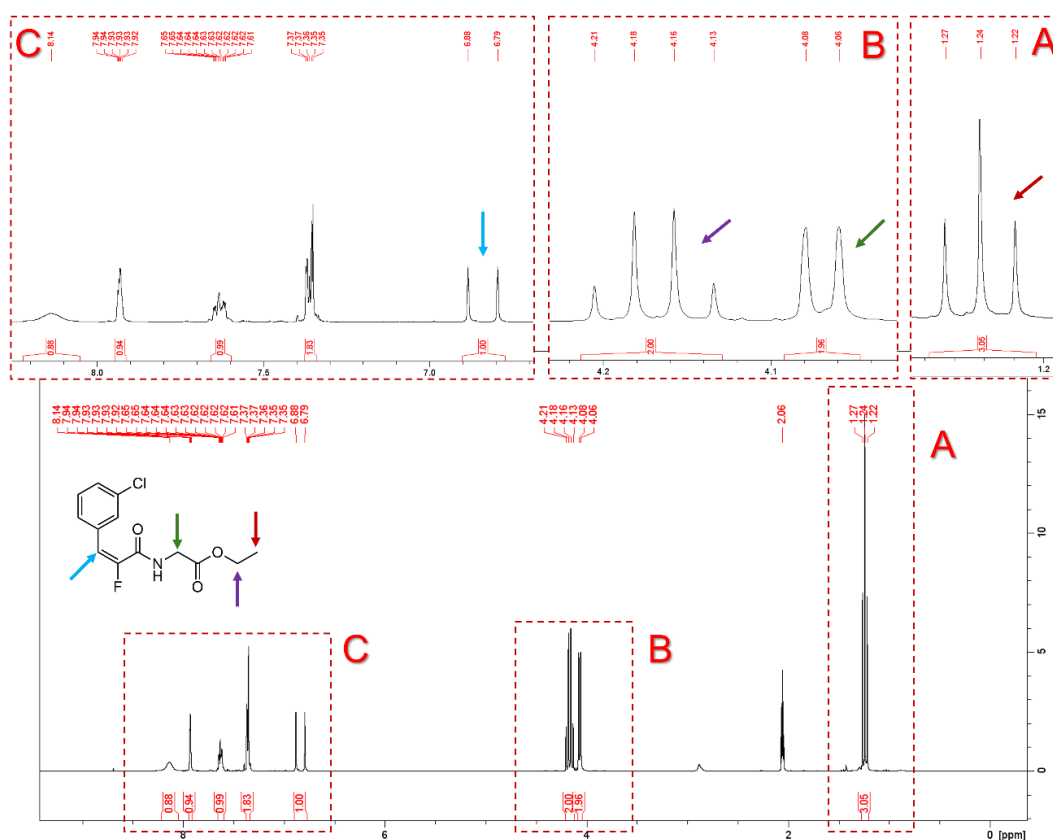


Fonte: Autora, 2025.

Utilizando esse método, os ácidos acrílicos substituídos por ciano e flúor foram acoplados a diferentes amino-ésteres (glicina, alanina, fenil alanina, triptofano e homo fenil alanina). A purificação desses compostos foi através de cromatografia em coluna, onde o composto foi isolado, com rendimentos variando de 20-80%. O espectro de RMN ^1H do composto 8d fornece alguns padrões que se

repetiram ao longo da série. A presença da função éster foi confirmada através de um tripleto em 1,24 ppm e um quarteto em 4,16 ppm. Entre eles, os dois hidrogênios do aminoácido glicina foram detectados em 4,09 ppm como um duplete. Para os compostos da série substituídos com aminoácidos diferentes de glicina, esse sinal foi substituído por um multipeto com integração para um hidrogênio. Além disso, para os derivados da série flúor como 8d, o hidrogênio vinílico apresentou-se como um duplete em 6,83 ppm, com constantes de acoplamento próximas a 20 Hz, assim como seus intermediários.

Figura 44. Espectro de RMN ^1H do composto 8d, destacando os principais sinais para comprovação estrutural.

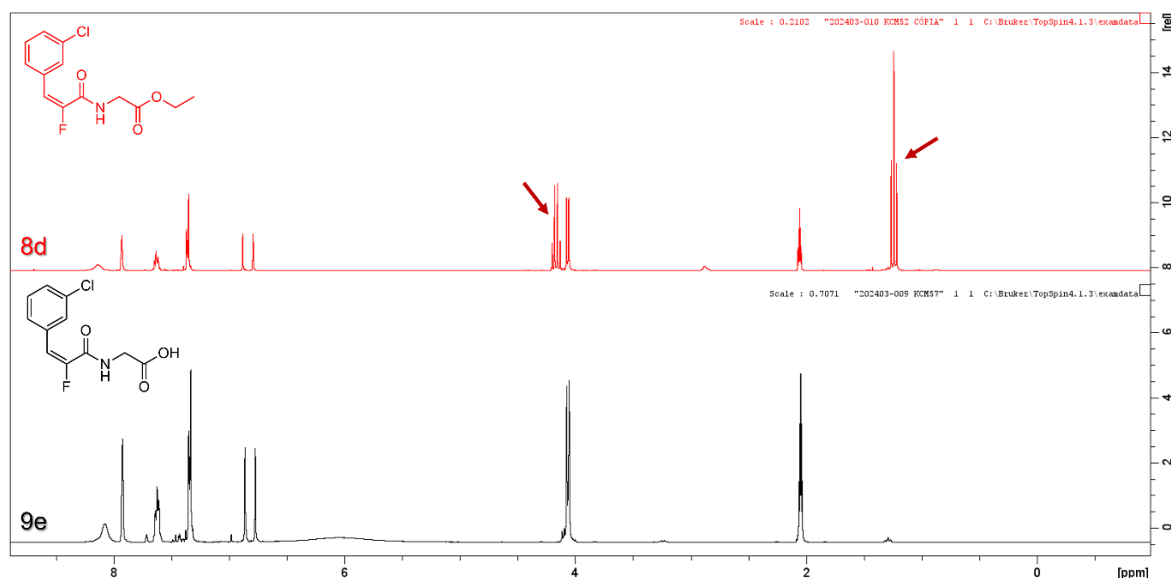


Fonte: Autora, 2025.

Para a série de compostos contendo o substituinte HomoPhe, após a confirmação da síntese dos ésteres, esses foram armazenados e utilizados para os ensaios biológicos posteriores. No entanto, para os compostos contendo os outros amino-ésteres, uma etapa adicional de síntese foi realizada, a qual consistiu na hidrólise do éster para restauração da função ácida do aminoácido. Para tanto, foi utilizada a base hidróxido de lítio, a qual promoveu a hidrólise de forma mais gradual e controlada, com rendimentos variando de 30-93%. Dessa forma, 12 acrilamidas

α -substituídas com flúor foram sintetizadas, 1 derivado não substituído e 1 acrilamida adicional contendo o substituinte CN também foi sintetizado. O último foi sintetizado de forma estratégica após resultados biológicos preliminares, servindo como comparativo para os compostos aprovados da série. O espectro de RMN ^1H de 9e fornece um comparativo entre essa acrilamida e seu intermediário 8d (Figura 45, página 159). O desaparecimento dos sinais referentes ao grupo etila confirmou a hidrólise.

Figura 45. Comparação entre os espectros de RMN ^1H do éster 8d e seu correspondente ácido 9e.



Fonte: Autora, 2025.

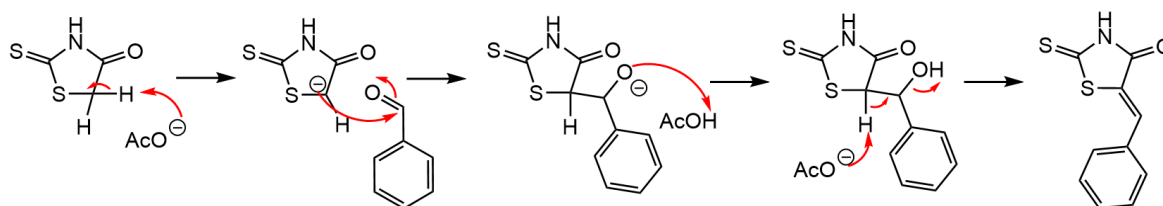
Embora a maioria dos compostos apresentassem boa estabilidade, a acrilamida 10e substituída por um grupo quinolina apresentou baixa estabilidade em solução, assumindo uma coloração escura mesmo armazenada sob baixas temperaturas. Além deste, o éster 18d também apresentou mudança na aparência mesmo armazenado sob baixas temperaturas, o que dificultou seu ensaio em testes biológicos subsequentes.

5.3.4 Síntese e caracterização dos ácidos acrílicos α -substituídos por tiol, rodaninas intermediárias e acrilamidas

O planejamento inicial do trabalho contava com a síntese dos ácidos acrílicos intermediários α -substituídos por tiol através da hidrólise de rodaninas as quais são obtidas através de reações de Knoevenagel. A primeira etapa consistiu na condensação do núcleo rodanina a aldeídos aromáticos, uma reação já descrita na

literatura (INAMOTO et al., 2008; ZHANG et al., 2018). Para tanto foi utilizado o acetato de sódio (AcONa) como base fraca e o ácido acético (AcOH) como solvente prótico. O mecanismo dessa reação é demonstrado na Figura 46 (página 160), onde inicialmente o íon acetato remove um dos hidrogênios da rodanina, seguido da formação de um íon que promove um ataque nucleofílico à carbonila do aldeído. O intermediário formado é protonado pelo solvente, seguido da remoção do segundo hidrogênio, desidratação e formação da ligação dupla.

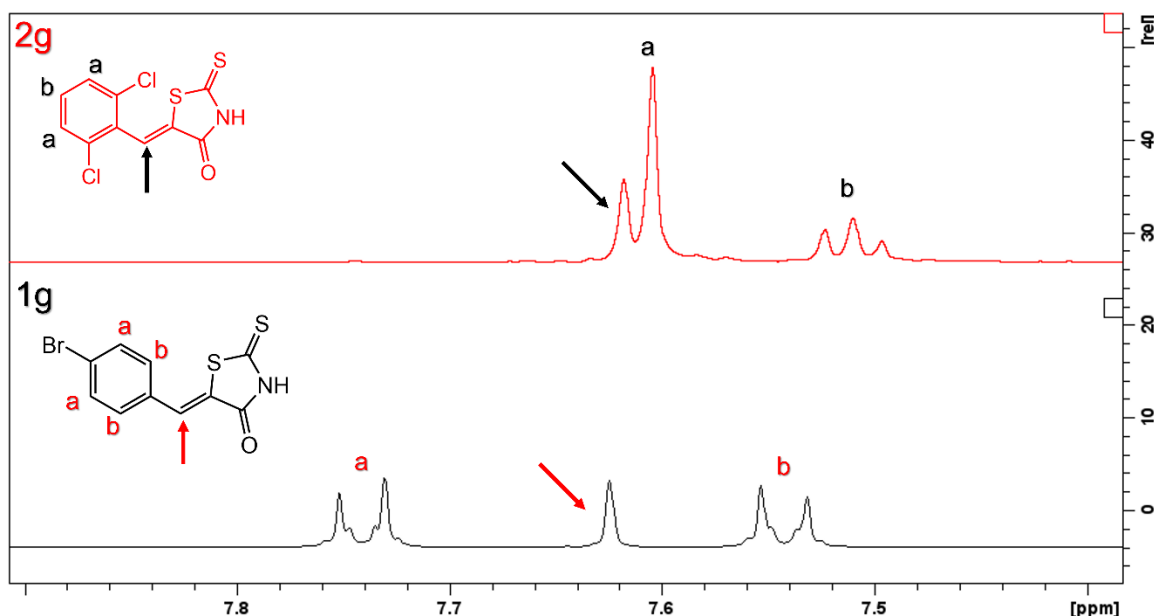
Figura 46. Proposta de mecanismo para os derivados de rodanina.



Fonte: Autora, 2025.

Os intermediários apresentaram rendimentos de 20-83%, o que condiz com os rendimentos observados por outros autores (BREM et al., 2014; ZHANG et al., 2018). O RMN ^1H desses compostos apresentou o sinal característico da formação da nova ligação, sendo este caracterizado por um simpleto de 7,62-7,79 ppm.

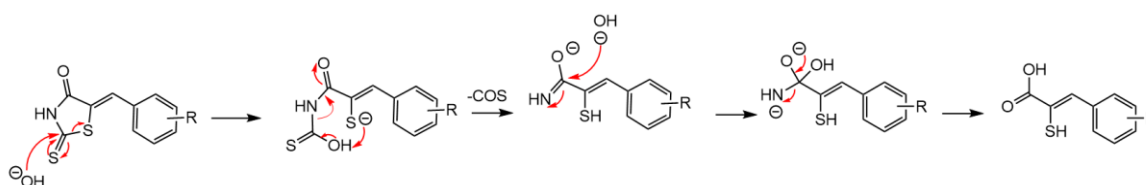
Figura 47. Comparação dos espectros de RMN ^1H de 1g e 2g. Os espectros foram ampliados de 7,4 a 7,89 ppm.



Fonte: Autora, 2025.

A hidrólise do anel rodanina produz os ácidos acrílicos α -substituídos por tiol. Essa reação é normalmente executada em meio básico, sobre temperatura de 75 °C, e já foi relatada por diversos autores (BREM et al., 2014; CAMPAIGNE; CLINE, 1956; INAMOTO et al., 2008). Entretanto, contrastando ao observado na reação de condensação, os rendimentos da hidrólise costumam ser baixos, o que dificulta a purificação e isolamento destes derivados. Inamoto et al. (2008) relata a síntese de derivados tiol a partir do núcleo rodanina, apresentando rendimentos de 28-40%, semelhante ao caracterizado por Brem et al. (2014). Curiosamente, esse último autor identificou que enzimas da classe MBL apresentaram capacidade de hidrolisar o núcleo rodanina, produzindo o ácido acrílico substituído por tiol. Dessa forma, é razoável inferir que o núcleo rodanina condensado a aldeídos diferentes também apresenta potencial de inibição da NDM-1 e outras metalo-enzimas (BREM et al., 2014). Uma proposta de mecanismo de hidrólise e obtenção do ácido mercapto acrílico contendo tiol é demonstrado na Figura 48 (página 161). O mecanismo inicia com um ataque nucleofílico da base à tionila da rodanina, seguida da abertura do anel. Uma transferência de próton intramolecular leva à formação do tiol enquanto o sulfeto de carbonila é liberado. Um novo ataque permite a inserção de um grupo OH levando à liberação da amina e formação do ácido.

Figura 48. Proposta de mecanismo para hidrólise do anel rodanina e formação do ácido α -substituído por tiol.

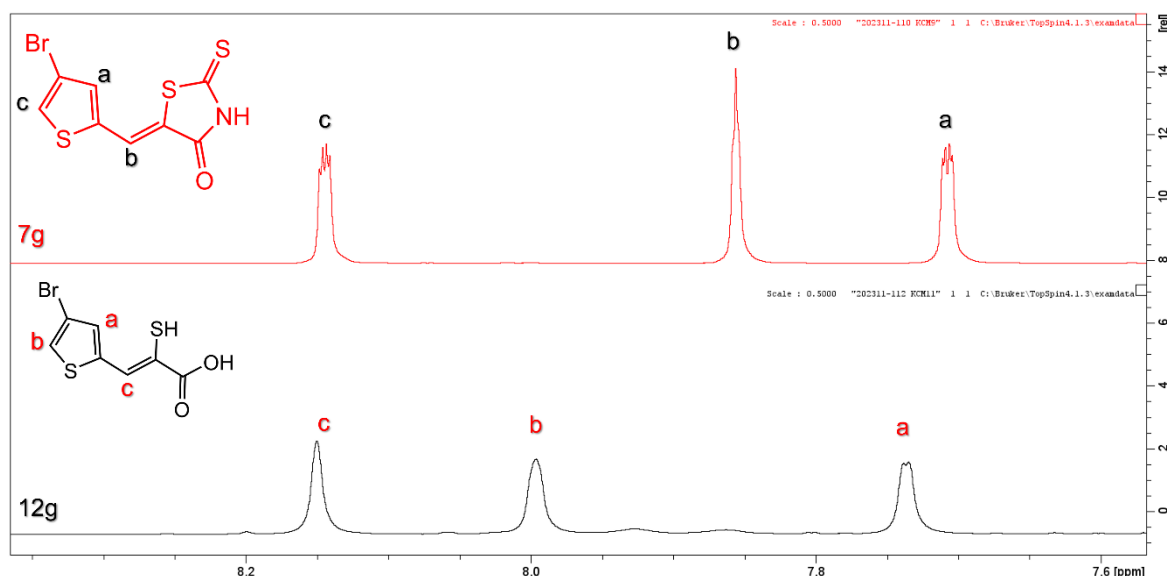


Fonte: Autora, 2025.

Para dois dos compostos contendo o núcleo rodanina (12g e 13g), a hidrólise básica foi bem-sucedida. A comparação entre os espectros de RMN ^1H do derivado 12g e seu intermediário 7g demonstram uma mudança no deslocamento do sinal referente ao próton vinílico ($\text{CH}=\text{C}$) de 7,86 para 8,15 ppm. Esse aumento no deslocamento químico é justificado pela alteração no sistema conjugado e no ambiente eletrônico ao redor da dupla ligação. No intermediário tiazolidina, a dupla ligação está conjugada com o anel, que contém heteroátomos capazes de estabilizar a densidade eletrônica por ressonância, promovendo uma leve

blindagem do próton vinílico. Após a hidrólise, a nova estrutura apresenta conjugação com o grupo carboxílico e com a função tiol, ambos de caráter eletronegativo e despolarizante, o que aumenta a desblindagem eletrônica do próton e conseqüentemente, seu deslocamento para campo mais baixo (TIMOTHY D.W. CLARIDGE, 2016).

Figura 49. Comparação dos espectros de RMN ^1H de 7g e 12g. Os espectros foram ampliados de 7,6 a 8,3 ppm.



Fonte: Autora, 2025.

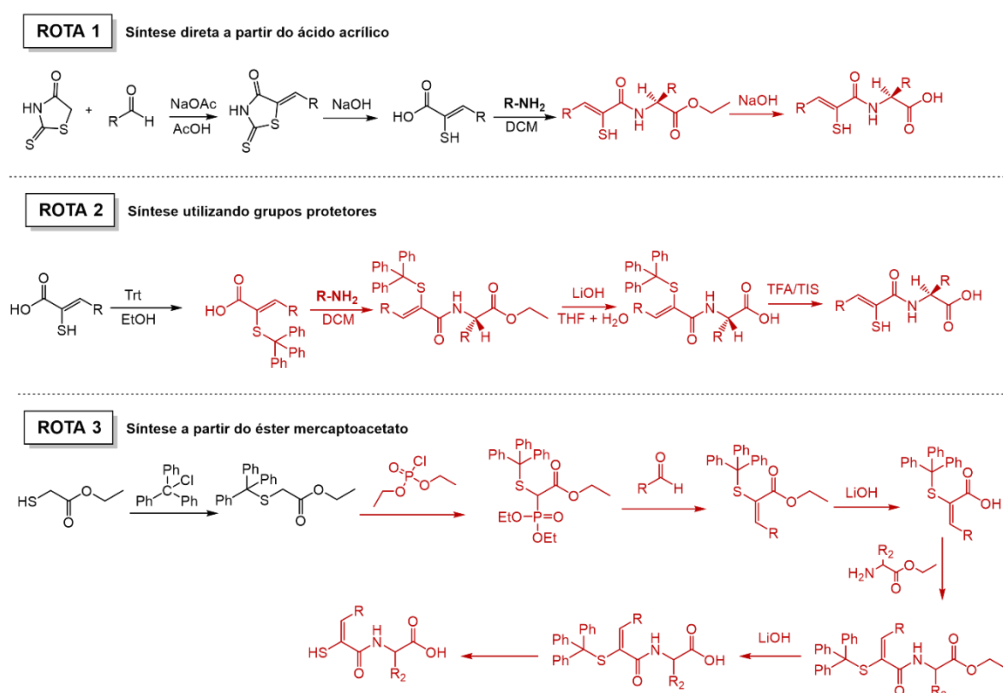
Naturalmente, após a síntese dos ácidos acrílicos α -substituídos por SH, a etapa subsequente seria a introdução da ligação amida através do acoplamento com o requerido aminoácido. No entanto, para essa série de compostos, o acoplamento não foi possível. Essa falha provavelmente está relacionada à alta nucleofilicidade do grupo tiol, que pode competir com a amina pelo intermediário ativado gerado pelos reagentes de acoplamento, além de poder reagir diretamente com o agente ativador, formando subprodutos indesejados. A tendência do tiol à oxidação também pode contribuir para a formação de espécies complexas, dificultando a reação de acoplamento. Tentando contornar essa situação, algumas alternativas de síntese foram avaliadas com foco na proteção do tiol e posterior funcionalização da molécula (Figura 50, página 163) (WUTS, 2014).

Na primeira abordagem, foram utilizados grupos protetores diretamente ligados aos ácidos acrílicos α -substituídos por tiol. Com o grupo protetor benzila, a reação de proteção foi bem-sucedida e confirmada por espectroscopia. No entanto,

a etapa de desproteção não foi possível mesmo com os agentes descritos em outros trabalhos (DE ROOIJ et al., 1998; DYMICKY; BYLER, 1991; SRINIVASA et al., 2004). Outros grupos protetores testados foram os grupos Trt e MMT, ambos ácido-lábil, com o objetivo de promover uma proteção mais leve e passível de remoção com ácido trifluoroacético (TFA). No entanto, as reações de proteção apresentaram baixo rendimento. Em um dos experimentos, foi possível isolar parcialmente o derivado protegido com Trt, mas durante a etapa de desproteção (com 1% de TFA), observou-se rápida degradação do produto, sugerindo que o intermediário protegido era instável frente às condições ácidas (BARLOS et al., 1996; MAUS et al., 2023; ZHENG et al., 2005).

