

UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - IQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA – PPGQB

VANESSA LIMA DO NASCIMENTO

Planejamento e Síntese de Inibidores de β -Lactamases Baseados em Ácidos Acrílicos: Uma Abordagem para Combater a Resistência Bacteriana.

Maceió – AL

2024

**Campus A.C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57.072.970 – Maceió - AL**

VANESSA LIMA DO NASCIMENTO

Planejamento e Síntese de Inibidores de β -Lactamases Baseados em Ácidos Acrílicos: Uma Abordagem para Combater a Resistência Bacteriana.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção da aprovação em exame de defesa de dissertação.

Orientador: Prof.º Dr. Thiago M. de Aquino

Maceió
2024

Classificação na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Betânia Almeida dos Santos – CRB-4 – 1542

N244p Nascimento, Vanessa Lima do.
Planejamento e síntese de inibidores de B-Lactamases baseados em
ácidos acrílicos: uma abordagem para combater a resistência bacteriana /
Vanessa Lima Nascimento. – 2024.
147 f. : il color.

Orientador: Thiago Mendonça de Aquino.
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de
Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 82-97.
Anexos: f. 100-147

1. Ácidos. 2. Enzimas B-lactamases. 3. Resistência bacteriana. 4.
Enzimas MBLs e SBLs. I. Título.

CDU: 547.391.1



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.ufal@iqb.ufal.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação da mestranda **VANESSA LIMA DO NASCIMENTO** intitulada: “**Planejamento e Síntese de Inibidores de β -Lactamases Baseados em Ácidos Acrílicos: Uma Abordagem para Combater a Resistência Bacteriana**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 27 de novembro de 2024, às 9h30, por meio de videoconferência.

Maceió, 27 de novembro de 2024.

Comissão Examinadora:

Dr. HENRIQUE DOUGLAS MELO COUTINHO, URCA
Examinador Externo ao Programa

Dr. DIMAS JOSÉ DA PAZ LIMA, UFAL
Examinador Interno

Dr. THIAGO MENDONÇA DE AQUINO, UFAL
Presidente

*Dedico este trabalho à minha mãe Eliana Lima, por todo amor,
incentivo e inspiração.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a vida, ser meu guia e refúgio em todos os momentos.

A minha mãe Eliana M^a de Lima por ser o meu sol, minha água e minha rocha. Agradeço por todo carinho, apoio e motivação. Sem você ao meu lado tudo seria muito difícil.

Aos meus padrinhos Paulo e Fátima Albuquerque e, suas filhas Flávia e Paula por sempre se fazerem presentes na minha de vida desde o dia que eu nasci. Agradeço também pela educação e por me mostrar que o meu conhecimento ninguém me tira, porque eu dignamente o conquistei.

Ao meu orientador Prof^o Dr. Thiago Mendonça de Aquino por aceitar me orientar durante o mestrado, pela paciência, pelo compromisso e por todos os ensinamentos passados durante a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório: Kadja Chagas, Marcone Alcântara, Nathalia Monteiro, Esaú Brandão, Aristides e Lívni pela amizade científica, gargalhadas, “overdoses” de comida e ajuda com as obrigações do LSPMed.

Aos meus colegas do NAPRMN: Edmilson Jr., Alexandre, Jefferson e Tássia pela gentileza, pelas boas conversas científicas e também pelas conversas comuns sobre rotinas diárias. Em especial, sou grata ao Alexandre por ter me ajudado muito com as análises de RMN.

Ao Prof^o Dr. Edeildo Ferreira pelos insights e ensinamentos transmitidos.

Aos colegas Matheus Vinicius Guimarães de Melo e Hernando Neto do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT) por ter me auxiliado com as análises de HPLC e LC-MS.

Aos meus amigos Lucas e Anderson por sempre estarem me incentivando a ir em frente, por ouvir os meus lamentos e por me dar conselhos quando eu mais preciso. Obrigada por vossas amizades!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) por transmitir o aprendizado necessário para a minha formação como mestra.

A FAPEAL, CAPES e ao CNPq pelo incentivo financeiro durante toda a pesquisa realizada dentro do LSPMed.

Aos meus colegas de curso que contribuíram diretamente e indiretamente durante o meu mestrado.

O mundo é selvagem

O caminho é solitário

Madonna – Killers Who Are Partying

RESUMO

A resistência bacteriana é a capacidade das bactérias se adaptarem aos antibióticos por meio de mecanismos bioquímicos, sendo considerada um dos maiores desafios de saúde pública do século XXI. Estima-se que até 2050, essas infecções bacterianas afetarão cerca de 10 milhões de pessoas ao redor do mundo. A resistência aos antibióticos β -lactâmicos, que agem inibindo a biossíntese da parede celular bacteriana, é especialmente preocupante, uma vez que são considerados o último recurso terapêutico para tratar muitas infecções. O principal mecanismo de resistência envolvido é a produção de serina β -lactamases (S β LS) e metalo- β -lactamases (M β LS), enzimas que degradam o anel β -lactâmico destes antibióticos. Neste sentido, Brem e colaboradores (2014) identificaram o composto ML302F como inibidor da M β L, com valor de CI_{50} igual a 0,30 μ M e com K_i de 183 ± 24 nM. Baseado nisto, o objetivo deste trabalho foi planejar e desenvolver 10 análogos contendo modificações na porção aromática e a troca do grupo tiol pelo ciano no carbono- α da insaturação. A metodologia de síntese empregada se mostrou satisfatória na obtenção dos compostos intermediário e finais, com rendimentos variando entre 46,01-93,01% e pureza superior a 95%. Além disso, por meio da determinação *in silico* das propriedades ADME, foi possível prever que os derivados de ácido 2-cianoacrílicos não violam as regras de Lipinski e Veber. Por fim, os derivados de ácidos 2-cianoacrílicos sintetizados serão posteriormente avaliados quanto a sua capacidade de inibição frente às enzimas β -lactamases em sinergia com antibióticos β -lactâmicos, contribuindo para o desenvolvimento de novos inibidores potentes, de baixo custo e relativamente não tóxicos para uma nova abordagem no tratamento de infecções bacterianas.

Palavras-chave: Ácidos 2-cianoacrílicos; Resistência bacteriana; β -lactamases; S β LS; M β LS.