A última rota utilizou o éster mercaptoacético como precursor, visando a formação de um intermediário fosfonato via estratégia de HWE. A proteção do grupo tiol foi bem-sucedida nessa abordagem, no entanto, a etapa de formação do fosfonato (via clorofosfato de dietila) falhou completamente. Essa limitação pode estar relacionada à reatividade reduzida do intermediário frente a agentes de fossonilação ou à instabilidade do sistema em presença de bases fortes. Finalmente, diante de tantos insucessos, as acrilamidas α -substituídas por tiol foram canceladas. No entanto, as rodaninas intermediárias já sintetizadas foram consideradas em ensaios biológicos posteriores.

Figura 50. Estratégias de síntese das acrilamidas contendo o grupo tiol. Em vermelho, as etapas que não foram confirmadas durante a síntese.



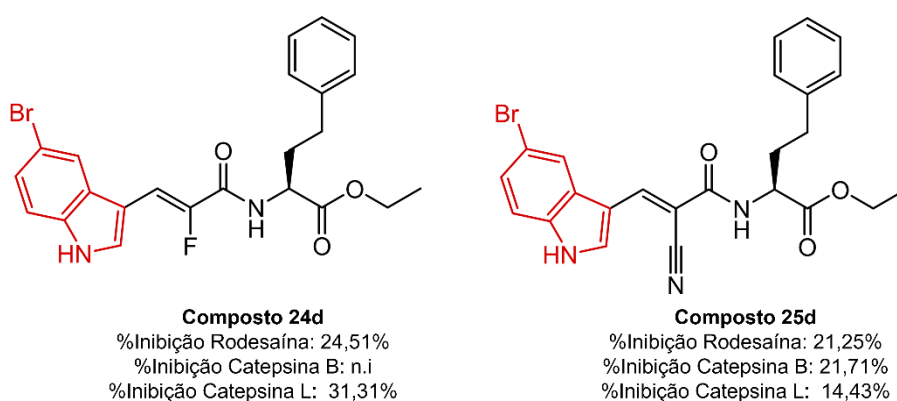
5.4 Ensaios enzimáticos contra proteases de interesse clínico

Como mencionado, dois grupos de compostos foram planejados, são eles **(A)** ácidos acrilamidas contendo diferentes aminoácidos (compostos 1e-13e) inicialmente planejados como potenciais inibidores de β -lactamase; e o segundo grupo é o de ésteres acrilamida **(B)** contendo o aminoácido HomoPhe (compostos 13d-25d), planejados como potenciais inibidores de rodesaína. De forma a melhorar a compreensão, serão abordados inicialmente os testes relacionados ao grupo de compostos **(B)** em todas as enzimas analisadas.

5.4.1 Ensaios enzimáticos com ésteres acrilamida (Grupo B: 13d-25d)

Embora planejados para atuar de forma específica contra inibidores de cisteína proteases do tipo rodesaína, infelizmente os compostos 13d-25d não apresentaram boa porcentagem de inibição frente a essa enzima ou mesmo nos ensaios realizados contra as catepsinas B e L na concentração de 20 μ M. A inibição máxima de cerca de 24% foi observada apenas para os compostos 24d e 25d. Curiosamente, os dois compostos apresentam o mesmo núcleo aromático, o 5-bromo-indol (vermelho, Figura 51, página 164), o que pode fornecer indícios sobre a influência dos diferentes núcleos aromáticos testados. Adicionalmente, esses compostos também foram testados contra a serino β -lactamase no *kit* comercial MAK222. Porém, a limitação quanto à concentração do solvente orgânico dificultou a realização do teste, uma vez que esse grupo de compostos apresenta baixa solubilidade em água. Mesmo sob a concentração de 0,5 mM, os compostos não apresentaram inibição.

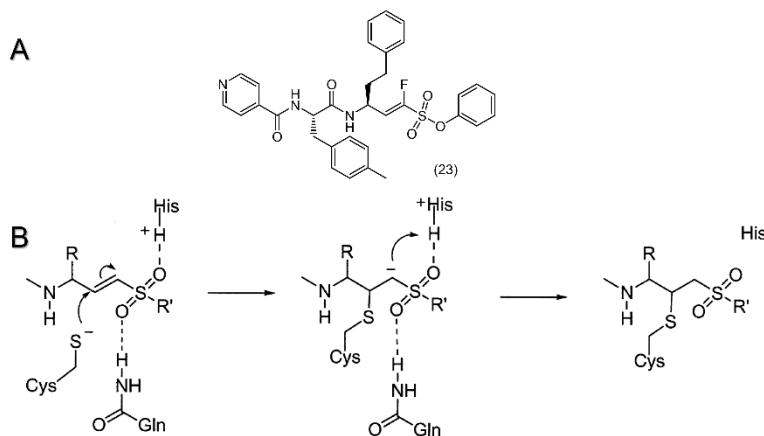
Figura 51. Estruturas e porcentagem de inibição dos compostos 24d e 25d testados contra diferentes cisteína proteases.



Fonte: Autora, 2025.

Ao promover uma comparação entre o composto conhecidamente ativo 23 (Figura 52, página 165) e o composto 24d, algumas características estruturais que podem ter influenciado a atividade biológica podem ser destacadas. Ambos os *warheads* são eletrofílicos e visam a Cys catalítica, no entanto, o grupo sulfonato das vinil sulfonas clássicas pode fornecer uma maior capacidade de alinhamento covalente no sítio ativo. Outros autores já destacaram a importância dos oxigênios presentes no grupo vinil sulfona para a formação de pontes de hidrogênio entre a histidina e a glutamina presentes no sítio ativo (RASNICK, 1996). Assim, é razoável imaginar que a ausência de grupos como este possa afetar de forma significativa a atividade contra a enzima, além da presença de grupos volumosos como 5-bromoindol, que pode prejudicar o encaixe da enzima no sítio S1'. Além disso, alguns pontos de ancoragem podem ter sido perdidos. O sítio S3 por exemplo, acomoda bem grupos polares como a pirimidina do composto 23. Como previsto no *docking*, esse sítio não ficou bem ocupado, o que pode prejudicar interações adicionais que manteriam a estrutura em uma boa posição covalente.

Figura 52. A: Estrutura do composto ativo contra rodesaína reportado na literatura, 23. B: Ligação de hidrogênio entre a histidina e a glutamina de uma protease de cisteína e os oxigênios da vinil sulfona.



Fonte: Adaptado de Powers et al., 2002.

5.4.2 Ensaios enzimáticos com acrilamidas (Grupo A: 1e-13e)

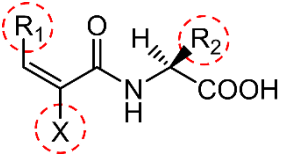
5.4.2.1 Ensaios enzimáticos contra cisteíno proteases

O primeiro ensaio para verificar o perfil de atividade das acrilamidas 1e-13e foi realizado contra cisteíno proteases. Apesar de não terem sido planejadas para

essa atividade, um perfil de baixa ou nenhuma inibição poderia direcionar conclusões relacionadas ao perfil de seletividade contra determinado grupo de enzimas. Como demonstrado na Tabela 11 (página 166) testados na concentração de 20 μ M, nenhum dos compostos apresentou porcentagem de inibição superior a 50%. No entanto, uma tendência novamente foi observada. Assim como para os compostos da série HomoPhe, o núcleo aromático 5-bromoindol novamente se destacou em comparação aos demais compostos da série.

Apesar de baixas, as porcentagens de inibição para compostos contendo esse núcleo também foram destacáveis (5e-7e), com a única exceção sendo o composto 4e, que não apresentou inibição em nenhuma das proteases testadas (Tabela 11, página 166). Com essa tendência sendo observada, o análogo contendo o grupo ciano substituindo o carbono α (composto 8e, Figura 53, página 167) também foi sintetizado e testado. Curiosamente, ainda que não superior a 50%, esse composto apresentou porcentagem de inibição ainda maior, demonstrando que para cisteíno proteases como rodesaína, acrilamidas contendo o grupo triptofano no lugar de grupos hidrofóbicos como HomoPhe também pode ser uma alternativa para a inibição da enzima. Essa tendência nos levou a novos testes com os intermediários ácidos acrílicos contendo o anel 5-bromoindol. Esses testes resultaram em uma atividade de 20,99% para o éster intermediário 11a e 15,07% para o ácido acrílico 2c contra rodesaína. Além de 20,98% de inibição para o composto 2c contra catepsina L.

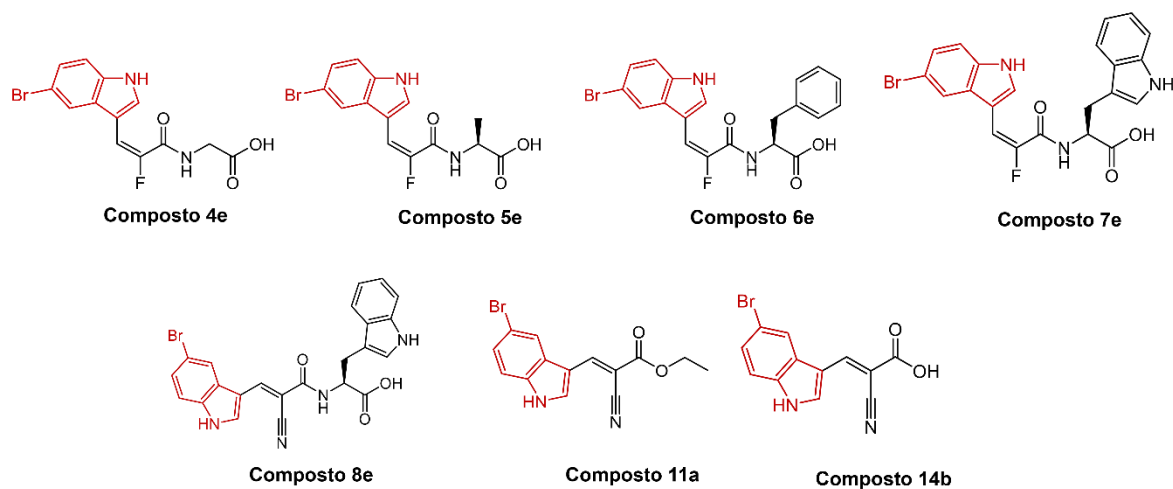
Tabela 11. Porcentagem de inibição na triagem inicial contra cisteíno proteases rodesaína e catepsinas B e L dos compostos 1e-13e e do composto comparativo 2f.

						
Código	R ₁	R ₂	X	Inibição rodesaína a 20 μ M [%]	Inibição Catepsina B a 20 μ M [%]	Inibição catepsina L a 20 μ M [%]
2f	16	CH ₂ -Ph	H	n.i.	n.i.	n.i.

1e	33	H	F	n.i.	n.i.	n.i.
2e	33	CH ₃	F	n.i.	n.i.	n.i.
3e	23	CH ₂ -Ph	F	n.i.	n.i.	n.i.
4e	81	H	F	n.i.	n.i.	n.i.
5e	81	CH ₃	F	12,01	n.i.	n.i.
6e	81	CH ₂ -Ph	F	17,78	n.i.	n.i.
7e	81	CH ₂ -Indol	F	11,05	25,76	n.i.
8e	81	CH ₂ -Indol	CN	32,46	39,94	31,31
9e	46	H	F	n.i.	n.i.	n.i.
10e	72	CH ₃	F	20,32	n.i.	n.i.
11e	90	H	F	n.i.	n.i.	n.i.
12e	24	H	F	n.i.	n.i.	n.i.
13e	38	H	F	n.i.	n.i.	n.i.

Fonte: Autora, 2025.

Figura 53. Estrutura dos compostos de destaque para a inibição de cisteíno proteases. Destacado em vermelho o núcleo que se repete para todos os compostos.



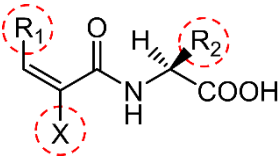
Fonte: Autora, 2025.

Apesar da tendência relacionada ao grupo 5-bromoindol, a porcentagem de inibição inferior a 50% não foi suficiente para ensaios adicionais contra a enzima rodesaína ou as catepsinas humanas. No entanto, esses achados fornecem pistas significativas sobre as características químicas de carbonilas α,β -insaturadas como *warheads* e de grupos diretamente ligados a esse centro eletrofílico.

5.4.2.2 Ensaios enzimáticos contra serino proteases

Para os ensaios enzimáticos contra serino proteases, foi estabelecida a concentração de 1 mM para os compostos. Como demonstrado na Tabela 12 (página 168), a mesma tendência observada nos ensaios com as demais enzimas se repetiu para SBL. Entre os compostos testados, apenas os análogos 4e-8e demonstraram inibição da enzima, sendo três deles 6e-8e inibição superior a 50%. Novamente, os compostos que apresentaram atividade contra a enzima apresentam na sua estrutura o anel 5-bromoindol ligado ao *warhead*. Esse núcleo parece ser especialmente importante desde a triagem de *docking*, uma vez que foi o único substituinte R₁ que teve quase todos os análogos selecionados para a síntese, com exceção apenas do análogo com o aminoácido tirosina.

Tabela 12. Porcentagem de inibição na triagem inicial contra β -lactamase 1e-13e e do composto comparativo 2f.

				
Código	R ₁	R ₂	X	Inibição SBL a 1 mM [%]
2f	16	CH ₂ -Ph	H	n.i.
1e	33	H	F	n.i.
2e	33	CH ₃	F	n.i.
3e	23	CH ₂ -Ph	F	n.i.
4e	81	H	F	19,75
5e	81	CH ₃	F	40,58

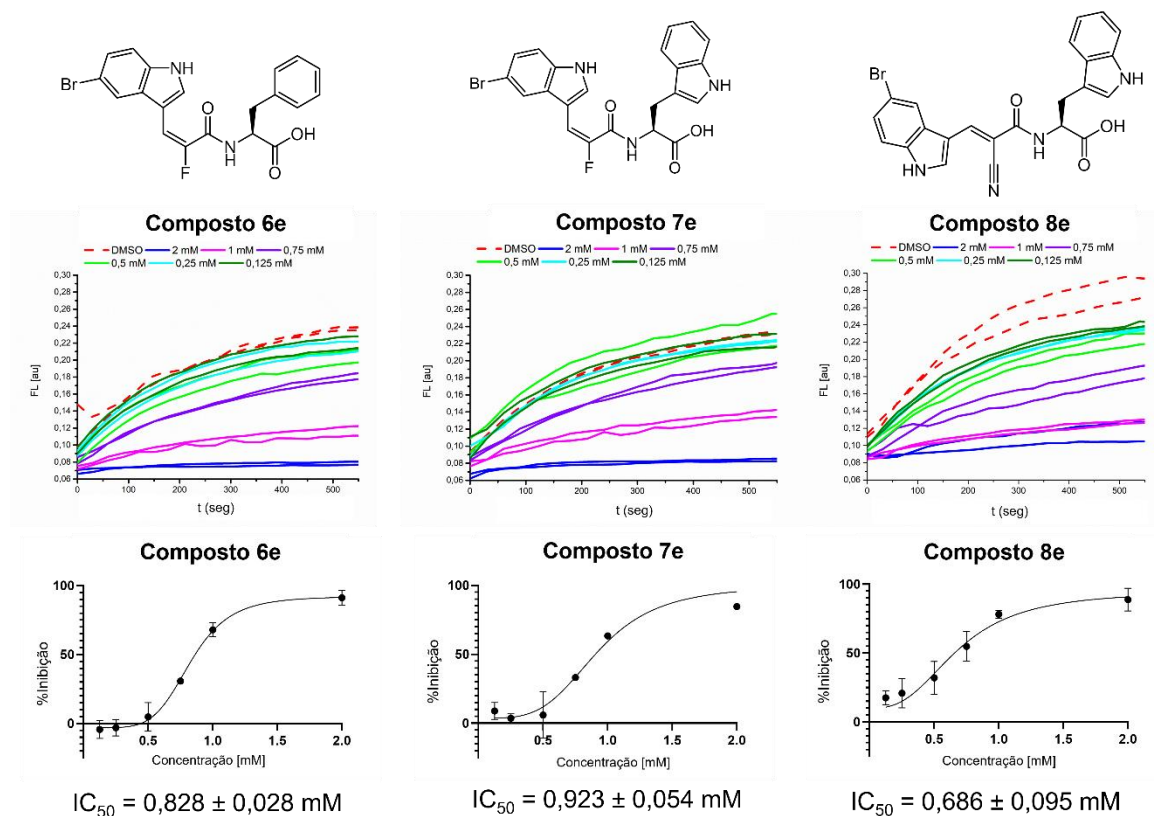
6e	81	CH ₂ -Ph	F	86,81
7e	81	CH ₂ -Indol	F	78,68
8e	81	CH ₂ -Indol	CN	53,46
9e	46	H	F	n.i.
10e	72	CH ₃	F	n.i.
11e	90	H	F	n.i.
12e	24	H	F	n.i.
13e	38	H	F	n.i.

Fonte: Autora, 2025.

Em virtude desses resultados inicialmente promissores, foi realizado o ensaio de IC₅₀ para os compostos mais ativos com as concentrações de 5, 2, 1, 0,75, 0,5, 0,25 e 0,125 mM. Os compostos 6e, 7e e 8e apresentaram valores de IC₅₀ de 0,828 mM, 0,923 mM e 0,686 mM, respectivamente, revelando uma atividade inibitória moderada frente à enzima β -lactamase do *kit* (Figura 54, página 170). Embora todos compartilhem o mesmo substituinte R₁, o anel 5-bromoindol, diferenças nos aminoácidos e nos grupos elétron retiradores influenciaram diretamente seus perfis de inibição.

Curiosamente, na triagem inicial em concentração de 1 mM, os mesmos compostos apresentaram porcentagens de inibição de 86,81% (6e), 78,68% (7e) e 53,46% (8e), sugerindo um perfil de atividade ligeiramente distinto daquele observado nos experimentos de IC₅₀. Essa divergência entre os dados pode ser atribuída a fatores como a sensibilidade do ensaio, possíveis efeitos de agregação ou saturação em altas concentrações. Neste ensaio de IC₅₀, o composto 8e, demonstrou ser o mais potente, o que contrasta diretamente com os ensaios *in silico*. Essa divergência entre os dois resultados pode ser atribuída ao fato de que a repulsão entre aminoácidos presentes no sítio e o grupo ciano eletronegativo anteriormente relatadas podem ser minimizadas em meio biológico em virtude de um encaixe apropriado.

Figura 54. Ensaio de concentração-dependência e IC_{50} dos compostos ativos contra β -lactamase.



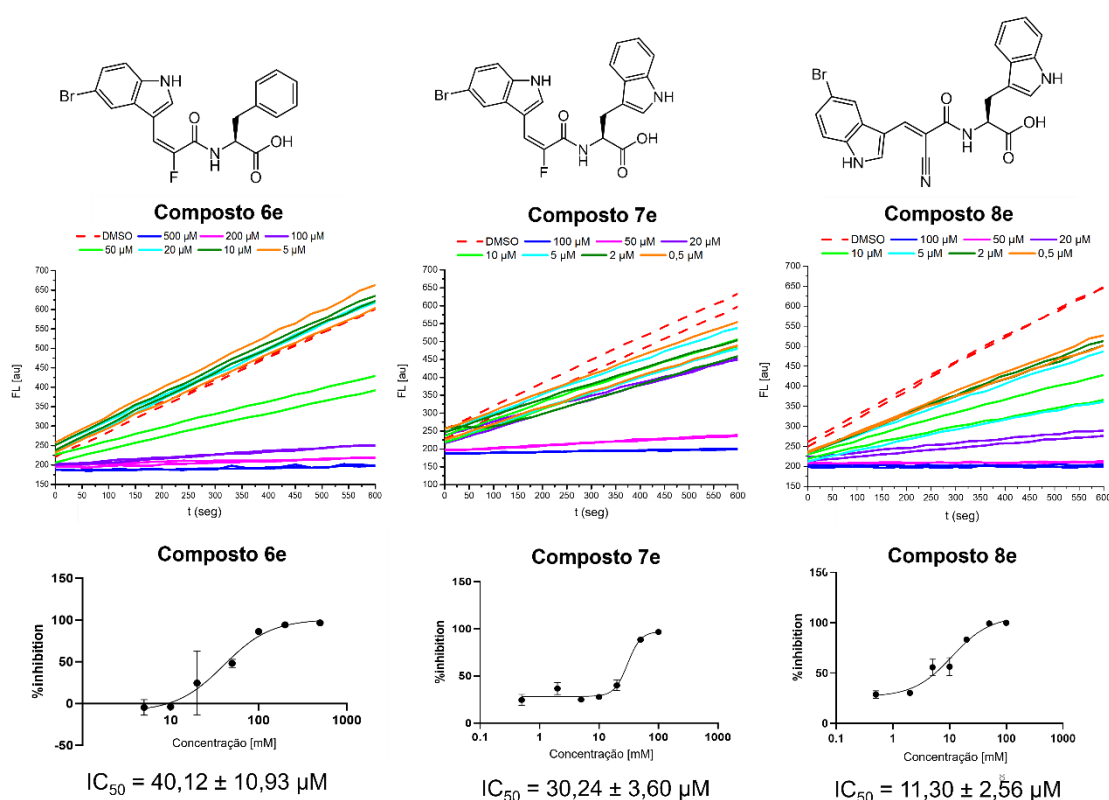
Fonte: Autora, 2025.

Comparativamente, compostos descritos na literatura como inibidores potentes de β -lactamases apresentam frequentemente valores de IC_{50} na faixa micromolar (DOCQUIER; MANGANI, 2018), diferente do que foi observado nessa triagem inicial. No entanto, é importante considerar a limitação do método experimental utilizado: o ensaio adotado demonstrou baixa sensibilidade, sendo o controle positivo (ácido clavulânico) utilizado em uma concentração de 200 μ M. Tal condição pode ter limitado a detecção de efeitos inibitórios mais sutis em concentrações inferiores, influenciando os valores finais de IC_{50} .