ABSTRACT

Bacterial resistance is the ability of bacteria to adapt to antibiotics through biochemical mechanisms, representing one of the greatest public health challenges of the 21st century. It is estimated that by 2050, bacterial infections will affect approximately 10 million people worldwide. Resistance to β -lactam antibiotics, which act by inhibiting bacterial cell wall biosynthesis, is particularly concerning as they are considered the last therapeutic resort for treating many infections. The main resistance mechanism involved is the production of serine β -lactamases (S β LS) and metallo- β -lactamases (M β LS), enzymes that degrade the β -lactam ring of these antibiotics. In this context, Brem et al. (2014) identified the compound ML302F as an M β L inhibitor, with an IC₅₀ value of 0.30 μ M and a Ki of 183 ± 24 nM. Based on this, the objective of this work was to design and develop 10 analogs containing modifications in the aromatic portion and the substitution of the thiol group with a cyano group on the α -carbon of the double bond. The employed synthetic methodology proved satisfactory for obtaining intermediate and final compounds, with yields ranging from 46.01% to 93.01% and purity above 95%. Furthermore, by determining in silico ADME properties, it was predicted that the 2-cyanoacrylic acid derivatives do not violate Lipinski's and Veber's rules. Finally, the synthesized 2-cyanoacrylic acid derivatives will subsequently be evaluated for their ability to inhibit β -lactamase enzymes in synergy with β -lactam antibiotics, contributing to the development of potent, low-cost, and relatively non-toxic inhibitors for a new approach to bacterial infection treatment.

Keywords: *2-Cyanoacrylic acids; Bacterial resistance; β -lactamases; S β LS; M β LS.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Linha do tempo sobre a introdução de novas classes de antibióticos ao desenvolvimento da resistência bacteriana.....	21
Figura 2 - Mecanismos intrínsecos de resistência aos agentes antimicrobianos: (1) Mudanças na permeabilidade da membrana externa; (2) Extrusão de compostos tóxicos (bombas de efluxo); (3) Alterações no sítio-alvo do fármaco e (4) Inativação enzimática sobre o antibiótico.	23
Figura 3 - Mecanismos de transferência horizontal.	24
Figura 4 - Estruturas genéricas de antibióticos β -lactâmicos. O anel azetidinona é destacado em vermelho para cada antibiótico β -lactâmico.	25
Figura 5 - Mecanismo de reação para a hidrólise da penicilina pelas S β LS.....	27
Figura 6 - Mecanismo de reação para a hidrólise da penicilina pelas M β LS.	28
Figura 7 - Inibidores de β -lactamases.....	30
Figura 8 - Alguns inibidores não- β -lactâmicos.	31
Figura 9 - Linha do tempo do desenvolvimento de principais fármacos inibidores covalentes.	32
Figura 10 - Comparação da interação entre um inibidor (I) e uma enzima (E) em ligação não covalente tradicional (a) e ligação covalente (b).	33
Figura 11 - Fármacos contendo grupos aceptores de Michael em suas estruturas moleculares.	34
Figura 12 - Estrutura dos aceptores de Michael.	35
Figura 13 - Representação genérica da reação de adição de Michael.	35
Figura 14 - (a) Energias dos orbitais de fronteira e coeficientes para acroleína; (b) A reatividade de fragmentos α,β -insaturados frente à adição ao grupo carbonílico.	36
Figura 15 - Catalisador duplo de ácido arilborônico-aminotioureia para promover a adição de conjugados em ácidos acrílicos insaturados livres.	37
Figura 16 - Design de corantes empregando ácidos 2-cianoacrílicos.	38
Figura 17 - Fotorreações com participação de derivados de ácidos acrílicos.	38
Figura 18 - Compostos com atividades anticâncer e anti-inflamatória.	39
Figura 19 - Compostos ativos frente as cepas de <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	40

Figura 20 - (a) Hidrólise do inibidor a base de rodanina (8) no sítio ativo de MβLs para gerar o ácido 2-mercaptoacrílico derivado (9); (b) Tabela com valores de CI ₅₀ dos compostos (8) e (9) contras diferentes MβLs.....	41
Figura 21 - Planejamento estrutural dos novos derivados de ácidos acrílicos.	42
Figura 22 - Modo genérico de ligações com os íons de Zn ²⁺ das MβLs.	42
Figura 23 - Mecanismo genérico de inibição de serino-β-Lactamase.....	43
Figura 24 - Método para a obtenção dos acrilatos de etila.	50
Figura 25 - Método para a obtenção dos ácidos 2-cianoacrílicos.	57
Figura 26 - Esquema do mecanismo proposto da condensação de Knoevenagel para obtenção dos acrilatos de etila.	66
Figura 27 - Esquema do mecanismo proposto da hidrólise básica para obtenção dos ácidos acrílicos.....	67
Figura 28 - Modos de detecção do íon molecular em ESI-MS.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação de dois esquemas de classificação de β -lactamase.....	26
Tabela 2 - Análise do grau de pureza relativo dos acrilatos de etila e dos ácidos 2-cianoacrílicos.	68
Tabela 3 - Perfil químico dos espectros de (ESI – MS) obtidos para os acrilatos de etila.	71
Tabela 4 - Perfil químico dos espectros de (ESI – MS) obtidos para os ácidos 2-cianoacrílicos.	72
Tabela 5 - Previsão farmacocinética para os compostos ML302F e derivados de ácidos 2-cianoacrílicos.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Adenosina Trifosfato

CCD - Cromatografia em camada delgada

CI₅₀ - Concentração inibitória para 50% de uma resposta

DMSO-d₆ - Dimetil sulfoxido delterado

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ESI-MS - Espectrometria de massas com ionização por electrospray (em inglês *Electrospray ionization mass spectrometry*)

FMO – Frotier Molecular Orbital analyses

HOMO - Orbital Molecular Ocupado mais Alto

HPLC/CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência (em inglês *High performance liquid chromatography*)

LUMO - Orbital Molecular não Ocupado mais Baixo

MCT1 - Transportador de Monocarboxilato

MβLs - Metalo-β-Lactamases

MM - Massa Molecular

PF - Ponto de fusão

PIB - Produto Interno Bruto

OMS - Organização Mundial da Saúde

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RNA - Ácido Ribonucleico

SβLs - Serino β-Lactamase

UHPLC - cromatografia líquida de ultra eficiência (em inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*)