Tentando avaliar essa provável limitação, foi realizada uma nova triagem com a enzima tripsina, uma protease bem caracterizada e amplamente utilizada como modelo de serino protease. Todos os compostos foram avaliados em concentração de 20 μ M, e embora novos compostos tenham apresentado inibição contra a enzima, destacam-se os compostos 5e-8e, com porcentagens de inibição de 57,85; 34,94; 60,28 e 73,24% (Tabela 13, página 172). Diante desses novos

resultados, os três compostos ativos para SBL foram conduzidos ao ensaio de IC₅₀ contra a enzima tripsina, utilizando um protocolo mais sensível e revelando valores expressivamente inferiores aos obtidos contra SBL: 40,12 µM para 6e, 30,24 µM para 7e e 11,30 µM para 8e .

Figura 55. Ensaio de concentração-dependência e IC₅₀ dos compostos ativos contra tripsina.



Fonte: Autora, 2025.

A tripsina pertence à família das serino proteases do tipo quimotripsina, e atua clivando peptídeos especificamente após resíduos de lisina e arginina, reconhecendo cargas positivas no sítio S1. Seu mecanismo catalítico é baseado na clássica tríade de serina (Ser195, His57 e Asp102), a qual forma uma rede de interações que estabiliza o estado de transição e permite a hidrólise do substrato (EKICI; PAETZEL; DALBEY, 2008). Essa arquitetura é compartilhada com outras serino proteases, incluindo a SBLs de classe A, embora com diferenças significativas na forma e propriedades eletrostáticas dos sítios de ligação (MARANA et al., 2002).

A atividade consideravelmente maior observada frente à tripsina sugere que os compostos podem apresentar afinidade preferencial por sítios catalíticos típicos

de serino proteases, o que pode estar relacionado à presença de elementos estruturais comuns, como a serina catalítica em uma conformação acessível. A maior sensibilidade do ensaio adotado também pode ter contribuído para a melhor detecção dos efeitos inibitórios, especialmente em concentrações mais baixas.

Tabela 13. Porcentagem de inibição na triagem contra tripsina, compostos 1e-13e e composto comparativo 2f.

The chemical structure shows a tripeptide backbone: $\text{R}_1\text{-CH}=\text{C}(\text{X})\text{-C(=O)-NH-CH(R}_2\text{)-COOH}$. The substituents R_1 , R_2 , and X are highlighted with red dashed circles.

Código	R ₁	R ₂	X	Inibição tripsina a 20 µM [%]
2f	16	CH ₂ -Ph	H	n.i.
1e	33	H	F	n.i.
2e	33	CH ₃	F	n.i.
3e	23	CH ₂ -Ph	F	n.i.
4e	81	H	F	n.i.
5e	81	CH ₃	F	57,85
6e	81	CH ₂ -Ph	F	34,94
7e	81	CH ₂ -Indol	F	60,28
8e	81	CH ₂ -Indol	CN	73,24
9e	46	H	F	n.i.
10e	72	CH ₃	F	48,81
11e	90	H	F	59,74
12e	24	H	F	39,23
13e	38	H	F	n.i.

Fonte: Autora, 2025.

5.5 Ensaios de atividade antibacteriana e sinergismo frente a cepas gram-negativas produtoras de β -lactamases

O ensaio de sinergia é um método experimental que avalia a interação entre duas ou mais substâncias para detectar possíveis interações para realização de funções complexas (BRENNAN-KROHN; KIRBY, 2019). Uma vez que a β -lactamase é uma enzima relacionada à resistência bacteriana, compostos que atuem como potenciais IBLs devem atuar de forma sinérgica com o antibiótico, de forma a recuperar sua atividade, sendo portanto adjuvantes na terapia antimicrobiana. Então, é esperado que estes compostos não apresentem (ou apresentem baixa) atividade antimicrobiana intrínseca, mas que diminuam a concentração inibitória dos antibióticos quando utilizados em combinação.

Para determinar a existência de alguma atividade antimicrobiana intrínseca para os compostos avaliados, foi realizado um ensaio de inibição do crescimento bacteriano na concentração de 256 $\mu\text{g/mL}$ de todos os compostos. Nenhum dos compostos testados apresentou atividade após 24 horas de incubação a 37 °C. Assim como demonstrado na Tabela 14 (página 173), apenas os antibióticos isolados, ampicilina (AMP), meropenem (MEM), ceftriaxona (CRO) e polimixina B (PMB) exibiram atividade antibiótica.

Tabela 14. CIM dos antibióticos testados em três cepas bacterianas MDR.

CEPA MDR	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
	AMP	MEM	CRO	PMB
<i>K. pneumoniae</i> P15-ST11 (KPC)	>256	64	>256	32
<i>K. pneumoniae</i> 86.009 (NDM)	>256	32	256	1
<i>A. baumannii</i> 103 (OXA)	>256	16	>256	1

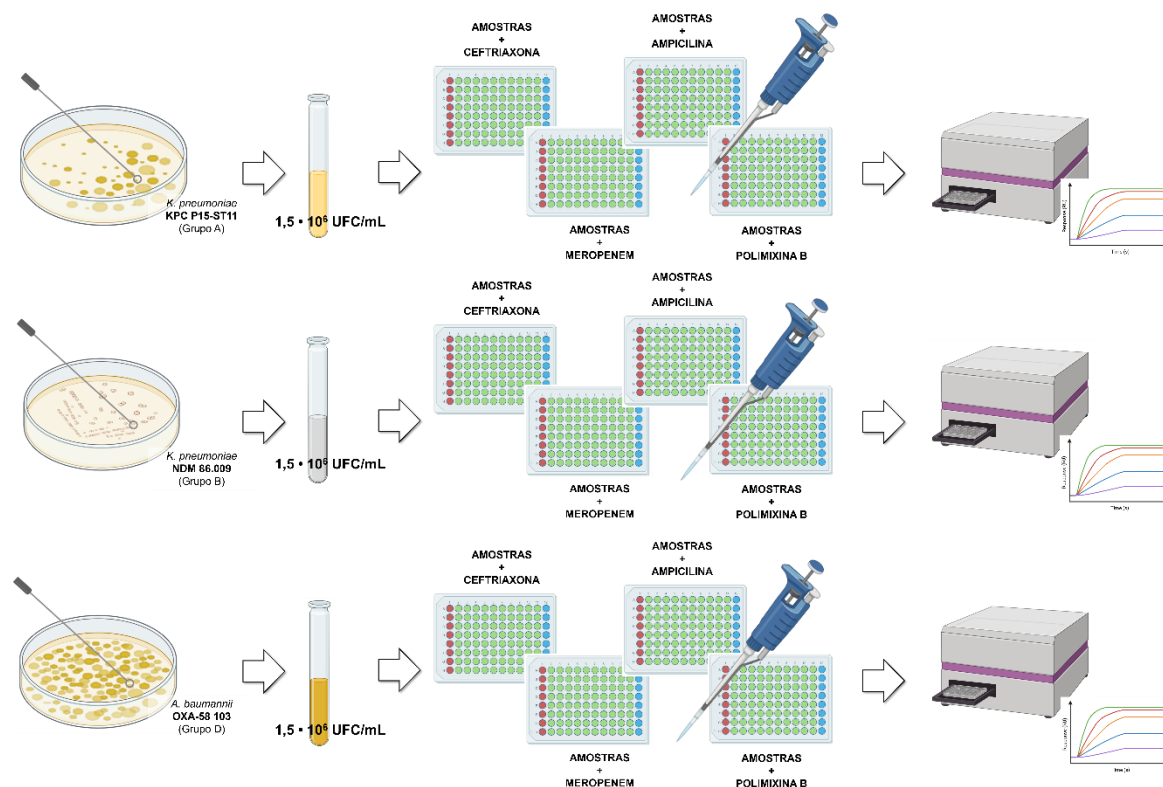
*AMP: Ampicilina; MEM: Meropenem; CRO: Ceftriaxona; PMB: Polimixina B

Fonte: Autora, 2025.

Uma vez que a inexistência de atividade antimicrobiana dos IBLs planejados foi constatada, os compostos foram preparados para o ensaio de sinergia. O esquema do ensaio é demonstrado na Figura 56 (página 174). Para este, foram utilizados isolados clínicos de bactérias multirresistentes (MDR) as quais comprovadamente apresentam como um de seus mecanismos, a presença de β -

lactamases. Assim, as bactérias do tipo *K. pneumoniae* P15-ST11 (KPC) e 86.009 (NDM) foram utilizadas como representantes das classes de β -lactamases A e B (Classificação de Ambler), representando enzimas do tipo SBL e MBL, respectivamente. Outra bactéria também empregada nos ensaios foi a *A. baumannii* 103 (OXA), SBL representante de classe D.

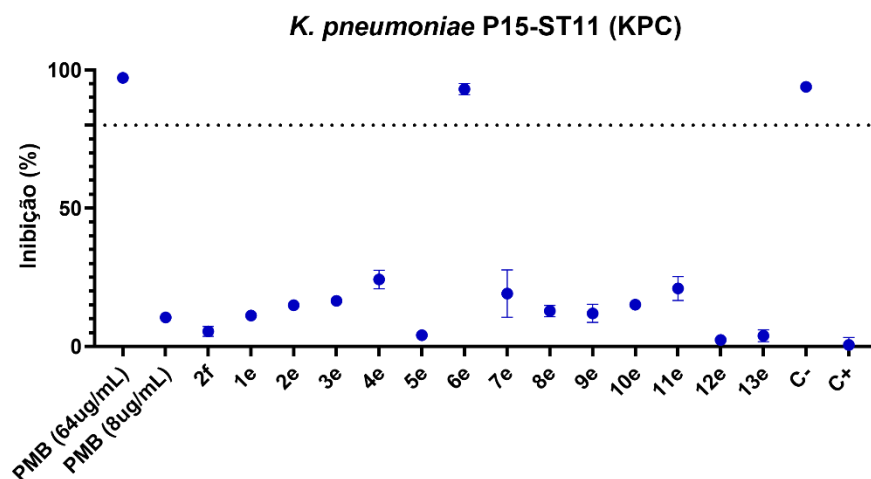
Figura 56. Esquema geral do ensaio de sinergismo realizado.



Fonte: Autora, 2025.

As acrilamidas testadas (compostos 1e-13e) demonstraram uma não sinergia nas três cepas MDR combinadas com três dos quatro antibióticos: ceftriaxona, meropenem e ampicilina. Por outro lado, na combinação com o peptídeo Polimixina B na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ (concentração a qual a cepa apresenta resistência), o composto 6e apresentou atividade sinérgica, sendo utilizado 64 $\mu\text{g/mL}$ para inibição superior a 80% (Figura 57, página 175). A PMB é um antibiótico seletivo para bactérias gram-negativas. Embora frequentemente relacionada a toxicidade potencial, o problema do avanço da resistência antimicrobiana levou a reavaliação de antibióticos antigos como este no atendimento a necessidade global por novos fármacos (FALAGAS; GRAMMATIKOS; MICHALOPOULOS, 2008).

Figura 57. Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano após a adição das combinações de acrilamidas (1e-13e e 2f) com o antibiótico Polimixina B (PMB). Cepas *K. pneumoniae* P15-ST11 (KPC) após 24h. Controle positivo: bactéria sem tratamento; Controle negativo: meio de cultura sem bactéria (controle de esterilidade).



Fonte: Autora, 2025.

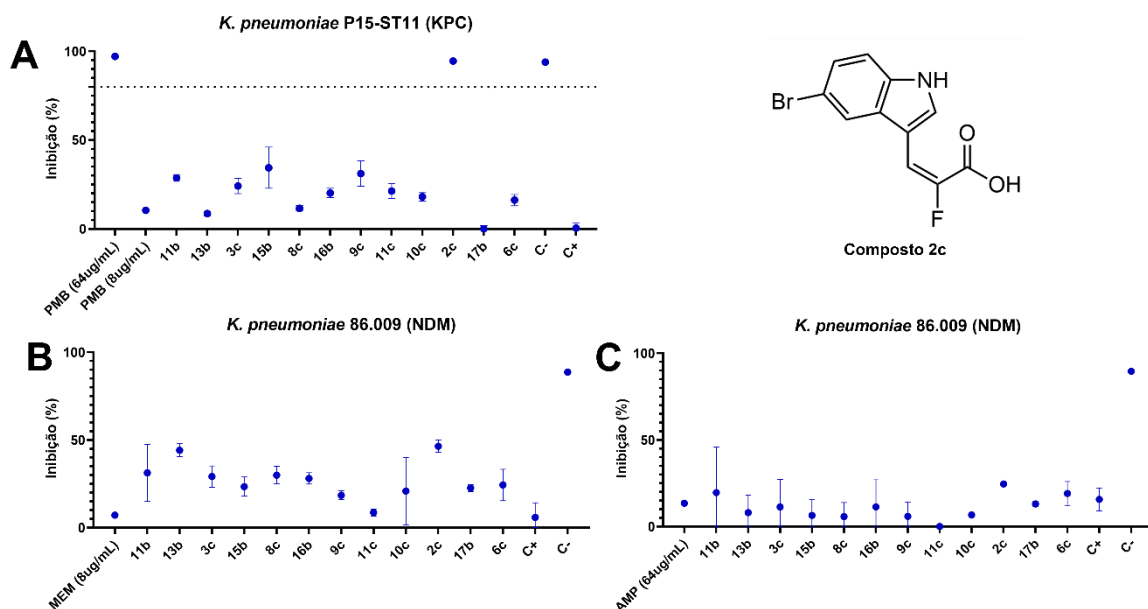
O mecanismo comumente relacionado a resistência bacteriana contra PMB consiste na alteração da membrana, mais especificamente a modificação do lipídio A ou mesmo a perda de lipopolissacarídeos na membrana externa (JIANG et al., 2020). No entanto, casos de resistência antimicrobiana a este antibiótico estão sendo relatados em cepas produtoras de β -lactamases, inclusive em hospitais brasileiros (A et al., 2012; OLSSON et al., 2023; TRIMBLE et al., 2016), enquanto outros trabalhos relatam que a resistência à PMB surge rapidamente em organismos produtores de NDM tratados com esse antibiótico em monoterapia (ARPIN et al., 2012; KUMARASAMY et al., 2010; LIVERMORE et al., 2011). Logo, é razoável imaginar que uma combinação sinérgica entre PMB e um potencial adjuvante pode reduzir CIM da PMB, o que pode permitir o seu uso em concentrações reduzidas e potencializar sua atividade antimicrobiana.

No que diz respeito a estrutura química do composto ativo (composto 6e) é importante destacar novamente que este apresenta desde os ensaios enzimáticos atividade adjuvante promissora, o que nos leva a inferir que a presença do anel 5-bromoindol na estrutura pode atuar como unidade de reconhecimento dentro do sítio catalítico da enzima ou mesmo fazer interações importantes para a inibição do mecanismo de resistência, interferindo diretamente no crescimento bacteriano.

Para avaliar a interferência dos substituintes aminoácidos na estrutura e reconhecer um padrão de atividade relacionada ao grupo aromático, foram realizados ensaios também com os ácidos acrílicos intermediários de reação e outros adicionais estruturalmente semelhantes.

A triagem com os ácidos acrílicos revelou algumas características importantes. O ácido acrílico intermediário do composto 6e também apresentou concentração inibitória superior a 80% em uma combinação com PMB contra a mesma cepa resistente (A - Figura 58, página 176). O que demonstra a importância do *warhead* escolhido para a manutenção dessa atividade adjuvante com a PMB. Adicionalmente, o mesmo ácido acrílico apresentou aproximadamente 50% de inibição contra *K. pneumoniae* (NDM) em combinação com meropenem, e cerca de 25% de inibição contra a mesma enzima em combinação com ampicilina (B e C - Figura 58, página 176).

Figura 58. Atividade sinérgica entre os ácidos acrílicos e (A) Polimixina B (PMB) (B) Meropenem (MEM) e (C) Ampicilina (AMP); Porcentagem de inibição do crescimento de *K. pneumoniae* 86.009 (NDM) após 24 h. Destaque para o composto 2c, ácido acrílico intermediário da acrilamida ativa.

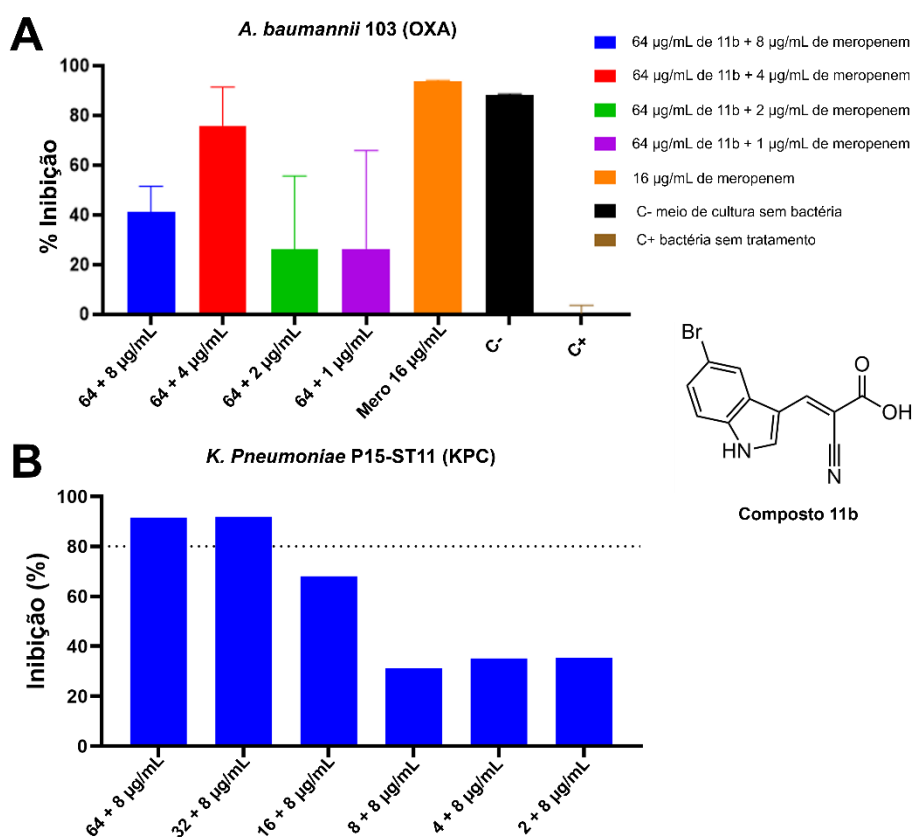


Fonte: Autora, 2025.

Curiosamente, o análogo ciano-substituído 11b também apresentou atividade promissora. A combinação entre o composto 11b + MEM apresenta atividade inibitória comparável ao MEM isolado (16 µg/mL) na combinação de 64

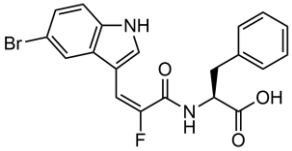
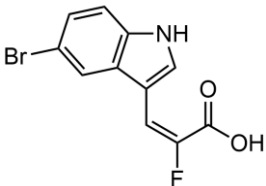
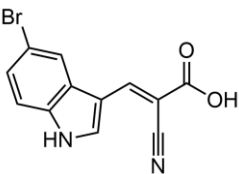
$\mu\text{g/mL}$ + 4 $\mu\text{g/mL}$ frente à *A. baumannii* 103 (Figura 59, página 177). Além disso, este também apresentou atividade inibitória contra a cepa *K. pneumoniae* (KPC) superior a 80% nas concentrações de 64 e 32 $\mu\text{g/mL}$ em combinação com PMB 8 $\mu\text{g/mL}$. Quanto aos demais ácidos acrílicos testados, estes apresentaram atividade inibitória baixa ou praticamente nula em combinação com os diversos antibióticos testados e contra todas as cepas bacterianas. O que fortaleceu a nossa compreensão de que o heterociclo 5-bromindol confere uma característica adicional às estruturas, tornando-as ativas frente a cepas bacterianas testadas. Novos testes para determinação da menor concentração necessária para manutenção da atividade sinérgica estão sendo realizados, e podem apresentar estimativas ainda mais promissoras.

Figura 59. Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano pela combinação dos antibióticos meropenem (MEM) e Polimixina (PMB) com o composto 11b. Em A, o composto 11b (64 $\mu\text{g/mL}$) foi testado em diferentes concentrações do antibiótico MEM na cepa *A. baumannii* (103). Em B, foi fixada a concentração de Polimixina B (8 $\mu\text{g/mL}$) variando-se a concentração do composto 11b (8-2 $\mu\text{g/mL}$). Controle positivo: bactéria sem tratamento; Controle negativo: meio de cultura sem bactéria. Inibição após 24 horas.



Fonte: Autora, 2025.

Tabela 15. Resumo das principais atividades observadas nas cepas MDR testadas.

Estrutura e Código	Antibiótico combinado	Cepa	% de Inibição e Concentração da combinação (composto: antibiótico)
 Composto 6e	PMB	<i>K. pneumoniae</i> (KPC)	~ 93,03%; 64:8 µg/mL
 Composto 2c	PMB	<i>K. pneumoniae</i> (KPC)	~ 94,5%; 64:8 µg/mL
	MEM	<i>K. pneumoniae</i> (NDM)	~ 50,0%; 64:8 µg/mL
	AMP	<i>K. pneumoniae</i> (NDM)	~ 25,0%; 64:64 µg/mL
 Composto 11b	PMB	<i>K. pneumoniae</i> (KPC)	~ 80,0%; 32:8 µg/mL
	MEM	<i>A. baumannii</i> (OXA)	~ 80,0%; 64:8 µg/mL

Fonte: Autora, 2025.