LISTA DE SÍMBOLOS

Asp – Ácido aspártico

CH₂O₂ – Ácido fórmico

Cys – Cisteína

Et₃N – Trietilamina

EtOH – Etanol

H – Próton ou Hidrogênio

His – Histidina

J – Constante de acoplamento

K_i – Constante de inibição enzimática

Lys – Lisina

MeOH – Metanol

ppm - Parte por milhão

® - Marca registrada

Ser – Serina

US\$ - Dolar americano

Zn²⁺ - Íon de zinco

% - Porcentagem

δ – deslocamento químico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Resistência Bacteriana	20
2.2	Bactérias e seus mecanismos de resistência	22
2.3	Enzimas β -lactamases	25
2.4	Inibidores de β -lactamases.....	28
2.5	Inibição covalente e os aceptores de Michael.....	31
2.6	Aplicações químicas de ácidos acrílicos e seus derivados	37
2.7	Justificativa para a execução da pesquisa	40
3	OBJETIVOS	45
3.1	Objetivo Geral	45
3.2	Objetivos específicos	45
4	MATERIAIS e MÉTODOS	47
4.1	Materiais utilizados.....	47
4.1.1	Cromatografia	47
4.1.2	Ponto de fusão.....	47
4.1.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	47
4.1.4	Espectroscopia RMN ^1H e ^{13}C	48
4.1.5	Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS)	48
4.1.6	Reagentes e solventes	48
4.2	Cálculos para a validação da regra de Lipinski e Veber.....	49
4.3	Procedimentos reacionais	49
4.3.1	Método geral para a obtenção dos acrilatos de etila (a1-10)	49
4.3.1.1	Dados físico-químicos do composto (<i>E</i>)-2-ciano-3-fenilacrilato de etila (a1).....	50
4.3.1.2	Dados físico-químicos do composto (<i>E</i>)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilato de etila (a2)	51
4.3.1.3	Dados físico-químicos do composto (<i>E</i>)-2-ciano-3-(4-hidroxifenil)acrilato de etila (a3)	51
4.3.1.4	Dados físico-químicos do composto (<i>E</i>)-2-ciano-3-(3-fluorofenil)acrilato de etila (a4)	52
4.3.1.5	Dados físico-químicos do composto (<i>E</i>)-3-(3-bromofenil)-2-cianoacrilato de etila (a5)	53

4.3.1.6	Dados físico-químicos do composto (<i>E</i>)-2-ciano-3-(2,4-diclorofenil)acrilato de etila (a6)	53
4.3.1.7	Dados físico-químicos do composto (<i>E</i>)-2-ciano-3-(3,4-diclorofenil)acrilato de etila (a7)	54
4.3.1.8	Dados físico-químicos do composto (<i>E</i>)-3-(4-clorofenil)-2-cianoacrilato de etila (a8)	55
4.3.1.9	Dados físico-químicos do composto (<i>E</i>)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-cianoacrilato de etila (a9)	55
4.3.1.10	Dados físico-químicos do composto (<i>E</i>)-2-ciano-3-(3,4-dimetoxifenil)acrilato de etila (a10)	56
4.3.2	Método para a obtenção dos ácidos 2-cianoacrílicos (b1-10)	57
4.3.2.1	Dados físico-químicos do composto Ácido (<i>E</i>)-2-ciano-3-fenilacrílico (b1)	57
4.3.2.2	Dados físico-químicos do composto Ácido (<i>E</i>)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrílico (b2)	58
4.3.2.3	Dados físico-químicos do composto Ácido (<i>E</i>)-2-ciano-3-(4-hidroxifenil)acrílico (b3)	58
4.3.2.4	Dados físico-químicos do composto Ácido (<i>E</i>)-2-ciano-3-(3-fluorofenil)acrílico (b4)	59
4.3.2.5	Dados físico-químicos do composto Ácido (<i>E</i>)-3-(3-bromofenil)-2-cianoacrílico (b5)	60
4.3.2.6	Dados físico-químicos do composto Ácido (<i>E</i>)-2-ciano-3-(2,4-diclorofenil)acrílico (b6)	60
4.3.2.7	Dados físico-químicos do composto Ácido (<i>E</i>)-2-ciano-3-(3,4-diclorofenil)acrílico (b7)	61
4.3.2.8	Dados físico-químicos do composto Ácido (<i>E</i>)-3-(4-clorofenil)-2-cianoacrílico (b8)	61
4.3.2.9	Dados físico-químicos do composto Ácido (<i>E</i>)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-cianoacrílico (b9)	62
4.3.2.10	Dados físico-químicos do composto Ácido (<i>E</i>)-2-ciano-3-(3,4-dimetoxifenil)acrílico (b10)	63
5	RESULTADOS e DISCUSSÃO	65
5.1	Obtenção dos compostos intermediários e compostos finais.	65
5.2	Mecanismos reacionais para as moléculas intermediárias (a1-10).	65
5.2.1	Caracterização por RMN de ¹ H e ¹³ C dos compostos intermediários (a1-10)	66
5.3	Mecanismos reacionais para as moléculas finais (b1-10).	67
5.3.1	Caracterização por RMN de ¹ H e ¹³ C dos compostos finais (b1-10)	67
5.4	Avaliação do grau de pureza relativo utilizando Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE/HPLC).	68
5.5	Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS)	69

5.6	Análise de propriedades ADME segundo os critérios de Lipinski e Veber	73
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	76
7	REFERÊNCIAS.....	79
8	ANEXOS.....	96
8.1	Anexo A.....	96
8.2	Anexo B	98
8.3	Anexo C	100
8.4	Anexo D.....	102
8.5	Anexo E	105
8.6	Anexo F	108
8.7	Anexo G.....	111
8.8	Anexo H.....	113
8.9	Anexo I	115
8.10	Anexo J	117
8.11	Anexo K.....	119
8.12	Anexo L	122
8.13	Anexo M	125
8.14	Anexo N.....	127
8.15	Anexo O.....	129
8.16	Anexo P	132
8.17	Anexo Q.....	134
8.18	Anexo R.....	137
8.19	Anexo S	139
8.20	Anexo T	141

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A descoberta da penicilina em 1929 por Alexander Fleming, seguido pela caracterização química desta substância como detentora de um β -lactâmico por Howard Florey e colaboradores, representou um marco na história moderna da humanidade (ABRAHAM, 1983; BENNETT e CHUNG, 2001; GAYNES *et al.*, 2017). No entanto, desde os primeiros antibióticos β -lactâmicos introduzidos para combater a ação de bactérias patogênicas, a resistência aos mesmos desenvolveu-se rapidamente devido a sua adoção generalizada já observada nas décadas de 1940 e 1950 (SHLAES, 2010).