Com o avanço da resistência antimicrobiana nos últimos anos, é necessário avaliar novos candidatos a adjuvantes da terapia antimicrobiana através da ótica das bactérias multirresistentes. Essas bactérias são patogênicas mortais, que se tornaram uma ameaça séria a saúde humana. As bactérias gram-negativas aqui avaliadas pertencem a esse grupo e refletem um cenário real na luta pela resistência (BHARADWAJ et al., 2022). Para o antibiótico Polimixina, embora a concentração de 64 µg/mL seja suficiente para a inibição do crescimento bacteriano, a concentração de 8 µg/mL apresenta resistência. No entanto, através da combinação com os compostos 6e, 2c e 11b, a concentração de PMB foi reduzida 8 vezes em ensaios preliminares.

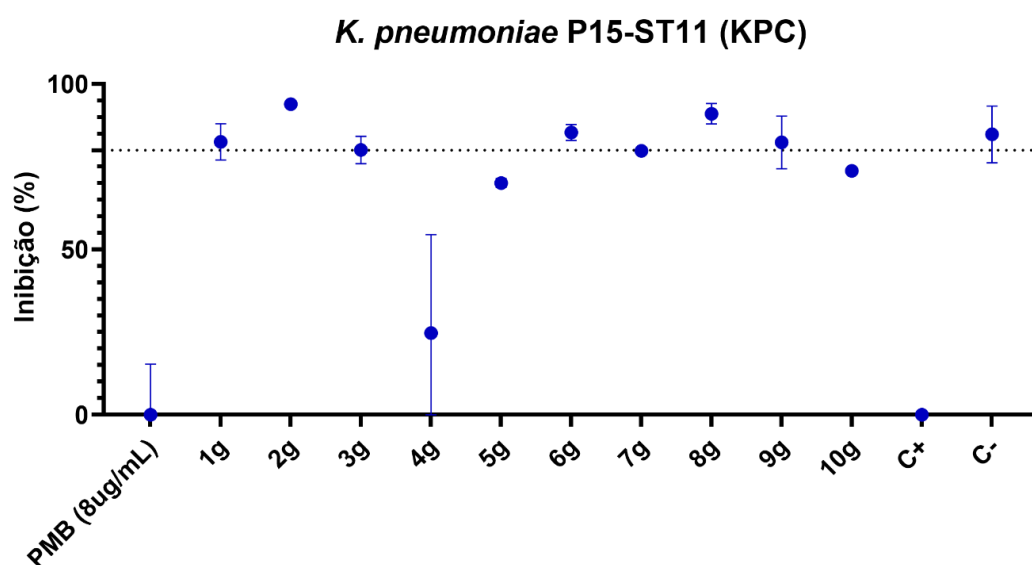
De fato, essa abordagem já foi relatada em outros trabalhos. Por exemplo, uma pesquisa avaliou a combinação da polimixina B com netropsina contra isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes, observando uma diminuição de até 8 vezes na MIC da polimixina B (CHUNG et al., 2016). Por outro lado, o estudo de Ofek et al. (1994) investigou a sinergia entre a Polimixina B e antibióticos hidrofóbicos em infecções por bactérias gram-negativas em camundongos, o que evidenciou uma redução de oito vezes ou mais na MIC da novobiocina quando combinada a PMB. Adicionalmente, uma série de 2-aminotiazolil bicíclicos também foi avaliado quanto a seus efeitos sinérgicos com PMB, o que resultou em reduções significativas da concentração inibitória *K. pneumoniae* (WANG et al., 2017). Em todos os trabalhos, a redução da concentração inibitória da PMB opõe-se diretamente a seu potencial tóxico em monoterapia.

Infelizmente, como já relatado anteriormente, as acrilamidas α -substituídas por tiol não puderam ser sintetizadas, embora diversas rotas sintéticas tenham sido avaliadas. No entanto durante esse processo, algumas rodaninas foram sintetizadas como intermediários de reação. O trabalho de Brem et al. (2014) já havia destacado a importância desse grupo químico como um potencial inibidor de β -lactamase do tipo NDM, o que nos motivou a avaliar a atividade inibitória de algumas rodaninas sintetizadas contra as mesmas cepas bacterianas MDR que as acrilamidas e ácidos acrílicos sintetizados. Assim como a maioria das acrilamidas e ácidos acrílicos, nenhuma atividade inibitória sinérgica foi observada entre as rodaninas sintetizadas e os antibióticos ampicilina, meropenem e ceftriaxona nas três cepas de estudo. No entanto, uma importante atividade foi observada para a maioria das rodaninas em combinação com o antibiótico polimixina B. Com exceção dos compostos 5g e 10g, todas as outras rodaninas testadas apresentaram porcentagem de inibição igual ou superior a 80%, o que destaca esse grupo químico como um potencial adjuvante de PMB (Figura 60, página 180).

Esse resultado é ainda mais interessante quando comparado ao relatado por outros autores. A atividade inibitória de rodaninas contra cepas produtoras de metalo- β -lactamases é bem reportada, onde já foi destacado que esse grupo pode se ligar ao sítio ativo de MBLs de uma maneira que não envolva a quelatação de metais (LI et al., 2017a; XIANG et al., 2018). No entanto, poucos estudos relatam a

atividade contra KPC, sendo portanto uma nova abordagem para terapia adjuvante dessa enzima clinicamente relevante. Diante desse cenário, novos testes em concentrações reduzidas estão sendo realizados com as rodaninas ativas, de forma a avaliar a melhor concentração que produz o efeito sinérgico e reduza a concentração terapêutica do antibiótico.

Figura 60. Porcentagem de inibição do crescimento de *K. pneumoniae* P15-ST11 (KPC) pela combinação de derivados de rodaninas e PMB após 24h.



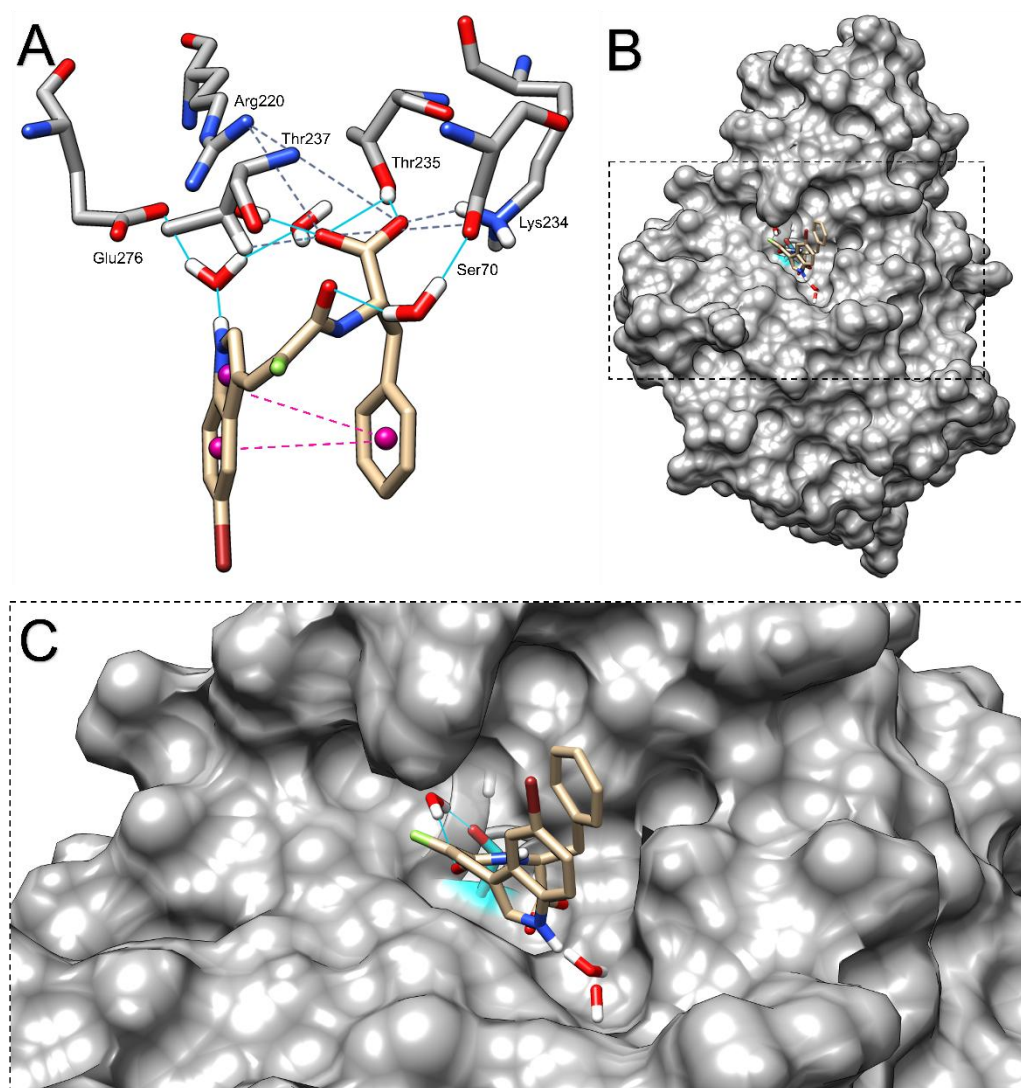
Fonte: Autora, 2025.

5.6 Ensaios *in silico* de dinâmica molecular

Com o objetivo de mapear as possíveis interações essenciais no sítio catalítico, foram realizados os ensaios de dinâmica molecular com as acrilamidas ativas contendo o substituinte 5-bromoindol. Para a acrilamida de destaque 6e, algumas considerações podem ser feitas. Durante toda a simulação de dinâmica molecular (100 ns), foi possível observar interações moleculares significativas entre o ligante e resíduos críticos do sítio ativo da enzima. O mapa de interações enzima-ligante revela contatos permanentes entre o ligante e o resíduo de Ser70. Ao analisar a natureza dessas interações, foi identificada uma ponte de hidrogênio mediada por água envolvendo o resíduo Ser70 ao longo da simulação (Figura 61, página 181). Além disso, a presença de moléculas de água mediando pontes de hidrogênio entre o ligante e resíduos polares próximos, como Thr237 e Asn132, pode contribuir para a estabilização do complexo proteína-ligante por meio de uma

rede de interações indiretas, reforçando o ancoramento da molécula ao sítio catalítico.

Figura 61. Interações de 6e com o sítio catalítico. A: Em azul, as pontes de água e em rosa, o empilhamento π - π detectados na simulação. B: Superfície da enzima demonstrando a interação do composto no sítio ativo e C: Posição de 6e com relação ao resíduo de Ser70.

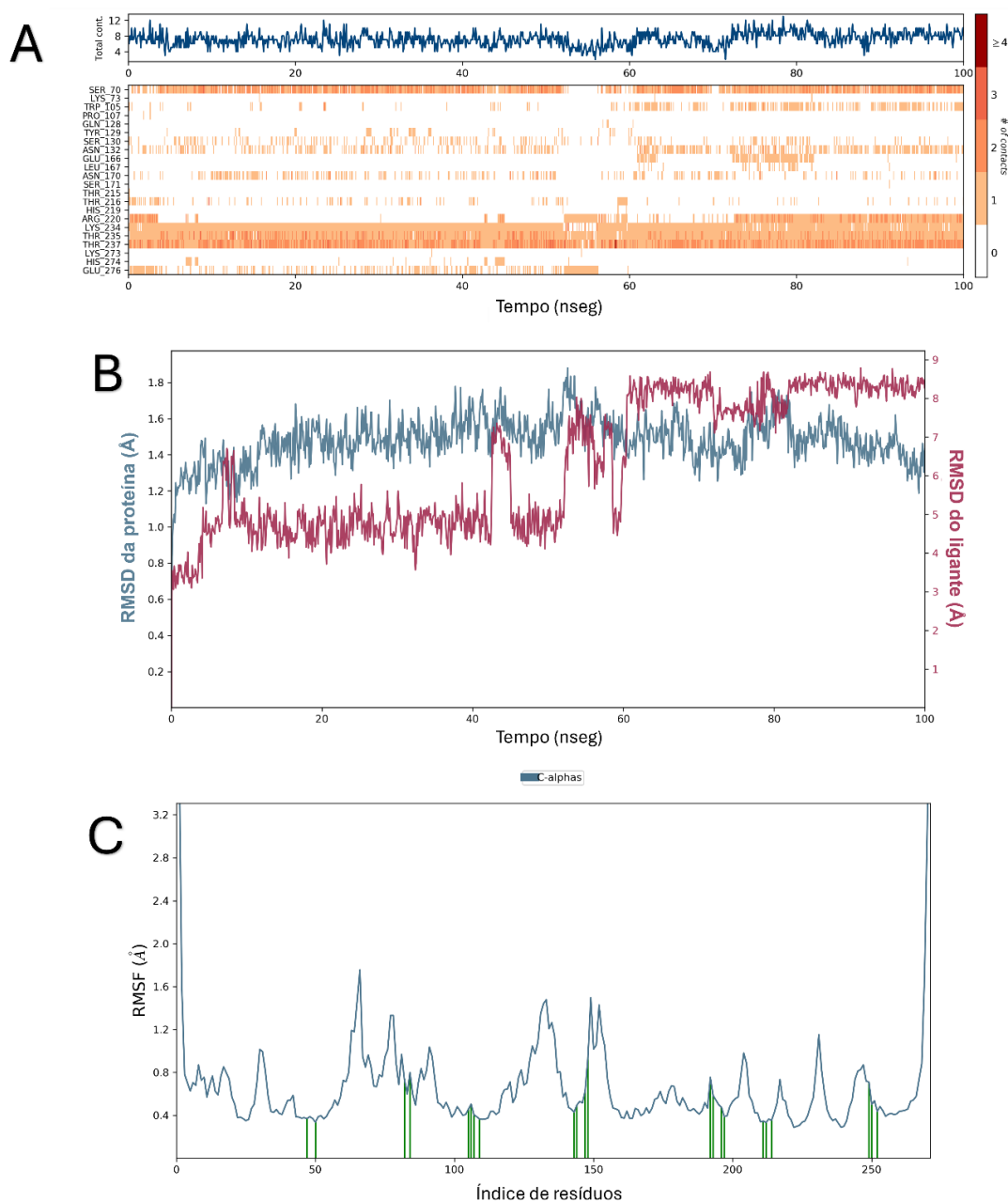


Fonte: Autora, 2025.

Outra característica importante identificada foi uma interação intramolecular do tipo empilhamento π - π entre a função benzil e o grupo indol presentes na estrutura do ligante. Essa interação pode favorecer a conformação mais compacta e estável da molécula durante a simulação, contribuindo indiretamente para a estabilidade do complexo. Essa teoria é corroborada pelo gráfico de RMSD da proteína, que se mantém relativamente estável em torno de 1,4–1,6 Å ao longo da

simulação, indicando boa estabilidade estrutural (B - Figura 62, página 182). Adicionalmente, o RMSD do ligante, apesar de apresentar flutuações mais evidentes após 50 ns, se estabiliza próximo a 8 Å, sugerindo possível reorganização conformacional dentro do sítio ativo, mas sem perda total da interação. O gráfico de RMSF indica ainda que os resíduos mais próximos do sítio ativo (inclusive Ser70) não apresentam grandes flutuações, o que reforça a ideia de que a região catalítica permaneceu rígida mesmo diante da interação com o ligante (C - Figura 62, página 182).

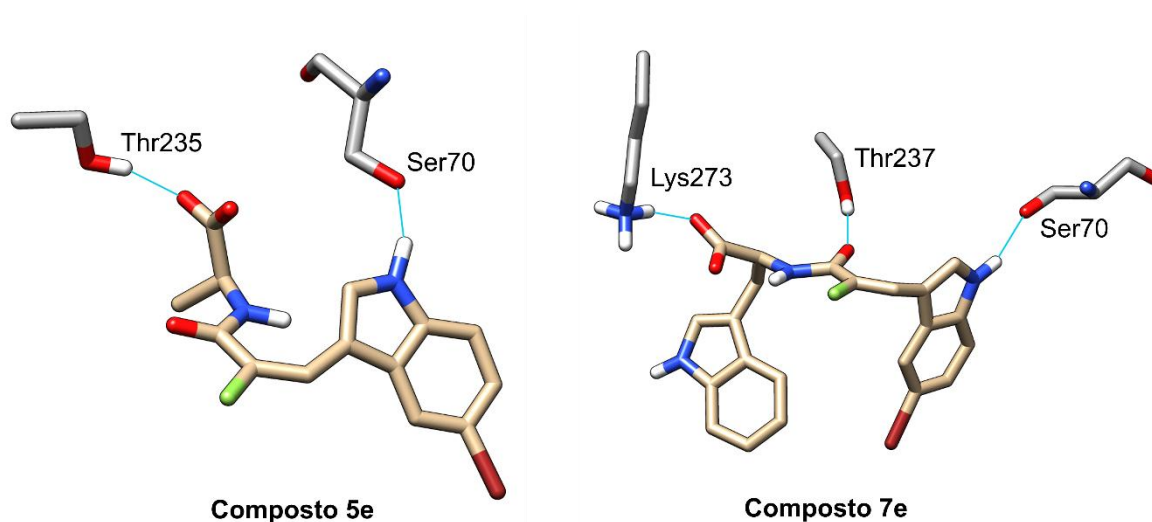
Figura 62. A: Principais contatos com os resíduos da enzima ao longo do tempo de simulação. B: RMSD da proteína e do ligante e C: RMSF da simulação.



Fonte: Autora, 2025.

Em contrapartida, as simulações realizadas com as demais acrilamidas demonstraram uma tendência, especialmente para os compostos 5e e 7e. Observou-se um padrão recorrente de interação, onde todos os compostos mantiveram-se ancorados ao sítio ativo por meio de uma ligação de hidrogênio direta e estável entre o resíduo catalítico Ser70 e o NH do anel indol presente nas estruturas (Figura 63, página 183). Essa interação reforça a importância do grupo 5-bromoindol para o reconhecimento e estabilização do ligante no sítio ativo, sugerindo que ele atua como um ponto chave na orientação e posicionamento do composto em relação aos resíduos catalíticos.

Figura 63. Principais interações para os compostos 5e e 7e. Destaca-se as interações de hidrogênio, especialmente a mediada entre o NH do heterociclo e o resíduo de Ser70.



Fonte: Autora, 2025.

Apesar das semelhanças estruturais, apenas o composto 6e apresentou atividade biológica significativa nos ensaios de sinergismo. Os demais compostos, embora tenham demonstrado alguma inibição enzimática, não exibiram efeito adjuvante nos ensaios de sinergismo. Esse dado reforça a hipótese de que a presença do grupo fenilalanina contribui com interações adicionais ou propriedades físico-químicas essenciais para a permeabilidade, estabilidade ou reconhecimento celular, sendo determinante para a atividade inibitória adjuvante.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesse trabalho, foi utilizada com sucesso a estratégia de triagem virtual para a seleção de acrilamidas α,β -insaturadas como potenciais inibidores de proteases de interesse clínico. As proteases analisadas foram a rodesaína de *T. brucei* e a β -lactamase do tipo KPC e NDM. O método de triagem virtual estabelecido permitiu a seleção de 36 compostos a partir dos 1350 testados contra SBL e MBL e de 34 compostos a partir dos 40 testados contra rodesaína. Todos os compostos sinteticamente viáveis aprovados para SBL contendo o grupo elétron-retirador flúor foram sintetizados, totalizando 11 compostos, com rendimentos satisfatórios para a rota empregada. Para a série HomoPhe, 13 dos 40 ésteres foram sintetizados.

Os compostos HomoPhe foram avaliados quanto a sua capacidade de inibição enzimática frente a cisteíno proteases, mas não apresentaram atividade inibitória. Em contrapartida, nos ensaios de acrilamidas contra serino proteases, observou-se que 3 compostos apresentaram atividade inibitória contra SBL. Adicionalmente, foi realizado o ensaio com a enzima tripsina, onde os mesmos compostos foram destacáveis. Os ensaios de sinergismo demonstraram uma atividade sinérgica com polimixina B para o composto 6e e para os correspondentes ácidos acrílicos intermediários. Ensaios de dinâmica molecular revelaram para o composto ativo 6e, interações de hidrogênio mediadas por água, diferente dos outros compostos ativos apenas nos ensaios enzimáticos, que apresentaram pontes de hidrogênio diretas entre o NH do 5-bromoindol e a Ser70. Adicionalmente, uma importante atividade inibitória dos compostos análogos de rodanina contra a cepa KPC resistente a polimixina foi descoberta.

Esses achados revelaram que as acrilamidas α,β -insaturadas substituídas por flúor aceptoras de Michael podem atuar como inibidoras de β -lactamase, em especial, as que apresentam o heterociclo 5-bromoindol. Concluímos que esse heterociclo aromático pode atuar como unidade de reconhecimento e estabilidade para os compostos ativos, garantindo atividade adjuvante frente às cepas testadas. Em contrapartida, os compostos α,β -insaturados aqui planejados não foram bons para cisteíno proteases. O que pode direcionar nossa perspectiva, para uma inibição seletiva de serino-proteases.

As perspectivas atuais contam com novos ensaios de inibição sob diferentes concentrações para os compostos que apresentaram sinergismo nas cepas resistentes, de forma a identificar as melhores concentrações para inibição do crescimento bacteriano. Adicionalmente, uma patente relacionada às rodaninas ativas está sendo escrita. Finalmente, novos ensaios *in vitro* para avaliar o potencial bactericida ou bacteriostático da combinação também estão sendo executados.