A resistência bacteriana é uma das principais ameaças de saúde global atual devido ao uso excessivamente indevido de antibióticos. Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), este problema foi causa direta de 1,27 milhões de óbitos em todo o mundo no ano de 2019, e contribuiu para cerca de 4,95 milhões de mortes até 2023 (WHO, 2023a). De acordo com Jim O'Neill (2016), cerca de 700 mil mortes ocorrem anualmente no mundo devido a infecções causadas por bactérias resistentes, evidenciando a gravidade da crise global. Projeções comissionadas pelo governo do Reino Unido estima que, se a tendência atual da resistência bacteriana se mantiver ao longo dos anos, é provável que esta torne-se a principal causa de morte da população mundial em 2050 (O'NEILL, 2014). As projeções indicam que o sul da Ásia, a América Latina e o Caribe sejam as regiões com maiores taxas de mortalidade até 2050 (NAGHAVI *et al.*, 2024). Em alguns países subdesenvolvidos as taxas de resistência são cerca de 90%, como resultado disto muitos tratamentos são ineficazes para doenças como infecções urinárias, respiratórias e sexualmente transmissíveis (DSTs), além de pneumonias e tuberculose (Anvisa, 2022). Em adição, a falta de respostas à farmacoterapia existente contra as infecções bacterianas exige medicamentos mais complexos e caros, internações hospitalares mais longas e necessidade de cuidados mais intensivos.

Os β -lactâmicos representam uma classe de agentes antibióticos que inclui as penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas e monobactamas como fármacos de amplo espectro de ação, sendo amplamente utilizados devido à sua eficácia (BUSH e BRADFORD, 2016). Dentre os mecanismos de resistência bacteriana mais preocupantes estão as β -lactamases, enzimas presentes em bactérias gram-positivas e gram-negativas, as quais hidrolisam o anel β -lactâmico dos antibióticos, inativando-os (POOLE, 2024). A produção dessas enzimas pode ser induzida ou constitutiva, e a disseminação de genes que codificam as β -lactamases entre bactérias patogênicas têm agravado o problema da resistência, levado ao surgimento de cepas

resistentes como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (ZENG e LIN, 2013).

Assim, havendo uma necessidade urgente de desenvolver novas estratégias para combater a resistência mediada por β -lactamases, o presente trabalho visa planejar e sintetizar derivados de ácidos acrílicos como protótipos inibidores de S β L e M β L. A hipótese central deste estudo é que esses compostos possam efetivamente inibir a atividade das β -lactamases, atuando como aceptores de Michael ou coordenando com os metais presentes no sítio ativo da enzima, restaurando assim a eficácia dos antibióticos β -lactâmicos contra cepas resistentes.

De acordo com o estudo de Brem et al. (2014), que demonstrou a potente inibição da enzima M β L VIM-2 pelo ML302F, um produto da hidrólise de um composto à base de rodanina, que apresentou um perfil farmacofórico promissor para o desenvolvimento de novos inibidores de β -lactamases. Assim, compostos derivados de ácidos acrílicos foram planejados e sintetizados no presente trabalho, incorporando o grupo ciano (-CN) na posição 2 da α,β -insaturação, contendo diferentes grupos doadores e retiradores de densidade eletrônica no anel benzênico, com o objetivo de obter compostos mais potentes.

REFERENCIAL TEÓRICO

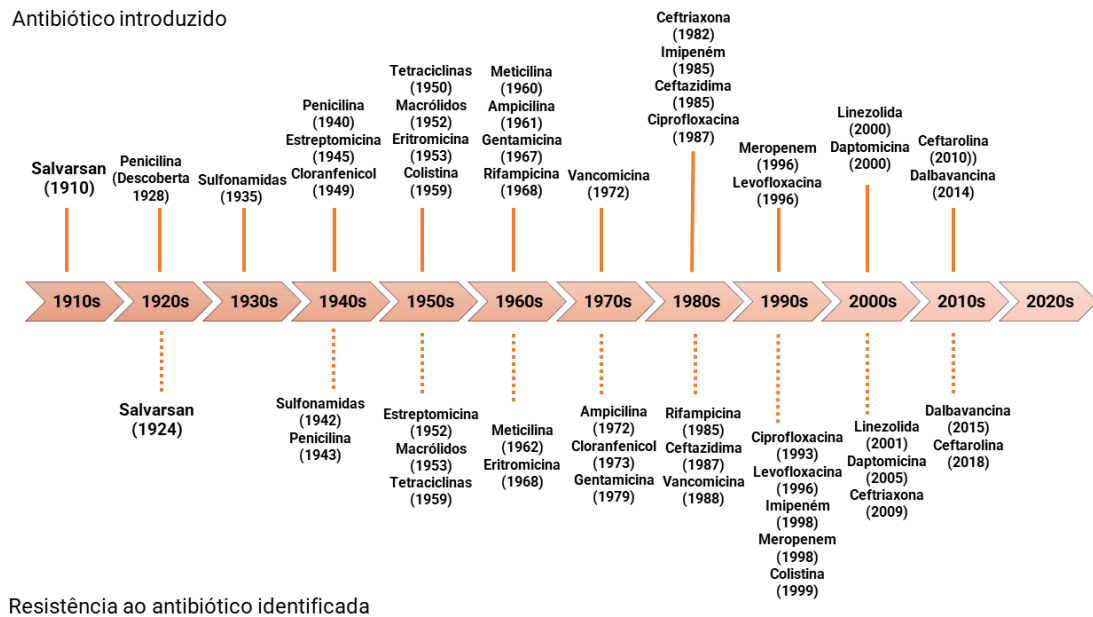
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Resistência Bacteriana

As bactérias representam uma das primeiras formas de vida no planeta, estando presentes no solo, na água, em locais de altas pressões, em ambientes inóspitos e dentro de outros seres vivos. Ao realizarem associações com outros organismos de forma parasitária, as bactérias são classificadas como micróbios patogênicos, gerando doenças infecciosas que podem levar à morte. A patogênese bacteriana possui como via a redução dos efeitos terapêuticos da quimioterapia antibacteriana. Curiosamente, ao longo de sua evolução os patógenos bacterianos desenvolveram diversos mecanismos para resistir compostos bactericidas que eram produzidos naturalmente em seus habitats (MAISONNEUVE e GERDES, 2014; RANDICH e BRUN, 2015). Também o resistoma, o conjunto de genes que determinam a resistência, se adaptou para enfrentar os desafios impostos pelo uso de antibióticos modernos utilizados na farmacoterapia (CHRISTAKI, MARCOU e TOFARIDES, 2020).