7. REFERÊNCIAS

- A, Cassiolato; H, Camargo; M, Bueno; G, Francisco; F, Macedo; D., Garcia. Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC e resistentes à polimixina B de diferentes hospitais do estado de São Paulo. **Rev Inst Adolfo Lutz [Internet]**, [S. l.], v. 71, 2012. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/40427>.
- AL-REFAI, Mahmoud; ALI, Basem F.; SAID, Ala'a B.; GEYER, Armin; MARSCH, Michael; HARMS, Klaus. Synthesis, characterization, crystal structure and supramolecularity of ethyl (E)-2-cyano-3-(3-methylthiophen-2-yl)acrylate and a new polymorph of ethyl (E)-2-cyano-3-(thiophen-2-yl)acrylate. **Acta Crystallographica Section E Crystallographic Communications**, [S. l.], v. 75, n. 9, p. 1357–1361, 2019. ISSN: 2056-9890. DOI: 10.1107/S2056989019011435. Disponível em: <https://journals.iucr.org/paper?S2056989019011435>.
- ALLINGER, Norman L. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 99, n. 25, p. 8127–8134, 1977. ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/ja00467a001. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00467a001>.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, [S. l.], v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980. ISSN: 09628436. DOI: 10.1098/rstb.1980.0049.
- ARPIN, Corinne; NOURY, Patrick; BORAUD, Delphine; COULANGE, Laure; MANETTI, Alain; ANDRÉ, Catherine; M'ZALI, Fatima; QUENTIN, Claudine. NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Resistant to Colistin in a French Community Patient without History of Foreign Travel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 56, n. 6, p. 3432–3434, 2012. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.00230-12. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00230-12>.
- ASTRAZENECA. **To Investigate the Safety and Tolerability of Aztreonam-Avibactam (ATM-AVI)**. 2023. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01689207?term=aztreonam+avibactam>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- BARLOS, KLEOMENIS; GATOS, DIMITRIOS; HATZI, OLGA; KOCH, NICOLE; KOUTSOGIANNI, SOFIA. Synthesis of the very acid-sensitive Fmoc-Cys(Mmt)-OH and its application in solid-phase peptide synthesis. **International Journal of Peptide and Protein Research**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 148–153, 1996. ISSN: 0367-8377. DOI: 10.1111/j.1399-3011.1996.tb01338.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3011.1996.tb01338.x>.
- BARRETT, A. J.; KEMBHAVI, A. A.; BROWN, M. A.; KIRSCHKE, H.; KNIGHT, C. G.; TAMAI, M.; HANADA, K. L- trans -Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 201, n. 1, p. 189–198, 1982. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/bj2010189. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article/201/1/189/13523/L-trans->

Epoxysuccinyl-leucylamido-4-guanidino.

BAUERNFEIND, A.; SCHWEIGHART, S.; GRIMM, H. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 294–298, 1990. ISSN: 0300-8126. DOI: 10.1007/BF01647010. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF01647010>.

BAYNES, Ronald E. et al. Health concerns and management of select veterinary drug residues. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 88, p. 112–122, 2016. ISSN: 02786915. DOI: 10.1016/j.fct.2015.12.020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691515301290>.

BEBRONE, Carine; DELBRÜCK, Heinrich; KUPPER, Michaël B.; SCHLÖMER, Philipp; WILLMANN, Charlotte; FRÈRE, Jean-Marie; FISCHER, Rainer; GALLENI, Moreno; HOFFMANN, Kurt M. V. The Structure of the Dizinc Subclass B2 Metallo- β -Lactamase CphA Reveals that the Second Inhibitory Zinc Ion Binds in the Histidine Site. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 53, n. 10, p. 4464–4471, 2009. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.00288-09. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00288-09>.

BEBRONE, Carine; LASSAUX, Patricia; VERCHEVAL, Lionel; SOHIER, Jean-Sébastien; JEHAES, Adrien; SAUVAGE, Eric; GALLENI, Moreno. Current Challenges in Antimicrobial Chemotherapy. **Drugs**, [S. l.], v. 70, n. 6, p. 651–679, 2010. ISSN: 0012-6667. DOI: 10.2165/11318430-000000000-00000. Disponível em: <http://link.springer.com/10.2165/11318430-000000000-00000>.

BEHESHTI, Maryam; ARDEBILI, Abdollah; BEHESHTI, Fatemeh; LARI, Abdolaziz Rastegar; SIYADATPANAH, Abolghasem; POURNAJAF, Abazar; GAUTAM, Deepan; DOLMA, Karma Gyurmey; NISSAPATORN, Veeranoot. Tetracycline resistance mediated by tet efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S. l.], v. 62, 2020. ISSN: 1678-9946. DOI: 10.1590/s1678-9946202062088. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652020000100242&tlng=en.

BELL, R. P.; DOWDING, A. L.; NOBLE, J. A. The kinetics of ester hydrolysis in concentrated aqueous acids. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, [S. l.], p. 3106, 1955. ISSN: 0368-1769. DOI: 10.1039/jr9550003106. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=jr9550003106>.

BELLAIS, Samuel; POIREL, Laurent; LEOTARD, Sophie; NAAS, Thierry; NORDMANN, Patrice. Genetic Diversity of Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamases from *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) indologenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 44, n. 11, p. 3028–3034, 2000. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.44.11.3028-3034.2000. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.44.11.3028-3034.2000>.

BHARADWAJ, Alok; RASTOGI, Amisha; PANDEY, Swadha; GUPTA, Saurabh; SOHAL, Jagdip Singh. Multidrug-Resistant Bacteria: Their Mechanism of Action and Prophylaxis. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2022, n. 1, 2022. ISSN: 2314-6133. DOI: 10.1155/2022/5419874. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2022/5419874>.

BILLAH, Md. Mustahsan; RANA, S. M. Masud; HOSSAIN, Mohammad Salim;

AHAMED, Sayed Koushik; BANIK, Sujana; HASAN, Moynul. Ciprofloxacin residue and their impact on biomolecules in eggs of laying hens following oral administration. **International Journal of Food Contamination**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 13, 2015. ISSN: 2196-2804. DOI: 10.1186/s40550-015-0019-x. Disponível em: <https://foodcontaminationjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40550-015-0019-x>.

BONNER, D. P.; WHITNEY, R. R.; BAUGHN, C. O.; MILLER, B. H.; OLSEN, S. J.; SYKES, R. B. In-vivo properties of SQ 26,776. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 8, n. suppl E, p. 123–130, 1981. ISSN: 0305-7453. DOI: 10.1093/jac/8.suppl_E.123. Disponível em: https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/8.suppl_E.123.

BREM, Jürgen et al. Rhodanine hydrolysis leads to potent thioenolate mediated metallo- β -lactamase inhibition. **Nature Chemistry**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. 1084–1090, 2014. ISSN: 1755-4330. DOI: 10.1038/nchem.2110. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nchem.2110>.

BREM, Jürgen et al. Imitation of β -lactam binding enables broad-spectrum metallo- β -lactamase inhibitors. **Nature Chemistry**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 15–24, 2022. ISSN: 1755-4330. DOI: 10.1038/s41557-021-00831-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41557-021-00831-x>.

BREM, Jürgen; VAN BERKEL, Sander S.; ZOLLMAN, David; LEE, Sook Y.; GILEADI, Opher; MCHUGH, Peter J.; WALSH, Timothy R.; MCDONOUGH, Michael A.; SCHOFIELD, Christopher J. Structural Basis of Metallo- β -Lactamase Inhibition by Captopril Stereoisomers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 142–150, 2016. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.01335-15. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01335-15>.

BRENNAN-KROHN, Thea; KIRBY, James E. Antimicrobial Synergy Testing by the Inkjet Printer-assisted Automated Checkerboard Array and the Manual Time-kill Method. **Journal of Visualized Experiments**, [S. l.], n. 146, 2019. ISSN: 1940-087X. DOI: 10.3791/58636. Disponível em: <https://app.jove.com/t/58636>.

BRISSON, J. R.; CAREY, P. R.; STORER, A. C. Benzoylamidoacetonitrile is bound as a thioimide in the active site of papain. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 261, n. 20, p. 9087–9, 1986. ISSN: 0021-9258. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3722189>.

BRÖMME, D.; KLAUS, J. L.; OKAMOTO, K.; RASNICK, D.; PALMER, J. T. Peptidyl vinyl sulphones: a new class of potent and selective cysteine protease inhibitors: S2P2 specificity of human cathepsin O2 in comparison with cathepsins S and L. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 315, n. 1, p. 85–89, 1996. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/bj3150085. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article/315/1/85/32520/Peptidyl-vinyl-sulphones-a-new-class-of-potent-and>.

BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J. D.; READING, C.; ROLINSON, G. N. Naturally-occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. **The Journal of Antibiotics**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 668–669, 1976. ISSN: 0021-8820. DOI: 10.7164/antibiotics.29.668. Disponível em: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/antibiotics1968/29.668?from=CrossRef>.

BROWN, David. Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 821–832, 2015. ISSN: 1474-1776. DOI: 10.1038/nrd4675. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd4675>.

BULYCHEV, Alexey; BELLETTINI, John R.; O'BRIEN, Michael; CROCKER, Peter J.; SAMAMA, Jean-Pierre; MILLER, Marvin J.; MOBASHERY, Shahriar. N-Sulfonyloxy- β -lactam Inhibitors for β -Lactamases. **Tetrahedron**, [S. l.], v. 56, n. 31, p. 5719–5728, 2000. ISSN: 00404020. DOI: 10.1016/S0040-4020(00)00427-0. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402000004270>.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.39.6.1211. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.39.6.1211>.

BUSH, Karen. Metallo- β -Lactamases: A Class Apart. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 27, n. s1, p. S48–S53, 1998. ISSN: 1058-4838. DOI: 10.1086/514922. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/514922>.

BUSH, Karen. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 62, n. 10, 2018. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.01076-18. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01076-18>.

BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. a025247, 2016. ISSN: 2157-1422. DOI: 10.1101/cshperspect.a025247. Disponível em: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a025247>.

BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 295–306, 2019. ISSN: 1740-1526. DOI: 10.1038/s41579-019-0159-8. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-019-0159-8>.

BUSH, Karen; JACOBY, George A. **Updated functional classification of β -lactamases**. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**American Society for Microbiology (ASM), 2010. ISSN: 00664804. DOI: 10.1128/AAC.01009-09.

BÜTTNER, Dominik et al. Challenges in the Development of a Thiol-Based Broad-Spectrum Inhibitor for Metallo- β -Lactamases. **ACS Infectious Diseases**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 360–372, 2018. ISSN: 2373-8227. DOI: 10.1021/acsinfecdis.7b00129. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.7b00129>.

CAFFREY, Conor R. et al. Active site mapping, biochemical properties and subcellular localization of rhodesain, the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei* rhodesiense. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S. l.], v. 118, n. 1, p. 61–73, 2001. ISSN: 01666851. DOI: 10.1016/S0166-6851(01)00368-1. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166685101003681>.

CAMPAIGNE, E.; CLINE, RICHARD E. Preparation and Absorption Spectra of

Some β -Aryl- α -Mercaptoacrylic Acids and Related Disulfides 1,2. **The Journal of Organic Chemistry**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 32–38, 1956. ISSN: 0022-3263. DOI: 10.1021/jo01107a006. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo01107a006>.

CARDOSO, Olga; LEITÃO, Rui; FIGUEIREDO, Alexandra; SOUSA, João Carlos; DUARTE, Aida; PEIXE, Luísa Vieira. Metallo- β -Lactamase VIM-2 in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. **Microbial Drug Resistance**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 93–97, 2002. ISSN: 1076-6294. DOI: 10.1089/107662902760190635. Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/107662902760190635>.

CARFI, A.; PARES, S.; DUÉE, E.; GALLEN, M.; DUEZ, C.; FRÈRE, J. M.; DIDEBERG, O. The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. **The EMBO Journal**, [S. l.], v. 14, n. 20, p. 4914–4921, 1995. ISSN: 02614189. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00174.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00174.x>.

CARVER, Peggy L. (ORG.). **Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic**. [s.l.] : De Gruyter, 2019. ISBN: 9783110527872. DOI: 10.1515/9783110527872. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/9783110527872/html>.

CASTANHEIRA, Mariana; RHOMBERG, Paul R.; FLAMM, Robert K.; JONES, Ronald N. Effect of the β -Lactamase Inhibitor Vaborbactam Combined with Meropenem against Serine Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 60, n. 9, p. 5454–5458, 2016. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.00711-16. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00711-16>.

CASTRO AGUDELO, Brian; CÁRDENAS, Juan C.; MACÍAS, Mario A.; OCHOA-PUENTES, Cristian; SIERRA, Cesar A. Crystal structure of ethyl (E)-2-cyano-3-(thiophen-2-yl)acrylate: two conformers forming a discrete disorder. **Acta Crystallographica Section E Crystallographic Communications**, [S. l.], v. 73, n. 9, p. 1287–1289, 2017. ISSN: 2056-9890. DOI: 10.1107/S2056989017010799. Disponível em: <https://journals.iucr.org/paper?S2056989017010799>.

CEREXA, Inc. **Comparative study of coadministered ceftaroline foxamil and NXL 104 vs. intravenous doripenem in adult subjects with complicated urinary tract infections**. 2023. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01281462>. Acesso em: 17 ago. 2023.

CHAVES, José; LADONA, Margarita G.; SEGURA, Concepción; COIRA, Amparo; REIG, Roser; AMPURDANÉS, Coral. SHV-1 β -Lactamase Is Mainly a Chromosomally Encoded Species-Specific Enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 45, n. 10, p. 2856–2861, 2001. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.45.10.2856-2861.2001. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.45.10.2856-2861.2001>.

CHEN, Allie Y. et al. Dipicolinic Acid Derivatives as Inhibitors of New Delhi Metallo- β -lactamase-1. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 60, n. 17, p. 7267–7283, 2017. ISSN: 0022-2623. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00407. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.7b00407>.

CHUNG, Joon-hui; BHAT, Abhayprasad; KIM, Chang-Jin; YONG, Dongeun; RYU, Choong-Min. Combination therapy with polymyxin B and netropsin against clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 28168, 2016. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/srep28168. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep28168>.

CLAYTON, Julie. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, [S. l.], v. 465, n. S7301, p. S12–S15, 2010. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/nature09224. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature09224>.

COLEMAN, Ken. Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non- β -lactam β -lactamase inhibitors. **Current Opinion in Microbiology**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 550–555, 2011. ISSN: 13695274. DOI: 10.1016/j.mib.2011.07.026. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S136952741100110X>.

CONCHA, Néstor O. et al. Crystal Structure of the IMP-1 Metallo β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and Its Complex with a Mercaptocarboxylate Inhibitor: Binding Determinants of a Potent, Broad-Spectrum Inhibitor. **Biochemistry**, [S. l.], v. 39, n. 15, p. 4288–4298, 2000. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi992569m. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi992569m>.

CONCHA, Nestor O.; RASMUSSEN, Beth A.; BUSH, Karen; HERZBERG, Osnat. Crystal structure of the wide-spectrum binuclear zinc β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. **Structure**, [S. l.], v. 4, n. 7, p. 823–836, 1996. ISSN: 09692126. DOI: 10.1016/S0969-2126(96)00089-5. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212696000895>.

COULIBALY, Sogu et al. Modulation of invasive properties of murine squamous carcinoma cells by heterologous expression of cathepsin B and cystatin C. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 83, n. 4, p. 526–531, 1999. ISSN: 0020-7136. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19991112)83:4<526::AID-IJC15>3.0.CO;2-M. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19991112\)83:4%3C526::AID-IJC15%3E3.0.CO;2-M](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0215(19991112)83:4%3C526::AID-IJC15%3E3.0.CO;2-M).

COULOMBE, R.; GROCHULSKI, P.; SIVARAMAN, J.; MÉNARD, R.; MORT, J. S.; CYGLER, M. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. **The EMBO Journal**, [S. l.], v. 15, n. 20, p. 5492–5503, 1996. ISSN: 02614189. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00934.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00934.x>.

COX, Francis E. .. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). **Infectious Disease Clinics of North America**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 231–245, 2004. ISSN: 08915520. DOI: 10.1016/j.idc.2004.01.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552004000194>.

CROWDER, Michael W.; SPENCER, James; VILA, Alejandro J. Metallo- β -lactamases: Novel Weaponry for Antibiotic Resistance in Bacteria. **Accounts of Chemical Research**, [S. l.], v. 39, n. 10, p. 721–728, 2006. ISSN: 0001-4842. DOI: 10.1021/ar0400241. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ar0400241>.

DA SILVA, Kesia Esther; THI NGUYEN, To Nguyen; BOINETT, Christine J.;

BAKER, Stephen; SIMIONATTO, Simone. Molecular and epidemiological surveillance of polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from Brazil with multiple mgrB gene mutations. **International Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], v. 310, n. 7, p. 151448, 2020. ISSN: 14384221. DOI: 10.1016/j.ijmm.2020.151448. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422120300588>.

DAIGLE, Denis et al. 1370. Cefepime/VNRX-5133 Broad-Spectrum Activity Is Maintained Against Emerging KPC- and PDC-Variants in Multidrug-Resistant *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. **Open Forum Infectious Diseases**, [S. l.], v. 5, n. suppl_1, p. S419–S420, 2018. ISSN: 2328-8957. DOI: 10.1093/ofid/ofy210.1201. Disponível em: https://academic.oup.com/ofid/article/5/suppl_1/S419/5206664.

DARBY, Elizabeth M.; TRAMPARI, Eleftheria; SIASAT, Pauline; GAYA, Maria Solsona; ALAV, Ilyas; WEBBER, Mark A.; BLAIR, Jessica M. A. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 280–295, 2023. ISSN: 1740-1526. DOI: 10.1038/s41579-022-00820-y. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-022-00820-y>.

DATTA, NAOMI; KONTOMICHALOU, POLYXENI. Penicillinase Synthesis Controlled By Infectious R Factors In Enterobacteriaceae. **Nature**, [S. l.], v. 208, n. 5007, p. 239–241, 1965. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/208239a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/208239a0>.

DE KRAKER, Marlieke E. A.; STEWARDSON, Andrew J.; HARBARTH, Stephan. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? **PLOS Medicine**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. e1002184, 2016. ISSN: 1549-1676. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002184. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1002184>.

DE ROOIJ, Ben M.; COMMANDEUR, Jan N. M.; HOMMES, John W.; AALBERS, Tom; GROOT, Ed J.; VERMEULEN, Nico P. E. Urinary Metabolite Profile of Phenyl and o -Cresyl Glycidyl Ether in Rats: Identification of a Novel Pathway Leading to N -Acetylserine O-Conjugates. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 111–118, 1998. ISSN: 0893-228X. DOI: 10.1021/tx970020n. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/tx970020n>.

DECUYPER, Lena; JUKIČ, Marko; SOSIČ, Izidor; ŽULA, Aleš; D'HOOGHE, Matthias; GOBEC, Stanislav. Antibacterial and β -Lactamase Inhibitory Activity of Monocyclic β -Lactams. **Medicinal Research Reviews**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 426–503, 2018. ISSN: 01986325. DOI: 10.1002/med.21443. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.21443>.

DEJA, Erin N. Novel β -Lactamase Inhibitors: New Weapons in the Arms Race against Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Newsletter**, [S. l.], v. 43, n. 14, p. 119–125, 2021. ISSN: 01964399. ISBN: 9780203967317. DOI: 10.1016/j.clinmicnews.2021.06.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196439921000404>.

DELAISSÉ, Jean-Marie et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. **Clinica Chimica Acta**, [S. l.], v. 291, n. 2, p. 223–234, 2000. ISSN: 00098981. DOI: 10.1016/S0009-8981(99)00230-2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898199002302>.

DENMARK, Scott E.; IBRAHIM, Malek Y. S.; AMBROSI, Andrea. Room Temperature, Reductive Alkylation of Activated Methylene Compounds: Carbon–Carbon Bond Formation Driven by the Rhodium-Catalyzed Water–Gas Shift Reaction. **ACS Catalysis**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 613–630, 2017. ISSN: 2155-5435. DOI: 10.1021/acscatal.6b03183. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscatal.6b03183>.

DEWAR, Michael J. S.; ZOEBISCH, Eve G.; HEALY, Eamonn F.; STEWART, James J. P. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 107, n. 13, p. 3902–3909, 1985. ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/ja00299a024. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00299a024>.

DOCQUIER, Jean-Denis; PANTANELLA, Fabrizio; GIULIANI, Francesco; THALLER, Maria Cristina; AMICOSANTE, Gianfranco; GALLEN, Moreno; FRÈRE, Jean-Marie; BUSH, Karen; ROSSOLINI, Gian Maria. CAU-1, a Subclass B3 Metallo- β -Lactamase of Low Substrate Affinity Encoded by an Ortholog Present in the *Caulobacter crescentus* Chromosome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 46, n. 6, p. 1823–1830, 2002. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.46.6.1823-1830.2002. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.46.6.1823-1830.2002>.

DOCQUIER, Jean Denis; MANGANI, Stefano. An update on β -lactamase inhibitor discovery and development. **Drug Resistance Updates**, [S. l.], v. 36, n. November 2017, p. 13–29, 2018. ISSN: 15322084. DOI: 10.1016/j.drug.2017.11.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drug.2017.11.002>.

DOMÉNECH-SÁNCHEZ, Antonio; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, Luis; HERNÁNDEZ-ALLÉS, Santiago; DEL CARMEN CONEJO, María; PASCUAL, Álvaro; TOMÁS, Juan M.; ALBERTÍ, Sebastián; BENEDÍ, Vicente Javier. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 Porin in Antimicrobial Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 47, n. 10, p. 3332–3335, 2003. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.47.10.3332-3335.2003. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.47.10.3332-3335.2003>.

DOUAFER, Hana; ANDRIEU, Véronique; PHANSTIEL, Otto; BRUNEL, Jean Michel. Antibiotic Adjuvants: Make Antibiotics Great Again! **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 62, n. 19, p. 8665–8681, 2019. ISSN: 0022-2623. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01781. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.8b01781>.

DRAWZ, Sarah M.; BONOMO, Robert A. Three decades of β -lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 160–201, 2010. ISSN: 08938512. DOI: 10.1128/CMR.00037-09.