Desde a década de 1920, o uso indiscriminado de antibacterianos efetivos foi seguido pelo surgimento de microrganismos resistentes aos mesmos. Em 1924, pela primeira vez foi reportada a bactéria *Treponema pallidum* resistente ao tratamento com Arsfenamina (Salvarsan) (SILBERSTEIN, 1924; HAIDER e IKRAM, 2022; PAUL *et al.*, 2023). Em 1943, foi detectada resistência à penicilina em *Staphylococcus aureus*, seguida, nas décadas de 1950 e 1960, por outras bactérias, como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* (AMINOV, 2009; LI *et al.*, 2023). A partir da década de 1990, pesquisadores e médicos passaram a se preocupar com o ritmo do desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos não conseguirem acompanhar o aumento contínuo e preocupante da resistência antimicrobiana (DRLICA e PERLIN, 2010; PODOLSKY, 2018). Atualmente, uma grande parte dos patógenos bacterianos conhecidos desenvolveram resistência aos antibióticos existentes no mercado. Além disso, a resistência se espalha tanto em bactérias patogênicas humanas e animais quanto em micróbios ambientais, sendo que alguns probióticos podem desenvolver resistência sob a pressão seletiva prolongada dos antibióticos (WANG *et al.*, 2017; EMARA *et al.*, 2023). Na Figura 1 está descrito uma breve linha do tempo apresentando a introdução de novas classes de antibióticos juntamente com o ano em que a resistência bacteriana foi reportada pela primeira vez.

Figura 1 - Linha do tempo sobre a introdução de novas classes de antibióticos ao desenvolvimento da resistência bacteriana.



Fonte: FENG *et al.*, 2023 (ADAPTADO).

A escassez de novos antibióticos, juntamente com a evolução de bactérias multirresistentes está gerando um risco para a saúde pública, onde especialistas preveem que esta crise se intensificará nos próximos anos. Apesar da resistência bacteriana aos antibióticos ser um fenômeno natural e inevitável, devido ao caráter evolutivo e à alta adaptabilidade das bactérias, um dos principais fatores que transformaram essa ocorrência natural em um dos mais graves problemas de saúde global é o comportamento humano. O uso excessivo e muitas vezes inapropriado de antibióticos em seres humanos, em animais e até mesmo no campo da agricultura promove a seleção induzida de cepas bacterianas mais resistentes (ALDEYAB, LÓPEZ-LOZANO e GOULD, 2020; MO *et al.*, 2017; HERNANDO-AMADO *et al.*, 2019). Uma vez que as bactérias resistentes aos antimicrobianos são encontradas em pessoas, em animais, em alimentos, na água, no solo e no ar, elas podem ser transmitidas entre pessoas e animais, seja por meio dos alimentos de origem animal ou entre seres humanos. Além disso, após a década de 1990, houve uma significativa falta de investimento no setor de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) da indústria farmacêutica, devido à baixa rentabilidade dos antibióticos aliado a falta de estratégias inovadoras para o desenvolvimento de novos fármacos (SKÖLD, 2011; GONZALEZ-BELLO, 2019; LEPORE *et al.*, 2019).

Os antibióticos clinicamente usados em sua maioria atuam sobre um conjunto limitado de alvos biológicos, incluindo síntese de proteínas, biossíntese da parede celular, replicação de DNA, transcrição de RNA, biossíntese de folato e estrutura de membrana (TORTORA, CASE e FUNKE, 2017). Em adição, os antibióticos em desenvolvimento frequentemente derivam de compostos descobertos em décadas passadas. Desse modo, há uma necessidade urgente de desenvolver novas estratégias terapêuticas para tratar infecções bacterianas, que podem prolongar a doença, causar incapacidade física e até mesmo levar à morte. Essas infecções, geralmente provocadas por bactérias gram-negativas como *Mycobacterium tuberculosis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Staphylococcus aureus*, Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2024 (WHO, 2024b).