DRAWZ, Sarah M.; PAPP-WALLACE, Krisztina M.; BONOMO, Robert A. New β -Lactamase Inhibitors: a Therapeutic Renaissance in an MDR World. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 58, n. 4, p. 1835–1846, 2014. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.00826-13. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00826-13>.

DYMICKY, M.; BYLER, D. M. SYNTHESIS OF ETHYL N-

CARBOBENZOXITYTYROSYL-S-BENZYL-CYSTEINYLGLYCINATE. **Organic Preparations and Procedures International**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 93–101, 1991. ISSN: 0030-4948. DOI: 10.1080/00304949109458288. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00304949109458288>.

EHMANN, David E. et al. Kinetics of Avibactam Inhibition against Class A, C, and D β -Lactamases. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 288, n. 39, p. 27960–27971, 2013. ISSN: 00219258. DOI: 10.1074/jbc.M113.485979. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820489203>.

EHMANN, David E.; JAHIC, Haris; ROSS, Philip L.; GU, Rong-Fang; HU, Jun; KERN, Gunther; WALKUP, Grant K.; FISHER, Stewart L. Avibactam is a covalent, reversible, non- β -lactam β -lactamase inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 109, n. 29, p. 11663–11668, 2012. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1205073109. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1205073109>.

EKICI, Özlem Doğan; PAETZEL, Mark; DALBEY, Ross E. Unconventional serine proteases: Variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. **Protein Science**, [S. l.], v. 17, n. 12, p. 2023–2037, 2008. ISSN: 0961-8368. DOI: 10.1110/ps.035436.108. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1110/ps.035436.108>.

ETTARI, Roberta; TAMBORINI, Lucia; ANGELO, Ilenia C.; MICALE, Nicola; PINTO, Andrea; DE MICHELI, Carlo; CONTI, Paola. Inhibition of Rhodesain as a Novel Therapeutic Modality for Human African Trypanosomiasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 56, n. 14, p. 5637–5658, 2013. ISSN: 0022-2623. DOI: 10.1021/jm301424d. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm301424d>.

EVERETT, Martin et al. Discovery of a Novel Metallo- β -Lactamase Inhibitor That Potentiates Meropenem Activity against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 62, n. 5, 2018. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.00074-18. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00074-18>.

F. MOJICA, Maria; A. BONOMO, Robert; FAST, Walter. B1-Metallo- β -Lactamases: Where Do We Stand? **Current Drug Targets**, [S. l.], v. 17, n. 9, p. 1029–1050, 2016. ISSN: 13894501. DOI: 10.2174/1389450116666151001105622. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-4501&volume=17&issue=9&spage=1029>.

FABIANE, Stella Maris; SOHI, Maninder K.; WAN, Tommy; PAYNE, David J.; BATESON, John H.; MITCHELL, Tim; SUTTON, Brian J. Crystal Structure of the Zinc-Dependent β -Lactamase from *Bacillus cereus* at 1.9 Å Resolution: Binuclear Active Site with Features of a Mononuclear Enzyme. **Biochemistry**, [S. l.], v. 37, n. 36, p. 12404–12411, 1998. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi980506i. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi980506i>.

FALAGAS, Matthew E.; GRAMMATIKOS, Alexandros P.; MICHALOPOULOS, Argyris. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, [S. l.], v. 6, n. 5, p. 593–600, 2008. ISSN: 1478-7210. DOI: 10.1586/14787210.6.5.593. Disponível em:

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14787210.6.5.593>.

FARMER, T. H.; PAGE, J. W. J.; PAYNE, D. J.; KNOWLES, D. J. C. Kinetic and physical studies of β -lactamase inhibition by a novel penem, BRL 42715.

Biochemical Journal, [S. l.], v. 303, n. 3, p. 825–830, 1994. ISSN: 0264-6021.

DOI: 10.1042/bj3030825. Disponível em:

<https://portlandpress.com/biochemj/article/303/3/825/31076/Kinetic-and-physical-studies-of-lactamase>.

FLAMM, Robert K.; FARRELL, David J.; SADER, Helio S.; JONES, Ronald N.

Antimicrobial activity of ceftaroline combined with avibactam tested against bacterial organisms isolated from acute bacterial skin and skin structure infections in United States medical centers (2010–2012). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 78, n. 4, p. 449–456, 2014. ISSN: 07328893. DOI:

10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.003. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889314000145>.

FRIEDRICH, B.; JUNG, K.; LEIN, M.; TÜRK, I.; RUDOLPH, B.; HAMPEL, G.;

SCHNORR, D.; LOENING, S. .. Cathepsins B, H, L and cysteine protease inhibitors in malignant prostate cell lines, primary cultured prostatic cells and prostatic tissue. **European Journal of Cancer**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 138–144,

1999. ISSN: 09598049. DOI: 10.1016/S0959-8049(98)00273-1. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804998002731>.

FU, H.; FANG, H.; SUN, Jie; WANG, H.; LIU, A.; SUN, J.; WU, Z. Boronic Acid-

based Enzyme Inhibitors: A Review of Recent Progress. **Current Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 21, n. 28, p. 3271–3280, 2014. ISSN: 09298673. DOI:

10.2174/0929867321666140601200803. Disponível em:

<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=21&issue=28&page=3271>.

FUCHS, Natalie; META, Mergim; LANTZBERG, Bellinda; BROS, Matthias; LING

KUAN, Seah; WEIL, Tanja; SCHIRMEISTER, Tanja. Subnanomolar Cathepsin S Inhibitors with High Selectivity: Optimizing Covalent Reversible α -

Fluorovinylsulfones and α -Sulfonates as Potential Immunomodulators in Cancer.

ChemMedChem, [S. l.], v. 18, n. 15, 2023. ISSN: 1860-7179. DOI:

10.1002/cmdc.202300160. Disponível em: [https://chemistry-](https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.202300160)

[europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.202300160](https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.202300160).

Fullerens, Graphenes and Nanotubes. [s.l.] : Elsevier, 2018. ISBN:

9780128136911. DOI: 10.1016/C2016-0-04206-7. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20160042067>.

FUSETANI, Nobuhiro; FUJITA, Masaki; NAKAO, Yoichi; MATSUNAGA, Shigeki;

VAN SOEST, Rob W. M. Tokaramide A, a new cathepsin B inhibitor from the

marine sponge Theonella aff. mirabilis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**

Letters, [S. l.], v. 9, n. 24, p. 3397–3402, 1999. ISSN: 0960894X. DOI:

10.1016/S0960-894X(99)00618-6. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X99006186>.

GALDADAS, Ioannis et al. Defining the architecture of KPC-2 Carbapenemase:

identifying allosteric networks to fight antibiotics resistance. **Scientific Reports**,

[S. l.], v. 8, n. 1, p. 12916, 2018. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-018-

31176-0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-31176-0>.

GARAU, Gianpiero; BEBRONE, Carine; ANNE, Christine; GALLENI, Moreno; FRÈRE, Jean-Marie; DIDEBERG, Otto. A Metallo- β -lactamase Enzyme in Action: Crystal Structures of the Monozinc Carbapenemase CphA and its Complex with Biapenem. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 345, n. 4, p. 785–795, 2005. ISSN: 00222836. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.10.070. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283604013762>.

GARAU, Gianpiero; GARCÍA-SÁEZ, Isabel; BEBRONE, Carine; ANNE, Christine; MERCURI, Paola; GALLENI, Moreno; FRÈRE, Jean-Marie; DIDEBERG, Otto. Update of the Standard Numbering Scheme for Class B β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 48, n. 7, p. 2347–2349, 2004. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.48.7.2347-2349.2004. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.48.7.2347-2349.2004>.

GARCIA-SAEZ, I.; DOCQUIER, J. D.; ROSSOLINI, G. M.; DIDEBERG, O. The Three-Dimensional Structure of VIM-2, a Zn- β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* in Its Reduced and Oxidised Form. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 375, n. 3, p. 604–611, 2008. ISSN: 00222836. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.11.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283607014726>.

GARCÍA-SÁEZ, I.; MERCURI, P. ..; PAPAMICAEL, C.; KAHN, R.; FRÈRE, J. ..; GALLENI, M.; ROSSOLINI, G. ..; DIDEBERG, O. Three-dimensional Structure of FEZ-1, a Monomeric Subclass B3 Metallo- β -lactamase from *Fluoribacter gormanii*, in Native Form and in Complex with d-Captopril. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 325, n. 4, p. 651–660, 2003. ISSN: 00222836. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)01271-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283602012718>.

GARCÍA-SÁEZ, Isabel; HOPKINS, Julie; PAPAMICAEL, Cyril; FRANCESCHINI, Nicola; AMICOSANTE, Gianfranco; ROSSOLINI, Gian Maria; GALLENI, Moreno; FRÈRE, Jean-Marie; DIDEBERG, Otto. The 1.5-Å Structure of *Chryseobacterium meningosepticum* Zinc β -Lactamase in Complex with the Inhibitor, D-Captopril. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 278, n. 26, p. 23868–23873, 2003. ISSN: 00219258. DOI: 10.1074/jbc.M301062200. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820861973>.

GENSMANTEL, Nigel P.; PROCTOR, Philip; PAGE, Michael I. Metal-ion catalysed hydrolysis of some β -lactam antibiotics. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2**, [S. l.], n. 11, p. 1725–1732, 1980. ISSN: 0300-9580. DOI: 10.1039/P29800001725. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=P29800001725>.

GIBSON, R. M.; CHRISTENSEN, H.; WALEY, S. G. Site-directed mutagenesis of β -lactamase I. Single and double mutants of Glu-166 and Lys-73. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 272, n. 3, p. 613–619, 1990. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/bj2720613. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article/272/3/613/26426/Site-directed-mutagenesis-of-lactamase-I-Single>.

GILLS, Joell J. et al. Nelfinavir, A Lead HIV Protease Inhibitor, Is a Broad-Spectrum, Anticancer Agent that Induces Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and Apoptosis In vitro and In vivo. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 13, n. 17, p. 5183–5194, 2007. ISSN: 1078-0432. DOI: 10.1158/1078-

0432.CCR-07-0161. Disponível em:
<https://aacrjournals.org/clincancerres/article/13/17/5183/164083/Nelfinavir-A-Lead-HIV-Protease-Inhibitor-Is-a>.

GOBEC, S.; FRLAN, R. Inhibitors of Cathepsin B. **Current Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 13, n. 19, p. 2309–2327, 2006. ISSN: 09298673. DOI: 10.2174/092986706777935122. Disponível em:
<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=13&issue=19&spage=2309>.

GOCHEVA, Vasilena; JOYCE, Johanna A. Cysteine Cathepsins and the Cutting Edge of Cancer Invasion. **Cell Cycle**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 60–64, 2007. ISSN: 1538-4101. DOI: 10.4161/cc.6.1.3669. Disponível em:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.6.1.3669>.

GOCHEVA, Vasilena; ZENG, Wei; KE, Danxia; KLIMSTRA, David; REINHECKEL, Thomas; PETERS, Christoph; HANAHAN, Douglas; JOYCE, Johanna A. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. **Genes & Development**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 543–556, 2006. ISSN: 0890-9369. DOI: 10.1101/gad.1407406. Disponível em:
<http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.1407406>.

GONZÁLEZ-BELLO, Concepción; RODRÍGUEZ, Diana; PERNAS, Marina; RODRÍGUEZ, Ángela; COLCHÓN, Esther. β -Lactamase Inhibitors to Restore the Efficacy of Antibiotics against Superbugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 63, n. 5, p. 1859–1881, 2020. ISSN: 15204804. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01279.

GRAB, Dennis J. et al. Protease Activated Receptor Signaling Is Required for African Trypanosome Traversal of Human Brain Microvascular Endothelial Cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 3, n. 7, p. e479, 2009. ISSN: 1935-2735. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000479. Disponível em:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000479>.

GRANT, Eugene B.; GUIADEEN, Deodialsingh; BAUM, Ellen Z.; FOLENO, Barbara D.; JIN, Haiyong; MONTENEGRO, Deborah A.; NELSON, Erin A.; BUSH, Karen; HLASTA, Dennis J. The synthesis and SAR of rhodanines as novel class C β -lactamase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 10, n. 19, p. 2179–2182, 2000. ISSN: 0960894X. DOI: 10.1016/S0960-894X(00)00444-3. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X00004443>.

GREENSPAN, Paul D. et al. N-Arylamino nitriles as bioavailable peptidomimetic inhibitors of cathepsin B. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 13, n. 22, p. 4121–4124, 2003. ISSN: 0960894X. DOI: 10.1016/j.bmcl.2003.08.006. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X03008345>.

GUILLAUME, Gilliane; VANHOVE, Marc; LAMOTTE-BRASSEUR, Josette; LEDENT, Philippe; JAMIN, Marc; JORIS, Bernard; FRÈRE, Jean-Marie. Site-directed Mutagenesis of Glutamate 166 in Two β -Lactamases. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 272, n. 9, p. 5438–5444, 1997. ISSN: 00219258. DOI: 10.1074/jbc.272.9.5438. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818412252>.

HALL, L. M.; LIVERMORE, D. M.; GUR, D.; AKOVA, M.; AKALIN, H. E. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 37, n. 8, p. 1637–1644, 1993. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.37.8.1637. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.37.8.1637>.

HECKER, Scott J. et al. Discovery of a Cyclic Boronic Acid β -Lactamase Inhibitor (RPX7009) with Utility vs Class A Serine Carbapenemases. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 58, n. 9, p. 3682–3692, 2015. ISSN: 0022-2623. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00127. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.5b00127>.

HEINZE-KRAUSS, Ingrid et al. Structure-Based Design of β -Lactamase Inhibitors. 1. Synthesis and Evaluation of Bridged Monobactams. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 41, n. 21, p. 3961–3971, 1998. ISSN: 0022-2623. DOI: 10.1021/jm980023c. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm980023c>.

HERMANN, Johannes C.; HENSEN, Christian; RIDDER, Lars; MULHOLLAND, Adrian J.; HÖLTJE, Hans-Dieter. Mechanisms of Antibiotic Resistance: QM/MM Modeling of the Acylation Reaction of a Class A β -Lactamase with Benzylpenicillin. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 127, n. 12, p. 4454–4465, 2005. ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/ja044210d. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja044210d>.

HERNÁNDEZ-GARCÍA, Marta et al. In Vitro Activity of Cefepime-Taniborbactam against Carbapenemase-Producing Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Recovered in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 66, n. 3, 2022. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/aac.02161-21. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.02161-21>.

HERZBERG, Osnat; MOULT, John. Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Crystal Structure of β -Lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.5 Å Resolution. **Science**, [S. l.], v. 236, n. 4802, p. 694–701, 1987. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.3107125. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.3107125>.

HINCHLIFFE, Philip et al. Structural and Kinetic Studies of the Potent Inhibition of Metallo- β -lactamases by 6-Phosphonomethylpyridine-2-carboxylates. **Biochemistry**, [S. l.], v. 57, n. 12, p. 1880–1892, 2018. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/acs.biochem.7b01299. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biochem.7b01299>.

INAMOTO, Kiyofumi; ARAI, Yukari; HIROYA, Kou; DOI, Takayuki. Palladium-catalysed direct synthesis of benzo[b]thiophenes from thioenols. **Chemical Communications**, [S. l.], n. 43, p. 5529, 2008. ISSN: 1359-7345. DOI: 10.1039/b811362a. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b811362a>.

JACOBY, George A. **AmpC B-Lactamases**. **Clinical Microbiology Reviews** 2009. ISSN: 08938512. DOI: 10.1128/CMR.00036-08.

JIANG, Xukai et al. Outer Membranes of Polymyxin-Resistant *Acinetobacter baumannii* with Phosphoethanolamine-Modified Lipid A and Lipopolysaccharide Loss Display Different Atomic-Scale Interactions with Polymyxins. **ACS Infectious**

Diseases, [S. l.], v. 6, n. 10, p. 2698–2708, 2020. ISSN: 2373-8227. DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00330. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.0c00330>.

JONES, G. The Knoevenagel Condensation. In: **Organic Reactions**. [s.l.] : Wiley, 2011. p. 204–599. DOI: 10.1002/0471264180.or015.02. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471264180.or015.02>.

JUNG, Sascha et al. Fluorovinylsulfones and -Sulfonates as Potent Covalent Reversible Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Rhodesain: Structure–Activity Relationship, Inhibition Mechanism, Metabolism, and In Vivo Studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 64, n. 16, p. 12322–12358, 2021. ISSN: 0022-2623. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c01002. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.1c01002>.

KAZMIERCZAK, Krystyna M.; BIEDENBACH, Douglas J.; HACKEL, Meredith; RABINE, Sharon; DE JONGE, Boudewijn L. M.; BOUCHILLON, Samuel K.; SAHM, Daniel F.; BRADFORD, Patricia A. Global Dissemination of bla KPC into Bacterial Species beyond *Klebsiella pneumoniae* and In Vitro Susceptibility to Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam-Avibactam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 60, n. 8, p. 4490–4500, 2016 a. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.00107-16. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00107-16>.

KAZMIERCZAK, Krystyna M.; RABINE, Sharon; HACKEL, Meredith; MCLAUGHLIN, Robert E.; BIEDENBACH, Douglas J.; BOUCHILLON, Samuel K.; SAHM, Daniel F.; BRADFORD, Patricia A. Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 1067–1078, 2016 b. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.02379-15. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02379-15>.

KE, Wei; BETHEL, Christopher R.; THOMSON, Jodi M.; BONOMO, Robert A.; VAN DEN AKKER, Focco. Crystal Structure of KPC-2: Insights into Carbapenemase Activity in Class A β -Lactamases. **Biochemistry**, [S. l.], v. 46, n. 19, p. 5732–5740, 2007. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi700300u. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi700300u>.

KENNEDY, Peter G. E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 113, n. 4, p. 496–504, 2004. ISSN: 0021-9738. DOI: 10.1172/JCI21052. Disponível em: <http://www.jci.org/articles/view/21052>.

KERR, Iain D. et al. Vinyl Sulfones as Antiparasitic Agents and a Structural Basis for Drug Design. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 284, n. 38, p. 25697–25703, 2009. ISSN: 00219258. DOI: 10.1074/jbc.M109.014340. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818810444>.

KERR, Iain D.; WU, Peng; MARION-TSUKAMAKI, Rachael; MACKEY, Zachary B.; BRINEN, Linda S. Crystal Structures of TbCatB and Rhodesain, Potential Chemotherapeutic Targets and Major Cysteine Proteases of *Trypanosoma brucei*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. e701, 2010. ISSN: 1935-2735. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000701. Disponível em:

<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000701>.

KHAN, Asad U.; MARYAM, Lubna; ZARRILLI, Raffaele. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 101, 2017. ISSN: 1471-2180. DOI: 10.1186/s12866-017-1012-8. Disponível em: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-1012-8>.

KIM, Youngchang; CUNNINGHAM, Mark A.; MIRE, Joseph; TESAR, Christine; SACCHETTINI, James; JOACHIMIAK, Andrzej. NDM-1, the ultimate promiscuous enzyme: substrate recognition and catalytic mechanism. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 1917–1927, 2013. ISSN: 0892-6638. DOI: 10.1096/fj.12-224014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.12-224014>.

KIMURA, Soichiro; ISHII, Yoshikazu; YAMAGUCHI, Keizo. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP- or VIM- type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 241–244, 2005. ISSN: 07328893. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2005.05.017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889305001513>.

KING, Dustin T.; WORRALL, Liam J.; GRUNINGER, Robert; STRYNADKA, Natalie C. J. New Delhi Metallo- β -Lactamase: Structural Insights into β -Lactam Recognition and Inhibition. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 134, n. 28, p. 11362–11365, 2012. ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/ja303579d. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja303579d>.

KLINGLER, Franca-M. et al. Approved Drugs Containing Thiols as Inhibitors of Metallo- β -lactamases: Strategy To Combat Multidrug-Resistant Bacteria. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 58, n. 8, p. 3626–3630, 2015. ISSN: 0022-2623. DOI: 10.1021/jm501844d. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm501844d>.

KOBAYASHI, Kenichi; TANAKA, Kosaku; KOGEN, Hiroshi. Recent topics of the natural product synthesis by Horner–Wadsworth–Emmons reaction. **Tetrahedron Letters**, [S. l.], v. 59, n. 7, p. 568–582, 2018. ISSN: 00404039. DOI: 10.1016/j.tetlet.2017.12.076. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403917316076>.

KOLAHDOOZAN, Majid; KALBASI, Roozbeh Javad; SHAHZEIDI, Zohreh S.; ZAMANI, Farzad. Knoevenagel Condensation of Aldehydes with Ethyl Cyanoacetate in Water Catalyzed by P4VP/Al₂O₃-SiO₂. **Journal of Chemistry**, [S. l.], v. 2013, p. 1–8, 2013. ISSN: 2090-9063. DOI: 10.1155/2013/496837. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/jchem/2013/496837/>.

KONG, Qidi; YANG, Yushe. Recent advances in antibacterial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 35, n. 19, p. 127799, 2021. ISSN: 14643405. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.127799. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.127799>.

KRAJNC, Alen et al. Bicyclic Boronate VNRX-5133 Inhibits Metallo- and Serine- β -Lactamases. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 62, n. 18, p. 8544–8556, 2019. ISSN: 0022-2623. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00911. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.9b00911>.

KRISHNAN, Nikhil P.; NGUYEN, Nhu Q.; PAPP-WALLACE, Krisztina M.; BONOMO, Robert A.; VAN DEN AKKER, Focco. Inhibition of Klebsiella β -Lactamases (SHV-1 and KPC-2) by Avibactam: A Structural Study. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. e0136813, 2015. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0136813. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0136813>.

KUMARASAMY, Karthikeyan K. et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 597–602, 2010. ISSN: 14733099. DOI: 10.1016/S1473-3099(10)70143-2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309910701432>.

LAHIRI, Sushmita D.; MANGANI, Stefano; DURAND-REVILLE, Thomas; BENVENUTI, Manuela; DE LUCA, Filomena; SANYAL, Gautam; DOCQUIER, Jean-Denis. Structural Insight into Potent Broad-Spectrum Inhibition with Reversible Recyclization Mechanism: Avibactam in Complex with CTX-M-15 and Pseudomonas aeruginosa AmpC β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 57, n. 6, p. 2496–2505, 2013. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.02247-12. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02247-12>.

LAURETTI, Laura; RICCIO, Maria Letizia; MAZZARIOL, Annarita; CORNAGLIA, Giuseppe; AMICOSANTE, Gianfranco; FONTANA, Roberta; ROSSOLINI, Gian Maria. Cloning and Characterization of bla VIM , a New Integron-Borne Metallo- β -Lactamase Gene from a Pseudomonas aeruginosa Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 43, n. 7, p. 1584–1590, 1999. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.43.7.1584. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.43.7.1584>.

LECAILLE, Fabien; KALETA, Jadwiga; BRÖMME, Dieter. Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 102, n. 12, p. 4459–4488, 2002. ISSN: 0009-2665. DOI: 10.1021/cr0101656. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr0101656>.

LEE, Kyungwon; LEE, Wee Gyo; UH, Young; HA, Gyoung Yim; CHO, Jihyun; CHONG, Yunsop. VIM- and IMP-Type Metallo- β -lactamase–Producing Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. in Korean Hospitals. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 868–871, 2003. ISSN: 1080-6040. DOI: 10.3201/eid0907.030012. Disponível em: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/9/7/03-0012_article.htm.

LEIRIS, Simon et al. SAR Studies Leading to the Identification of a Novel Series of Metallo- β -lactamase Inhibitors for the Treatment of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections That Display Efficacy in an Animal Infection Model. **ACS Infectious Diseases**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 131–140, 2019. ISSN: 2373-8227. DOI: 10.1021/acsinfecdis.8b00246. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.8b00246>.

LEUNG, Donmienne; ABBENANTE, Giovanni; FAIRLIE, David P. Protease Inhibitors: Current Status and Future Prospects. **Journal of Medicinal Chemistry**,

[S. I.], v. 43, n. 3, p. 305–341, 2000. ISSN: 0022-2623. DOI: 10.1021/jm990412m. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm990412m>.

LI, Guo-Bo et al. NMR-filtered virtual screening leads to non-metal chelating metallo- β -lactamase inhibitors. **Chemical Science**, [S. I.], v. 8, n. 2, p. 928–937, 2017 a. ISSN: 2041-6520. DOI: 10.1039/C6SC04524C. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6SC04524C>.

LI, Guo-Bo et al. Crystallographic analyses of isoquinoline complexes reveal a new mode of metallo- β -lactamase inhibition. **Chemical Communications**, [S. I.], v. 53, n. 43, p. 5806–5809, 2017 b. ISSN: 1359-7345. DOI: 10.1039/C7CC02394D. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7CC02394D>.

LI, Jerry P. H.; ADESINA, Adesoji A.; KENNEDY, Eric M.; STOCKENHUBER, Michael. A mechanistic study of the Knoevenagel condensation reaction: new insights into the influence of acid and base properties of mixed metal oxide catalysts on the catalytic activity. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, [S. I.], v. 19, n. 39, p. 26630–26644, 2017 c. ISSN: 1463-9076. DOI: 10.1039/C7CP04743F. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7CP04743F>.

LI, Rong; CHEN, Xi; ZHOU, Cong; DAI, Qing-Qing; YANG, Lingling. Recent advances in β -lactamase inhibitor chemotypes and inhibition modes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. I.], v. 242, p. 114677, 2022. ISSN: 02235234. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114677. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523422005797>.

LIAO, Rong-Zhen; YU, Jian-Guo; HIMO, Fahmi. Reaction Mechanism of the Trinuclear Zinc Enzyme Phospholipase C: A Density Functional Theory Study. **The Journal of Physical Chemistry B**, [S. I.], v. 114, n. 7, p. 2533–2540, 2010. ISSN: 1520-6106. DOI: 10.1021/jp910992f. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp910992f>.

LIM, Cherry; TAKAHASHI, Emi; HONGSUWAN, Maliwan; WUTHIEKANUN, Vanaporn; THAMLIKITKUL, Visanu; HINJOY, Soawapak; DAY, Nicholas PJ; PEACOCK, Sharon J.; LIMMATHUROTSAKUL, Direk. Epidemiology and burden of multidrug-resistant bacterial infection in a developing country. **eLife**, [S. I.], v. 5, 2016. ISSN: 2050-084X. DOI: 10.7554/eLife.18082. Disponível em: <https://elifesciences.org/articles/18082>.

LIM, H. M.; PÈNE, J. J.; SHAW, R. W. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 beta-lactamase II structural gene. **Journal of Bacteriology**, [S. I.], v. 170, n. 6, p. 2873–2878, 1988. ISSN: 0021-9193. DOI: 10.1128/jb.170.6.2873-2878.1988. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.170.6.2873-2878.1988>.

LISA, María-Natalia et al. A general reaction mechanism for carbapenem hydrolysis by mononuclear and binuclear metallo- β -lactamases. **Nature Communications**, [S. I.], v. 8, n. 1, p. 538, 2017. ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/s41467-017-00601-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-017-00601-9>.

LITTLE, R. Daniel; MASJEDIZADEH, Mohammad R.; WALLQUIST, Olof; MCLOUGHLIN, Jim I. The Intramolecular Michael Reaction. In: **Organic Reactions**. [s.l.] : Wiley, 1995. p. 315–552. DOI: 10.1002/0471264180.or047.02.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471264180.or047.02>.

LIU, Fuxian et al. Cathepsin B: The dawn of tumor therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 269, p. 116329, 2024. ISSN: 02235234. DOI: 10.1016/j.ejmech.2024.116329. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523424002095>.

LIU, Xinyuan; SHI, Fuxing; JIN, Chaochao; LIU, Binbin; LEI, Ming; TAN, Jiajing. Stereospecific synthesis of monofluoroalkenes and their deuterated analogues via Ag-catalyzed decarboxylation. **Journal of Catalysis**, [S. l.], v. 413, p. 1089–1097, 2022. ISSN: 00219517. DOI: 10.1016/j.jcat.2022.08.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021951722003426>.

LIVERMORE, D. Potentiation of beta-lactams against *Pseudomonas aeruginosa* strains by Ro 48-1256, a bridged monobactam inhibitor of AmpC beta-lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 335–343, 1997. ISSN: 14602091. DOI: 10.1093/jac/40.3.335. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/40.3.335>.

LIVERMORE, D. M. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 41, n. suppl 4, p. 25–41, 1998. ISSN: 0305-7453. DOI: 10.1093/jac/41.suppl_4.25. Disponível em: https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/41.suppl_4.25.

LIVERMORE, David M.; WARNER, Marina; MUSHTAQ, Shazad; DOUMITH, Michel; ZHANG, Jiancheng; WOODFORD, Neil. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 415–419, 2011. ISSN: 09248579. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.01.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092485791100063X>.

LIVERMORE, David M.; WARNER, Marina; MUSHTAQ, Shazad; WOODFORD, Neil. Interactions of OP0595, a Novel Triple-Action Diazabicyclooctane, with β -Lactams against OP0595-Resistant Enterobacteriaceae Mutants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 554–560, 2016. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.02184-15. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02184-15>.

LONDON, Nir et al. Covalent docking of large libraries for the discovery of chemical probes. **Nature Chemical Biology**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 1066–1072, 2014. ISSN: 1552-4450. DOI: 10.1038/nchembio.1666. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nchembio.1666>.

LONSDALE-ECCLES, John D.; GRAB, Dennis J. Trypanosome hydrolases and the blood–brain barrier. **Trends in Parasitology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 17–19, 2002. ISSN: 14714922. DOI: 10.1016/S1471-4922(01)02120-1. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492201021201>.

MANSOUR, Wejdene; POIREL, Laurent; BETTAIEB, Dalia; BOUALLEGUE, Olfa; BOUJAAFAR, Nouredine; NORDMANN, Patrice. Dissemination of OXA-23–Producing and Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital in Tunisia. **Microbial Drug Resistance**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 289–292, 2008. ISSN: 1076-6294. DOI: 10.1089/mdr.2008.0838. Disponível em:

<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2008.0838>.

MANYI-LOH, Christy; MAMPHWELI, Sampson; MEYER, Edson; OKOH, Anthony. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 795, 2018. ISSN: 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules23040795. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/4/795>.

MARANA, S. ...; LOPES, A. ...; JULIANO, L.; JULIANO, M. ...; FERREIRA, C.; TERRA, Walter R. Subsites of Trypsin Active Site Favor Catalysis or Substrate Binding. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 290, n. 1, p. 494–497, 2002. ISSN: 0006291X. DOI: 10.1006/bbrc.2001.6172. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X01961728>.

MASSIDDA, O.; ROSSOLINI, G. M.; SATTA, G. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 173, n. 15, p. 4611–4617, 1991. ISSN: 0021-9193. DOI: 10.1128/jb.173.15.4611-4617.1991. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.173.15.4611-4617.1991>.

MATAGNE, A. et al. Kinetic study of interaction between BRL 42715, beta-lactamases, and D-alanyl-D-alanine peptidases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 227–231, 1995. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.39.1.227. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.39.1.227>.

MAUS, Hannah; GELLERT, Andrea; ENGLERT, Olivia R.; CHEN, Jia-Xuan; SCHIRMEISTER, Tanja; BARTHELS, Fabian. Designing photoaffinity tool compounds for the investigation of the DENV NS2B–NS3 protease allosteric binding pocket. **RSC Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 14, n. 11, p. 2365–2379, 2023. ISSN: 2632-8682. DOI: 10.1039/D3MD00331K. Disponível em: <https://xlink.rsc.org/?DOI=D3MD00331K>.

MCGOVERN, Paul C.; WAGENLEHNER, Florian; GASINK, Leanne; MOECK, Greg; MCLEROTH, Patrick L.; BETH, Mary; DANE, Aaron; HENKEL, Tim. 731. CERTAIN-1: A Phase 3 Study of Cefepime-Taniborbactam Efficacy and Safety in the Treatment of Complicated Urinary Tract Infections (cUTI), including Acute Pyelonephritis (AP). **Open Forum Infectious Diseases**, [S. l.], v. 9, n. Supplement_2, 2022. ISSN: 2328-8957. DOI: 10.1093/ofid/ofac492.022. Disponível em: <https://academic.oup.com/ofid/article/doi/10.1093/ofid/ofac492.022/6902169>.

MEINI, María-Rocío; LLARRULL, Leticia I.; VILA, Alejandro J. Overcoming differences: The catalytic mechanism of metallo- β -lactamases. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 589, n. 22, p. 3419–3432, 2015. ISSN: 00145793. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.08.015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2015.08.015>.

MENDIETA, Laura; PICÓ, Anna; TARRAGÓ, Teresa; TEIXIDÓ, Meritxell; CASTILLO, Marcos; RAFECAS, Llorenç; MOYANO, Albert; GIRALT, Ernest. Novel Peptidyl Aryl Vinyl Sulfones as Highly Potent and Selective Inhibitors of Cathepsins L and B. **ChemMedChem**, [S. l.], v. 5, n. 9, p. 1556–1567, 2010. ISSN: 1860-7179. DOI: 10.1002/cmdc.201000109. Disponível em: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.201000109>.

MENG, Zhi; TANG, Mei-Lin; YU, Liting; LIANG, Yongxi; HAN, Jilai; ZHANG, ChenChen; HU, Fupin; YU, Jian-Ming; SUN, Xun. Novel Mercapto Propionamide Derivatives with Potent New Delhi Metallo- β -Lactamase-1 Inhibitory Activity and Low Toxicity. **ACS Infectious Diseases**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. 903–916, 2019. ISSN: 2373-8227. DOI: 10.1021/acsinfecdis.8b00366. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfecdis.8b00366>.

MERCK. **Efficacy and Safety of Imipenem+Cilastatin/Relebactam (MK-7655A) Versus Colistimethate Sodium+Imipenem+Cilastatin in Imipenem-Resistant Bacterial Infection (MK-7655A-013) (RESTORE-IMI 1)**. 2023. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02452047>. Acesso em: 17 ago. 2023.

MICHAUX, Catherine; CHARLIER, Paulette; FRÈRE, Jean-Marie; WOUTERS, Johan. Crystal Structure of BRL 42715, C6-(N 1-Methyl-1,2,3-triazolylmethylene)penem, in Complex with Enterobacter cloacae 908R β -Lactamase: Evidence for a Stereoselective Mechanism from Docking Studies. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 127, n. 10, p. 3262–3263, 2005. ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/ja0426241. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja0426241>.

MINASOV, George; WANG, Xiaojun; SHOICHET, Brian K. An Ultrahigh Resolution Structure of TEM-1 β -Lactamase Suggests a Role for Glu166 as the General Base in Acylation. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 124, n. 19, p. 5333–5340, 2002. ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/ja0259640. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja0259640>.

MISHRA, Nagendra N.; BAYER, Arnold S.; TRAN, Truc T.; SHAMOO, Yousif; MILEYKOVSKAYA, Eugenia; DOWHAN, William; GUAN, Ziqiang; ARIAS, Cesar A. Daptomycin Resistance in Enterococci Is Associated with Distinct Alterations of Cell Membrane Phospholipid Content. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. e43958, 2012. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0043958. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0043958>.

MOJICA, Maria F.; ROSSI, Maria-Agustina; VILA, Alejandro J.; BONOMO, Robert A. The urgent need for metallo- β -lactamase inhibitors: an unattended global threat. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. e28–e34, 2022. ISSN: 14733099. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30868-9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309920308689>.

MONTCOURRIER, P.; MANGEAT, P. H.; VALEMBOIS, C.; SALAZAR, G.; SAHUQUET, A.; DUPERRAY, C.; ROCHEFORT, H. Characterization of very acidic phagosomes in breast cancer cells and their association with invasion. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 107, n. 9, p. 2381–2391, 1994. ISSN: 0021-9533. DOI: 10.1242/jcs.107.9.2381. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jcs/article/107/9/2381/24238/Characterization-of-very-acidic-phagosomes-in>.

MONTEIRO, Kadja Luana Chagas; DE AQUINO, Thiago Mendonça; MENDONÇA JUNIOR, Francisco Jaime B. An Update on Staphylococcus aureus NorA Efflux Pump Inhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 20, n. 24, p. 2168–2185, 2020. ISSN: 15680266. DOI: 10.2174/1568026620666200704135837. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/183461/article>.

MOUREY, Lionel; KOTRA, Lakshmi P.; BELLETTINI, John; BULYCHEV, Alexey; O'BRIEN, Michael; MILLER, Marvin J.; MOBASHERY, Shahriar; SAMAMA, Jean-Pierre. Inhibition of the Broad Spectrum Nonmetallocarbapenamase of Class A (NMC-A) β -Lactamase from *Enterobacter cloacae* by Monocyclic β -Lactams.

Journal of Biological Chemistry, [S. l.], v. 274, n. 36, p. 25260–25265, 1999.

ISSN: 00219258. DOI: 10.1074/jbc.274.36.25260. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819552723>.

MÜLLER, Patrick et al. Investigation of the Compatibility between Warheads and Peptidomimetic Sequences of Protease Inhibitors—A Comprehensive Reactivity and Selectivity Study. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 24, n. 8, p. 7226, 2023. ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms24087226. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/8/7226>.

MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of Antibiotic Resistance.

Microbiology Spectrum, [S. l.], v. 4, n. 2, 2016. ISSN: 2165-0497. DOI:

10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. Disponível em:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.

MURRAY, Christopher J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, [S. l.], v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022. ISSN: 01406736. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673621027240>.

NAAS, Thierry; OUESLATI, Saoussen; BONNIN, Rémy A.; DABOS, Maria Laura; ZAVALA, Agustin; DORTET, Laurent; RETAILLEAU, Pascal; IORGA, Bogdan I. Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 917–919, 2017. ISSN:

1475-6366. DOI: 10.1080/14756366.2017.1344235. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14756366.2017.1344235>.

NAUTON, L.; KAHN, R.; GARAU, G.; HERNANDEZ, J. F.; DIDEBERG, O. Structural Insights into the Design of Inhibitors for the L1 Metallo- β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 375, n. 1, p. 257–269, 2008. ISSN: 00222836. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.10.036. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283607013745>.

NETZEL, Tisha C.; JINDANI, Irfan; HANSON, Nancy; TURNER, Bradley M.; SMITH, L.; RAND, Kenneth H. The AmpC inhibitor, Syn2190, can be used to reveal extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 58, n. 3, p. 345–348, 2007.

ISSN: 07328893. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.01.017. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889307000478>.

NEWLING, W. B. S.; HINSHELWOOD, C. N. 293. The kinetics of the acid and the alkaline hydrolysis of esters. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, [S. l.], p. 1357, 1936. ISSN: 0368-1769. DOI: 10.1039/jr9360001357. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=jr9360001357>.

NISHIDA, K. et al. In vitro and in vivo activities of Syn2190, a novel beta-lactamase inhibitor. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [S. l.], v. 43, n. 8, p. 1895–900, 1999. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.43.8.1895. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428909>.

NORDMANN, Patrice; NAAS, Thierry; POIREL, Laurent. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 17, n. 10, p. 1791–1798, 2011. ISSN: 1080-6040. DOI: 10.3201/eid1710.110655. Disponível em: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/10/11-0655_article.htm.

NUKAGA, Michiyoshi; ABE, Takao; VENKATESAN, Aranapakam M.; MANSOUR, Tarek S.; BONOMO, Robert A.; KNOX, James R. Inhibition of Class A and Class C β -Lactamases by Penems: Crystallographic Structures of a Novel 1,4-Thiazepine Intermediate. **Biochemistry**, [S. l.], v. 42, n. 45, p. 13152–13159, 2003. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi034986b. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi034986b>.

O'NEILL, JIM. **TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS. THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE**. Londres.

OFEK, I.; COHEN, S.; RAHMANI, R.; KABHA, K.; TAMARKIN, D.; HERZIG, Y.; RUBINSTEIN, E. Antibacterial synergism of polymyxin B nonapeptide and hydrophobic antibiotics in experimental gram-negative infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 374–377, 1994. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.38.2.374. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.38.2.374>.

OLSSON, Anna; ALLANDER, Lisa; SHAMS, Ayda; AL-FARSI, Hissa; LAGERBÄCK, Pernilla; TÄNGDÉN, Thomas. Activity of polymyxin B combinations against genetically well-characterised *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 and OXA-48-like carbapenemases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S. l.], v. 62, n. 5, p. 106967, 2023. ISSN: 09248579. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2023.106967. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857923002467>.

PAGE, Michael I.; BADARAU, Adriana. The Mechanisms of Catalysis by Metallo - Lactamases. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, [S. l.], v. 2008, p. 1–14, 2008. ISSN: 1565-3633. DOI: 10.1155/2008/576297. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bca/2008/576297/>.

PANTOSTI, Annalisa; SANCHINI, Andrea; MONACO, Monica. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 323–334, 2007. ISSN: 1746-0913. DOI: 10.2217/17460913.2.3.323. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/17460913.2.3.323>.

PAPP-WALLACE, Krisztina M.; ENDIMIANI, Andrea; TARACILA, Magdalena A.; BONOMO, Robert A. Carbapenems: Past, Present, and Future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 55, n. 11, p. 4943–4960, 2011. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.00296-11. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00296-11>.

PARTRIDGE, Sally R.; KWONG, Stephen M.; FIRTH, Neville; JENSEN, Slade O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 31, n. 4, 2018. ISSN: 0893-8512. DOI: 10.1128/CMR.00088-17. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00088-17>.

PÉPIN, J.; MILORD, F. The Treatment of Human African Trypanosomiasis. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 1–47. DOI: 10.1016/S0065-308X(08)60410-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X08604108>.

POIREL, Laurent; NAAS, Thierry; NORDMANN, Patrice. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 24–38, 2010. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.01512-08. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01512-08>.

POWERS, James C.; ASGIAN, Juliana L.; EKICI, Oezlem Dogan; JAMES, Karen Ellis. Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. **ChemInform**, [S. l.], v. 34, n. 7, 2003. ISSN: 0931-7597. DOI: 10.1002/chin.200307259. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/chin.200307259>.

POWERS, James C.; ASGIAN, Juliana L.; EKICI, Özlem Doğan; JAMES, Karen Ellis. Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 102, n. 12, p. 4639–4750, 2002. ISSN: 0009-2665. DOI: 10.1021/cr010182v. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr010182v>.

PRESTINACI, Francesca; PEZZOTTI, Patrizio; PANTOSTI, Annalisa. **Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. Pathogens and Global Health** Maney Publishing, 2015. ISSN: 20477732. DOI: 10.1179/2047773215Y.0000000030.

QUINN, J. P.; DUDEK, E. J.; DIVINCENZO, C. A.; LUCKS, D. A.; LERNER, S. A. Emergence of Resistance to Imipenem During Therapy for *Pseudomonas aeruginosa* Infections. **Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 154, n. 2, p. 289–294, 1986. ISSN: 0022-1899. DOI: 10.1093/infdis/154.2.289. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/154.2.289>.

RAMIREZ, Maria S.; TOLMASKY, Marcelo E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 151–171, 2010. ISSN: 13687646. DOI: 10.1016/j.drug.2010.08.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764610000385>.

RAPP, Robert P.; URBAN, Carl. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases in Enterobacteriaceae: History, Evolution, and Microbiology Concerns. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 399–407, 2012. ISSN: 02770008. DOI: 10.1002/j.1875-9114.2012.01035.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1875-9114.2012.01035.x>.