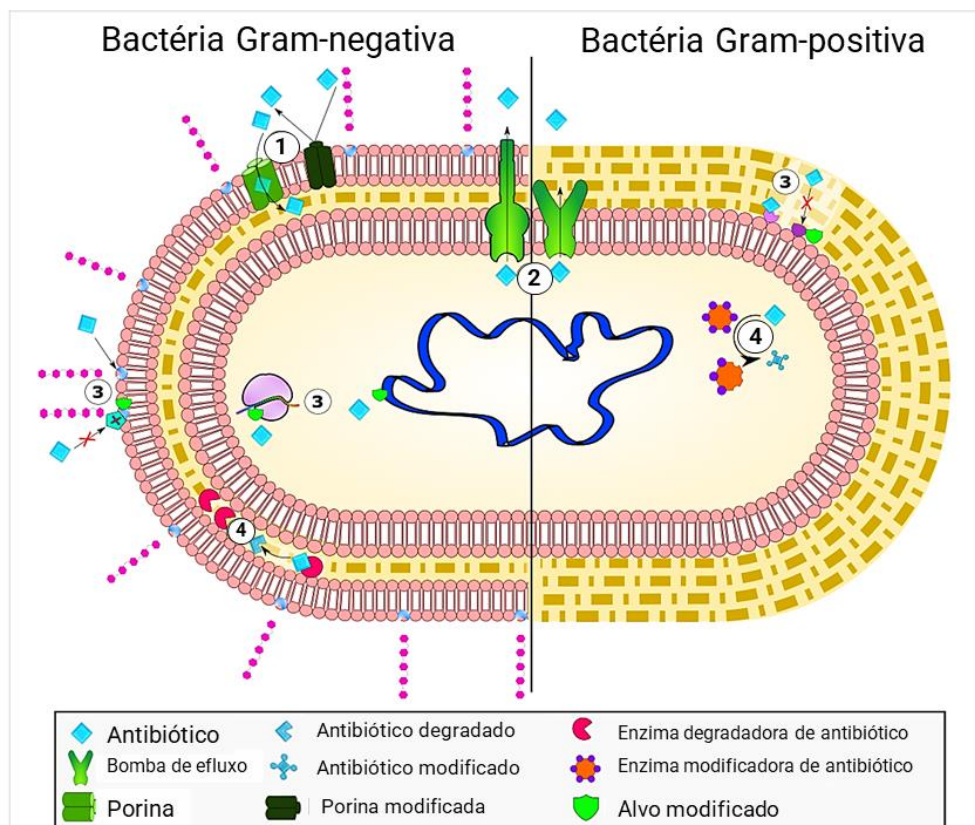
A falta de antibióticos eficazes para o tratamento de infecções eleva significativamente o risco associado a procedimentos médicos, como cirurgias complexas, transplantes de órgãos, implantes, controle do diabetes, dentre outros. Ao mesmo tempo, a resistência bacteriana contribui para altos custos da assistência médica devido a internações hospitalares prolongadas e maior necessidade de cuidados intensivos. Na Europa, mais de 900 milhões de euros foram destinados aos custos hospitalares com pacientes infectados com bactérias resistentes (KOBESSI et al., 2021; LI et al., 2023). Estima-se que os custos sociais resultem em 569 milhões de dias extras de hospital por ano até 2050 (KOBESSI et al., 2021). Além disso, foram registradas perdas econômicas diretas de aproximadamente US\$ 20 e 35 bilhões nos EUA e na China, respectivamente (PRESTINACI et al., 2015; ZHEN et al., 2021). Se a estratégia de contenção da resistência bacteriana não funcionar, espera-se um enorme impacto negativo na saúde global e na economia, pois estima-se que, até 2050, a resistência aos antibióticos reduzirá o PIB global anual em 3,8% nos países de alta renda e em 1,1% nos países de baixa renda, com perdas superiores a 5% do PIB. (ASLAM et al., 2018; ZHEN et al., 2019; LI et al., 2023). O impacto econômico global da resistência aos antibióticos poderá atingir aproximadamente US\$ 120 trilhões até 2050 (ASLAM et al., 2018).

2.2 Bactérias e seus mecanismos de resistência

Para enfrentar as condições ambientais desafiadoras e bloquear os efeitos dos antibióticos, as bactérias desenvolveram diferentes mecanismos que podem ser classificados como resistência intrínseca ou extrínseca (adquirida). Na resistência bacteriana intrínseca estão

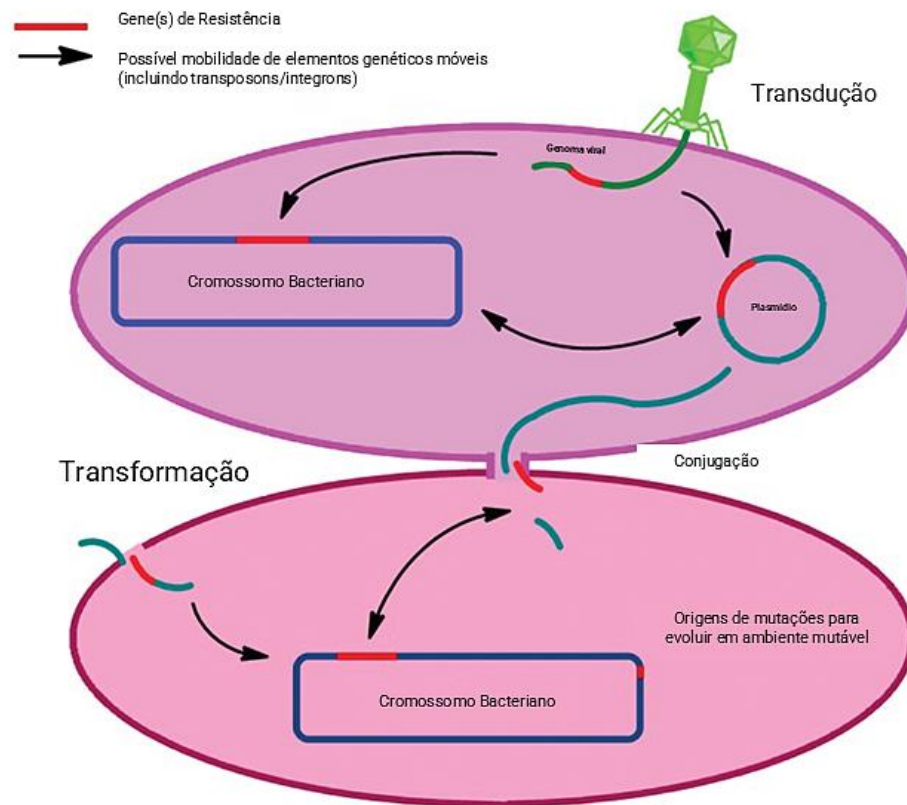
envolvidos os mecanismos de bombas de efluxo e de modificação da membrana externa da bactéria. Já a resistência adquirida inclui a transmissão horizontal por mutação do DNA (transformação, conjugação e transdução), modificação ou inativação de fármacos, modificação de alvos, e a ativação de bombas de efluxo. A Figura 2 e a Figura 3 esquematizam os principais mecanismos de resistência mencionados.

Figura 2 - Mecanismos intrínsecos de resistência aos agentes antimicrobianos: (1) Mudanças na permeabilidade da membrana externa; (2) Extrusão de compostos tóxicos (bombas de efluxo); (3) Alterações no sítio-alvo do fármaco e (4) Inativação enzimática sobre o antibiótico.



Fonte: VARELA *et al.*, 2021(ADAPTADO).

Figura 3 - Mecanismos de transferência horizontal.