RASMUSSEN, B. A.; GLUZMAN, Y.; TALLY, F. P. Cloning and sequencing of the class B beta-lactamase gene (*ccrA*) from *Bacteroides fragilis* TAL3636. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 1590–1592, 1990. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.34.8.1590. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.34.8.1590>.

RASNICK, David. Small synthetic inhibitors of cysteine proteases. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 47–63, 1996. ISSN: 0928-2866. DOI: 10.1007/BF02174045. Disponível em:

<http://link.springer.com/10.1007/BF02174045>.

RICCIO, Maria Letizia; FRANCESCHINI, Nicola; BOSCHI, Letizia; CARAVELLI, Berardo; CORNAGLIA, Giuseppe; FONTANA, Roberta; AMICOSANTE, Gianfranco; ROSSOLINI, Gian Maria. Characterization of the Metallo- β -Lactamase Determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 Reveals the Existence of bla IMP Allelic Variants Carried by Gene Cassettes of Different Phylogeny.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, [S. l.], v. 44, n. 5, p. 1229–1235, 2000. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.44.5.1229-1235.2000. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.44.5.1229-1235.2000>.

ROBERTS, M. G.; BURGESS, S.; TOOMBS-RUANE, L. J.; BENSCHOP, J.; MARSHALL, J. C.; FRENCH, N. P. Combining mutation and horizontal gene transfer in a within-host model of antibiotic resistance. **Mathematical Biosciences**, [S. l.], v. 339, p. 108656, 2021. ISSN: 00255564. DOI: 10.1016/j.mbs.2021.108656. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025556421000882>.

ROCHE, Hoffmann-La. **A Study to Investigate the Intrapulmonary Lung Penetration of Nacubactam in Healthy Participants**. 2023. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03182504>. Acesso em: 17 ago. 2023.

ROMAN, Dávid; SAUER, Maria; BEEMELMANN, Christine. Applications of the Horner–Wadsworth–Emmons Olefination in Modern Natural Product Synthesis. **Synthesis**, [S. l.], v. 53, n. 16, p. 2713–2739, 2021. ISSN: 0039-7881. DOI: 10.1055/a-1493-6331. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-1493-6331>.

ROSSOLINI, Gian Maria; FRANCESCHINI, Nicola; RICCIO, Maria Letizia; MERCURI, Paola Sandra; PERILLI, Mariagrazia; GALLEN, Moreno; FRERE, Jean-Marie; AMICOSANTE, Gianfranco. Characterization and sequence of the *Chryseobacterium* (Flavobacterium) *meningosepticum* carbapenemase: a new molecular class B β -lactamase showing a broad substrate profile. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 332, n. 1, p. 145–152, 1998. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/bj3320145. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article/332/1/145/37537/Characterization-and-sequence-of-the>.

SAAVEDRA, Maria José; PEIXE, Luísa; SOUSA, João Carlos; HENRIQUES, Isabel; ALVES, Artur; CORREIA, António. Sfh-I, a Subclass B2 Metallo- β -Lactamase from a *Serratia fonticola* Environmental Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 47, n. 7, p. 2330–2333, 2003. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.47.7.2330-2333.2003. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.47.7.2330-2333.2003>.

SAN FABIÁN, J.; GUILLEME, J.; DÍEZ, E. Vicinal Fluorine–Proton Coupling Constants. **Journal of Magnetic Resonance**, [S. l.], v. 133, n. 2, p. 255–265, 1998. ISSN: 10907807. DOI: 10.1006/jmre.1998.1465. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090780798914653>.

SANTOS, Maria; MOREIRA, Rui. Michael Acceptors as Cysteine Protease Inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 1040–1050, 2007. ISSN: 13895575. DOI: 10.2174/138955707782110105. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389->

5575&volume=7&issue=10&spage=1040.

SANTUCCI, Matteo et al. Computational and biological profile of boronic acids for the detection of bacterial serine- and metallo- β -lactamases. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 17716, 2017. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-017-17399-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-17399-7>.

SAUDENOVA, Makhabbat; PROMNITZ, Jessica; OHRENSCHALL, Gerrit; HIMMERKUS, Nina; BÖTTNER, Martina; KUNKE, Madlen; BLEICH, Markus; THEILIG, Franziska. Behind every smile there's teeth: Cathepsin B's function in health and disease with a kidney view. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [S. l.], v. 1869, n. 4, p. 119190, 2022. ISSN: 01674889. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2021.119190. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488921002445>.

SCHECHTER, Israel; BERGER, Arie. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 157–162, 1967. ISSN: 0006291X. DOI: 10.1016/S0006-291X(67)80055-X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X6780055X>.

SCHIRMEISTER, Tanja; SCHMITZ, Janina; JUNG, Sascha; SCHMENGER, Torsten; KRAUTH-SIEGEL, R. Luise; GÜTSCHOW, Michael. Evaluation of dipeptide nitriles as inhibitors of rhodesain, a major cysteine protease of *Trypanosoma brucei*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 45–50, 2017. ISSN: 0960894X. DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.11.036. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X16311775>.

SHENOY, Rajesh T.; SIVARAMAN, J. Structural basis for reversible and irreversible inhibition of human cathepsin L by their respective dipeptidyl glyoxal and diazomethylketone inhibitors. **Journal of Structural Biology**, [S. l.], v. 173, n. 1, p. 14–19, 2011. ISSN: 10478477. DOI: 10.1016/j.jsb.2010.09.007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1047847710002765>.

SLOANE, Bonnie F.; MOIN, Kamiar; KREPELA, Evzen; ROZHIN, Jurij. Cathepsin B and its endogenous inhibitors: the role in tumor malignancy. **CANCER AND METASTASIS REVIEW**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 333–352, 1990. ISSN: 0167-7659. DOI: 10.1007/BF00049523. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF00049523>.

SOUGAKOFF, Wladimir; L'HERMITE, Guillaume; PERNOT, Lucile; NAAS, Thierry; GUILLET, Valérie; NORDMANN, Patrice; JARLIER, Vincent; DELETTRE, Jean. Structure of the imipenem-hydrolyzing class A β -lactamase SME-1 from *Serratia marcescens*. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, [S. l.], v. 58, n. 2, p. 267–274, 2002. ISSN: 0907-4449. DOI: 10.1107/S0907444901019606. Disponível em: <https://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444901019606>.

SRINIVASA, G. R.; NARENDRA BABU, S. N.; LAKSHMI, C.; GOWDA, D. Channe. Conventional and Microwave Assisted Hydrogenolysis Using Zinc and Ammonium Formate. **Synthetic Communications**, [S. l.], v. 34, n. 10, p. 1831–1837, 2004. ISSN: 0039-7911. DOI: 10.1081/SCC-120034165. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/SCC-120034165>.

STACHYRA, Thérèse; PÉCHEREAU, Marie-Claude; BRUNEAU, Jean-Michel; CLAUDON, Monique; FRÈRE, Jean-Marie; MIOSSEC, Christine; COLEMAN, Kenneth; BLACK, Michael T. Mechanistic Studies of the Inactivation of TEM-1 and P99 by NX104, a Novel Non- β -Lactam β -Lactamase Inhibitor. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 54, n. 12, p. 5132–5138, 2010. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.00568-10. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00568-10>.

STEVERDING, Dietmar; SEXTON, Darren W.; WANG, Xia; GEHRKE, Sebastian S.; WAGNER, Gerd K.; CAFFREY, Conor R. Trypanosoma brucei: Chemical evidence that cathepsin L is essential for survival and a relevant drug target. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 42, n. 5, p. 481–488, 2012. ISSN: 00207519. DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.03.009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002075191200080X>.

STURARO, Mariana Carvalho et al. Synergistic antimicrobial combination of third-generation cephalosporins and polymyxin B against carbapenem-polymyxin-resistant Klebsiella pneumoniae: an in vitro and in vivo analysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 68, n. 10, 2024. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/aac.00930-24. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00930-24>.

SWARÉN, Peter et al. X-ray Analysis of the NMC-A β -Lactamase at 1.64-Å Resolution, a Class A Carbapenemase with Broad Substrate Specificity. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 41, p. 26714–26721, 1998. ISSN: 00219258. DOI: 10.1074/jbc.273.41.26714. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819598040>.

SYKES, R. B.; BONNER, D. P.; BUSH, K.; GEORGOPAPADAKOU, N. H. Azthreonam (SQ 26,776), a synthetic monobactam specifically active against aerobic gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 85–92, 1982. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.21.1.85. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.21.1.85>.

T SPICER, D MINOND, I ENOGIERU, SA SALDANHA, C ALLAIS, QIN LIU, BA MERCER, WR ROUSH, And P. Hodder. **ML302, a Novel Beta-lactamase (BLA) Inhibitor** *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*. [s.l.: s.n.].

THERAPEUTICS, Entasis. **Evaluation of Safety and Efficacy of Intravenous Sulbactam-ETX2514 in the Treatment of Hospitalized Adults With Complicated Urinary Tract Infections**. 2023. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03445195>. Acesso em: 17 ago. 2023.

TIMOTHY D.W. CLARIDGE. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. 3. ed., Oxford: Elsevier, 2016. ISBN: 9780080999869. DOI: 10.1016/C2015-0-04654-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20150046548>.

TOLEMAN, M. A. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 50, n. 5, p. 673–679, 2002. ISSN: 14602091. DOI: 10.1093/jac/dkf210. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkf210>.

TOOKE, Catherine L.; HINCHLIFFE, Philip; BEER, Michael; ZINOVJEV, Kirill; COLENSO, Charlotte K.; SCHOFIELD, Christopher J.; MULHOLLAND, Adrian J.; SPENCER, James. Tautomer-Specific Deacylation and Ω -Loop Flexibility Explain the Carbapenem-Hydrolyzing Broad-Spectrum Activity of the KPC-2 β -Lactamase. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 145, n. 13, p. 7166–7180, 2023. ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/jacs.2c12123. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.2c12123>.

TOOKE, Catherine L.; HINCHLIFFE, Philip; BRAGGINTON, Eilis C.; COLENSO, Charlotte K.; HIRVONEN, Viivi H. A.; TAKEBAYASHI, Yuiko; SPENCER, James. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 431, n. 18, p. 3472–3500, 2019. ISSN: 10898638. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.04.002.

TOTIR, Monica A.; CHA, Jooyoung; ISHIWATA, Akihiro; WANG, Benlian; SHERI, Anjaneyulu; ANDERSON, Vernon E.; BUYNACK, John; MOBASHERY, Shahriar; CAREY, Paul R. Why Clinically Used Tazobactam and Sulbactam Are Poor Inhibitors of OXA-10 β -Lactamase: Raman Crystallographic Evidence. **Biochemistry**, [S. l.], v. 47, n. 13, p. 4094–4101, 2008. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi702348w. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi702348w>.

TRIMBLE, Michael J.; MLYNÁRČIK, Patrik; KOLÁŘ, Milan; HANCOCK, Robert E. W. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S. l.], v. 6, n. 10, p. a025288, 2016. ISSN: 2157-1422. DOI: 10.1101/cshperspect.a025288. Disponível em: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a025288>.

TSUGE, Hideaki; NISHIMURA, Tomohiro; TADA, Yukio; ASAO, Tetsuji; TURK, Dusan; TURK, Vito; KATUNUMA, Nobuhiko. Inhibition Mechanism of Cathepsin L-Specific Inhibitors Based on the Crystal Structure of Papain–CLIK148 Complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 266, n. 2, p. 411–416, 1999. ISSN: 0006291X. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1830. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X99918302>.

TYERS, Mike; WRIGHT, Gerard D. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 141–155, 2019. ISSN: 1740-1526. DOI: 10.1038/s41579-018-0141-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-018-0141-x>.

VALEUR, Eric; BRADLEY, Mark. Amide bond formation : beyond the myth of coupling reagents. [S. l.], n. June 2008, p. 606–631, 2009. DOI: 10.1039/b701677h.

VAN BOECKEL, Thomas P.; BROWER, Charles; GILBERT, Marius; GRENFELL, Bryan T.; LEVIN, Simon A.; ROBINSON, Timothy P.; TEILLANT, Aude; LAXMINARAYAN, Ramanan. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.1503141112. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1503141112>.

VASCONCELOS, Nathalie Gaebler; QUEIROZ, Júlio Henrique Ferreira de Sá; SILVA, Késia Esther Da; VASCONCELOS, Paulo César de Paula; CRODA, Julio; SIMIONATTO, Simone. Synergistic effects of Cinnamomum cassia L. essential oil in combination with polymyxin B against carbapenemase-producing Klebsiella

pneumoniae and *Serratia marcescens*. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 7, p. e0236505, 2020. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0236505. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0236505>.

VENKATESAN, Aranapakam M. et al. Structure-Activity Relationship of 6-Methylidene Penems Bearing 6,5 Bicyclic Heterocycles as Broad-Spectrum β -Lactamase Inhibitors: Evidence for 1,4-Thiazepine Intermediates with C7 R Stereochemistry by Computational Methods. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 49, n. 15, p. 4623–4637, 2006. ISSN: 0022-2623. DOI: 10.1021/jm060021p. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm060021p>.

VENTOLA, C. Lee. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. **Pharmacy and Therapeutics**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>.

VINCENT, Jean-Louis. Nosocomial infections in adult intensive-care units. **The Lancet**, [S. l.], v. 361, n. 9374, p. 2068–2077, 2003. ISSN: 01406736. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)13644-6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673603136446>.

WACHINO, Jun-ichi; YAMAGUCHI, Yoshihiro; MORI, Shigetaro; JIN, Wanchun; KIMURA, Kouji; KUROSAKI, Hiromasa; ARAKAWA, Yoshichika. Structural Insights into Recognition of Hydrolyzed Carbapenems and Inhibitors by Subclass B3 Metallo- β -Lactamase SMB-1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 60, n. 7, p. 4274–4282, 2016. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.03108-15. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.03108-15>.

WALSH, Gary. Protein Sources. In: **Proteins**. [s.l.] : Wiley, 2015. p. 65–89. DOI: 10.1002/9781119117599.ch3. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119117599.ch3>.

WALSH, T. R.; NEVILLE, W. A.; HARAN, M. H.; TOLSON, D.; PAYNE, D. J.; BATESON, J. H.; MACGOWAN, A. P.; BENNETT, P. M. Nucleotide and Amino Acid Sequences of the Metallo- β -Lactamase, ImiS, from *Aeromonas veronii* bv. sobria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 436–439, 1998. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.42.2.436. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.42.2.436>.

WALSH, Timothy R.; TOLEMAN, Mark A.; POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice. Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 306–325, 2005. ISSN: 0893-8512. DOI: 10.1128/CMR.18.2.306-325.2005. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>.

WALTHER-RASMUSSEN, Jan; HØIBY, Niels. Class A carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 60, n. 3, p. 470–482, 2007. ISSN: 1460-2091. DOI: 10.1093/jac/dkm226. Disponível em: <http://academic.oup.com/jac/article/60/3/470/732830/Class-A-carbapenemases>.

WANG, Rong; HOU, Shuang; DONG, Xiaojing; CHEN, Daijie; SHAO, Lei; QIAN, Liujia; LI, Zhong; XU, Xiaoyong. Synergism of fused bicyclic 2-aminothiazolyl compounds with polymyxin B against *Klebsiella pneumoniae*. **MedChemComm**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 2060–2066, 2017. ISSN: 2040-2503. DOI: 10.1039/C7MD00354D. Disponível em: <https://xlink.rsc.org/?DOI=C7MD00354D>.

WANG, Zhigang; FAST, Walter; VALENTINE, Ann M.; BENKOVIC, Stephen J. Metallo- β -lactamase: structure and mechanism. **Current Opinion in Chemical Biology**, [S. l.], v. 3, n. 5, p. 614–622, 1999. ISSN: 13675931. DOI: 10.1016/S1367-5931(99)00017-4. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593199000174>.

WENZEL, Michaela; BANDOW, Julia E. Proteomic signatures in antibiotic research. **PROTEOMICS**, [S. l.], v. 11, n. 15, p. 3256–3268, 2011. ISSN: 16159853. DOI: 10.1002/pmic.201100046. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.201100046>.

WHO. **WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance**. Switzerland.

WHO. **Health Topics: Antimicrobial resistance**. 2023a. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 7 ago. 2023.

WHO. **Antibiotic resistance: Key facts**. 2023b. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Acesso em: 7 ago. 2023.

WILLIAMS, Allison Hillary et al. Defective lytic transglycosylase disrupts cell morphogenesis by hindering cell wall de-O-acetylation in *Neisseria meningitidis*. **eLife**, [S. l.], v. 9, 2020. ISSN: 2050-084X. DOI: 10.7554/eLife.51247. Disponível em: <https://elifesciences.org/articles/51247>.

WOCKHARDT. **Study of Cefepime-zidebactam (FEP-ZID) in Complicated Urinary Tract Infection (cUTI) or Acute Pyelonephritis (AP)**. 2023. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04979806>. Acesso em: 17 ago. 2023.

WRIGHT, G. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 57, n. 10, p. 1451–1470, 2005. ISSN: 0169409X. DOI: 10.1016/j.addr.2005.04.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X05000980>.

WUTS, Peter G. M. **Greene's protective groups in organic synthesis**. 5. ed., [s.l.] : Wiley, 2014.

XIANG, Yang; CHEN, Cheng; WANG, Wen-Ming; XU, Li-Wei; YANG, Ke-Wu; OELSCHLAEGER, Peter; HE, Yuan. Rhodanine as a Potent Scaffold for the Development of Broad-Spectrum Metallo- β -lactamase Inhibitors. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 359–364, 2018. ISSN: 1948-5875. DOI: 10.1021/acsmedchemlett.7b00548. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmedchemlett.7b00548>.

XU, Dingguo; GUO, Hua; CUI, Qiang. Antibiotic Deactivation by a Zinc β -Lactamase: Mechanistic Insights from QM/MM and DFT Studies. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 129, n. 35, p. 10814–10822, 2007. ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/ja072532m. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja072532m>.

YADAV, Jhillu S.; REDDY, Basi V. Subba; BASAK, Ashok K.; VISALI, Boddapati; NARSAIAH, Akkirla Venkat; NAGAI AH, Kommu. Phosphane-Catalyzed

Knoevenagel Condensation: A Facile Synthesis of α -Cyanoacrylates and α -Cyanoacrylonitriles. **European Journal of Organic Chemistry**, [S. l.], v. 2004, n. 3, p. 546–551, 2004. ISSN: 1434-193X. DOI: 10.1002/ejoc.200300513. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejoc.200300513>.

YAN, Yu-Hang et al. Structure-guided optimization of 1H-imidazole-2-carboxylic acid derivatives affording potent VIM-Type metallo- β -lactamase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 228, p. 113965, 2022. ISSN: 02235234. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113965. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S022352342100814X>.

YANCHAK, Margaret P.; TAYLOR, Rebecca A.; CROWDER, Michael W. Mutational Analysis of Metallo- β -lactamase CcrA from *Bacteroides fragilis*. **Biochemistry**, [S. l.], v. 39, n. 37, p. 11330–11339, 2000. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi0010524. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi0010524>.

YE, Yin; SHEN, Wei-Li; WEI, Xian-Wen. (E)-Ethyl 3-(3-bromophenyl)-2-cyanoacrylate. **Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online**, [S. l.], v. 65, n. 11, p. o2636–o2636, 2009. ISSN: 1600-5368. DOI: 10.1107/S1600536809039518. Disponível em: <https://journals.iucr.org/paper?S1600536809039518>.

YONG, Dongeun; TOLEMAN, Mark A.; GISKE, Christian G.; CHO, Hyun S.; SUNDMAN, Kristina; LEE, Kyungwon; WALSH, Timothy R. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, bla NDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 53, n. 12, p. 5046–5054, 2009. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.00774-09. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00774-09>.

ZERVOSEN, Astrid; LU, Wei-Ping; CHEN, Zhouliang; WHITE, Ronald E.; DEMUTH, Thomas P.; FRÈRE, Jean-Marie. Interactions between Penicillin-Binding Proteins (PBPs) and Two Novel Classes of PBP Inhibitors, Arylalkylidene Rhodanines and Arylalkylidene Iminothiazolidin-4-ones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 961–969, 2004. ISSN: 0066-4804. DOI: 10.1128/AAC.48.3.961-969.2004. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.48.3.961-969.2004>.

ZERVOSEN, Astrid; SAUVAGE, Eric; FRÈRE, Jean-Marie; CHARLIER, Paulette; LUXEN, André. Development of New Drugs for an Old Target — The Penicillin Binding Proteins. **Molecules**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 12478–12505, 2012. ISSN: 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules171112478. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/11/12478>.

ZHANG, Dong et al. Structure activity relationship studies on rhodanines and derived enethiol inhibitors of metallo- β -lactamases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 26, n. 11, p. 2928–2936, 2018. ISSN: 09680896. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.02.043. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089618301858>.

ZHANG, GMin; HAO, Quan. Crystal structure of NDM-1 reveals a common β -lactam hydrolysis mechanism. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 25, n. 8, p. 2574–2582, 2011. ISSN: 0892-6638. DOI: 10.1096/fj.11-184036. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.11-184036>.

ZHAO, Wei-Hua; HU, Zhi-Qing. IMP-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. **Critical Reviews in Microbiology**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 214–226, 2011. ISSN: 1040-841X. DOI: 10.3109/1040841X.2011.559944. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2011.559944>.

ZHENG, Hailin; WEINER, Lev M.; BAR-AM, Orit; EPSZTEJN, Silvina; CABANTCHIK, Z. Ioav; WARSHAWSKY, Abraham; YODIM, Moussa B. H.; FRIDKIN, Mati. Design, synthesis, and evaluation of novel bifunctional iron-chelators as potential agents for neuroprotection in Alzheimer's, Parkinson's, and other neurodegenerative diseases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 773–783, 2005. ISSN: 09680896. DOI: 10.1016/j.bmc.2004.10.037. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089604008399>.