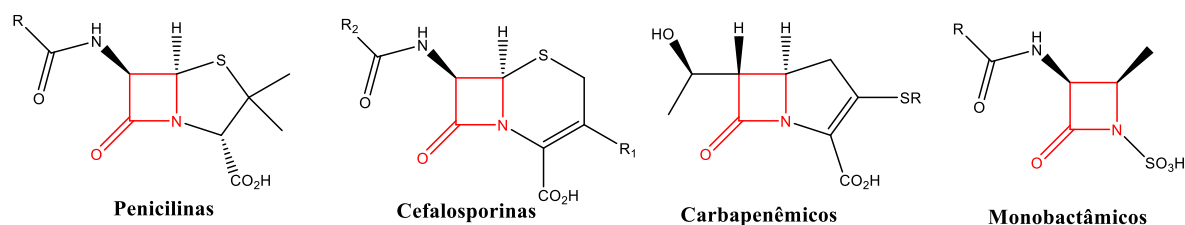
Fonte: ASLAM *et al.*, 2018 (ADAPTADO).

Dentre todos os mecanismos de resistência mencionados, daremos uma atenção especial ao mecanismo de inativação enzimática, o qual promove a alteração da estrutura química do antibiótico por meio da ação de enzimas produzidas pelas bactérias, impedindo sua ligação a alvos específicos e, por consequência, resultando em resistência. As reações catalisadas pelas enzimas incluem (1) acetilação, que afeta o cloranfenicol, os aminoglicosídeos, as estreptograminas e as fluoroquinolonas; (2) fosforilação, que modifica o cloranfenicol e os aminoglicosídeos; e (3) adenilação, que altera a lincomicina e os aminoglicosídeos (BLAIR *et al.*, 2015). As β -lactamase são exemplos característicos de mecanismos de resistência bacteriana capazes de hidrolisar a ligação amida do anel β -lactâmico, tornando os antibióticos ineficazes (SHAIKH *et al.*, 2015; NARENDRAKUMAR *et al.*, 2023).

2.3 Enzimas β -lactamases

A produção de enzimas β -lactamases por algumas bactérias possuem origens ancestrais e é um dos meios mais expressivos dos mecanismos de resistência por inativação enzimática. Elas são enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico (ou azetidinona) de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Figura 4). Por causa da diversidade dos substratos enzimáticos, as β -lactamases são categorizadas por similaridade de sequência proteicas em classes A, B, C e D, conforme a classificação molecular de Ambler (AMBLER, 1980; BUSH, 2015; TOOKE *et al.*, 2019). As enzimas que pertencem as classes A, C e D são S β LS que utilizam o resíduo de serina como nucleófilo reativo. Enquanto aquelas que pertencem à classe B são hidrolases dependentes de zinco, comumente denominadas de M β LS. Contudo, é importante ressaltar que esta não é a única classificação funcional para as β -lactamases. Na década de 1990, uma categorização para essas enzimas baseando-se em preferências de substrato e características de inibição foi proposta, dividindo-as em quatro grupos: Grupo 1 - as cefalosporinasas que não são inibidas pelo Ácido Clavulânico; Grupo 2 - as penicilinasas, incluindo aquelas de amplo espectro que geralmente são inibidas pelo Ácido Clavulânico (Clavulanato), subdivididas em subgrupos 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e e 2f, com base nas taxas de hidrólise e no perfil de inibição; por fim, Grupo 3 - refere-se às enzimas inibidas pelo agente quelante de metal EDTA (BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995; JACOBY, 2006; BUSH e JACOBY, 2010). Logo adiante é possível comparar ambas categorizações para as β -lactamases na Tabela 1.

Figura 4 - Estruturas genéricas de antibióticos β -lactâmicos. O anel azetidinona é destacado em vermelho para cada antibiótico β -lactâmico.



Fonte: AUTORA, 2024.

Tabela 1 - Comparação de dois esquemas de classificação de β -lactamase.

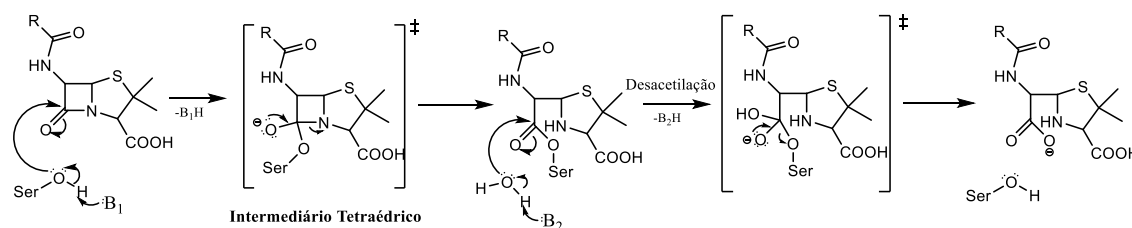
Classificação de Ambler: sítio catalítico (espectro)	Classificação de Bush–Jacoby–Medeiros: sítio catalítico (espectro)	Substratos	Inibido por	Exemplos
A: serina (variável)	2a: serina (Penicilinases)	Penicilinas	Clavulanato, Avibactam e outros inibidores mais recentes	Penicilinases de bactérias Gram-positivas
	2b: serina (Penicilinases)	Penicilinas e cefalosporinas de espectro estreito	Clavulanato, Avibactam e outros inibidores mais recentes	TEM-1, TEM-2 e SHV-1
	2be: serina (ESBLs - β -lactamase de espectro estendido)	Penicilinas e cefalosporinas, incluindo as de espectro alargado	Clavulanato, avibactam e outros inibidores mais recentes	SHV-2, TEM-10, CTX-M e GES-1
	2br: serina (Resistente a inibidores)	Penicilinas	Avibactam e outros inibidores mais recentes	TEM-30 e SHV-72
	2c: serina (Penicilinases)	Penicilinas e carbenicilina	Clavulanato, Avibactam e outros inibidores mais recentes	PSE (CARBONO)
	2e: serina (Cefalosporinase)	Penicilinas e cefalosporinas	Clavulanato	CepA
	2f: serina (Carbapenemases)	Penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos	Avibactam e outros inibidores mais recentes	KPC, PME, NMC-A e GES-2
B: metalo (Carbapenemase)	3: metalo (Carbapenemases)	A maioria dos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, mas não os monobactamas	Agentes quelantes (EDTA) e ANT431	IMP, VIM e NDM
C: serina (Cefalosporinases)	1: serina (Cefalosporinases)	Penicilinas e cefalosporinas	Cloxacilina, Avibactam e outros inibidores mais recentes	AmpC cromossômico, CMY, ACT-1 e DHA
D: serina (Oxacilinases)	2d: serina (Oxacilinases)	Penicilinas e cloxacilina; algumas incluem cefalosporinas	Cloreto de sódio; alguns por Clavulanato, Avibactam e outros	OXA-1/30, OXA-10, OXA-23 e OXA-48

		e/ou carbapenêmicos	inibidores mais recentes	
--	--	------------------------	-----------------------------	--

Fonte: BUSH e BRADFORD, 2019 (ADAPTADO).

Semelhante aos mecanismos empregados pelas serina proteases, as três classes de SβLs fazem uso de um mecanismo multi-etapas de acilação-desacilação na hidrólise de antibióticos β-lactâmicos por meio de um resíduo de serina em seu sítio catalítico, conforme mostrado na Figura 5 (CULP e WRIGHT, 2017; BAHR, GONZALEZ e VILA, 2024). Inicialmente ocorre a atração e a formação de ligações de hidrogênio entre o anel de β-lactâmico do antibiótico com os resíduos do sítio catalítico das enzimas. Em seguida, um ataque nucleofílico por um resíduo de serina conservado (Ser⁷⁰ em enzimas de classe A e D, e Ser⁶⁴ em enzimas de classe C) ao grupo carbonila da ligação amida da β-lactama é observado, gerando o intermediário reativo através de um estado de transição de oxiânion tetraédrico. Logo após, uma molécula de água é ativada para desacetilar o complexo β-lactama-β-lactamase, gerando um intermediário acil-enzima no qual ainda o resíduo de serina catalítica permanece ligado covalentemente a uma parte modificada da β-lactama. Finalmente, o intermediário acil-enzima sofre um rearranjo liberando tanto a β-lactamase regenerada quanto o antibiótico inativo.

Figura 5 - Mecanismo de reação para a hidrólise da penicilina pelas SβLs.

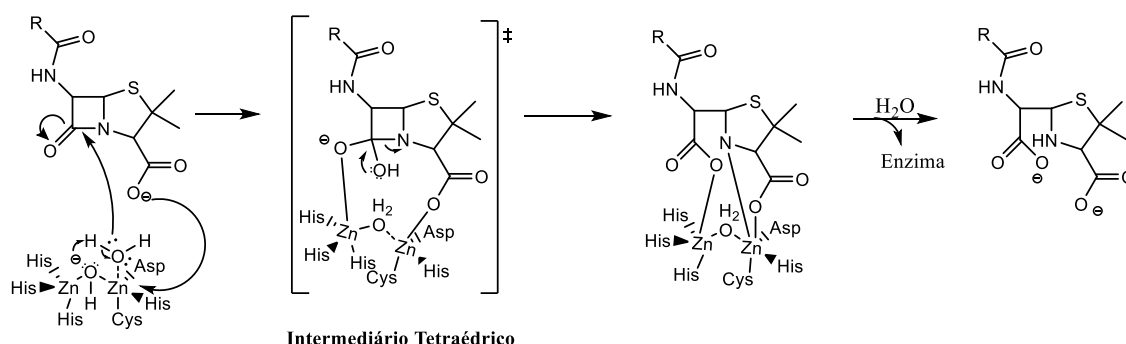


Fonte: BAHR, GONZALEZ e VILA, 2024 (ADAPTADO).

Por outro lado, as MβLs utilizam um ou dois íons Zn^{2+} para catalisar a hidrólise da ligação β-lactâmica, como apresentado na Figura 6 (CULP e WRIGHT, 2017; ROTONDO e WRIGHT, 2017). A reação é iniciada pelo ataque nucleofílico de um ânion hidróxido ligado ao Zn^{2+} ao grupo carbonila do anel β-lactâmico, formando um intermediário tetraédrico estabilizado pela coordenação ao metal. Posteriormente, o intermediário formado sofre abertura de anel, resultando em outro intermediário aniônico que é protonado para liberar o antibiótico

inativo. Ainda não está claro como essa protonação ocorre e se é um mecanismo geral para todos os antibióticos β -lactâmicos. No entanto, é reportado na literatura que um dos íons Zn^{2+} possui uma esfera de coordenação tetraédrica e é mantido no lugar por três resíduos de histidina e um ânion hidróxido, enquanto o outro íon Zn^{2+} possui uma esfera bipiramidal trigonal que envolve uma molécula de água e os resíduos histidina, cisteína e aspartato na composição do segundo local de ligação ao zinco (WANG *et al.*, 1999; GONZALEZ-BELLO *et al.*, 2019; MEINI, LLARRULL e VILA, 2015).

Figura 6 - Mecanismo de reação para a hidrólise da penicilina pelas M β LS.



Fonte: GONZALEZ-BELLO *et al.*, 2019 (ADAPTADO).

2.4 Inibidores de β -lactamases

Após a introdução das penicilinas para o tratamento de infecções, foram relatados na década de 1940 os primeiros casos de bactérias resistentes mediante a ação de enzimas hidrolases. Embora, as primeiras a serem reconhecidas como um problema clínico foram as S β LS nos anos 1970 (RAMMELKAMP e MAXON, 1942; DAWSON e HOBBY, 1944; BONDI JR e DIETZ, 1945; TREFFERS, 1946; SMITH, HAMILTON-MILLER e KNOX, 1969). Com esta perspectiva, a indústria farmacêutica adotou com sucesso duas estratégias para superar a resistência mediada pelas β -lactamases aos β -lactâmicos (DOCQUIER e MANGANI, 2018). A primeira foi a otimização de antibióticos estáveis à β -lactamase, como as cefalosporinas de espectro expandido e os carbapenêmicos, que são resistentes à hidrólise por β -lactamases de espectro restrito ou estendido. A segunda estratégia foi o desenvolvimento de inibidores seletivos de β -lactamase, que são usados em conjunto com um antibiótico β -lactâmico. Assim, a partir da triagem de produtos naturais descobriu-se em 1972 o ácido

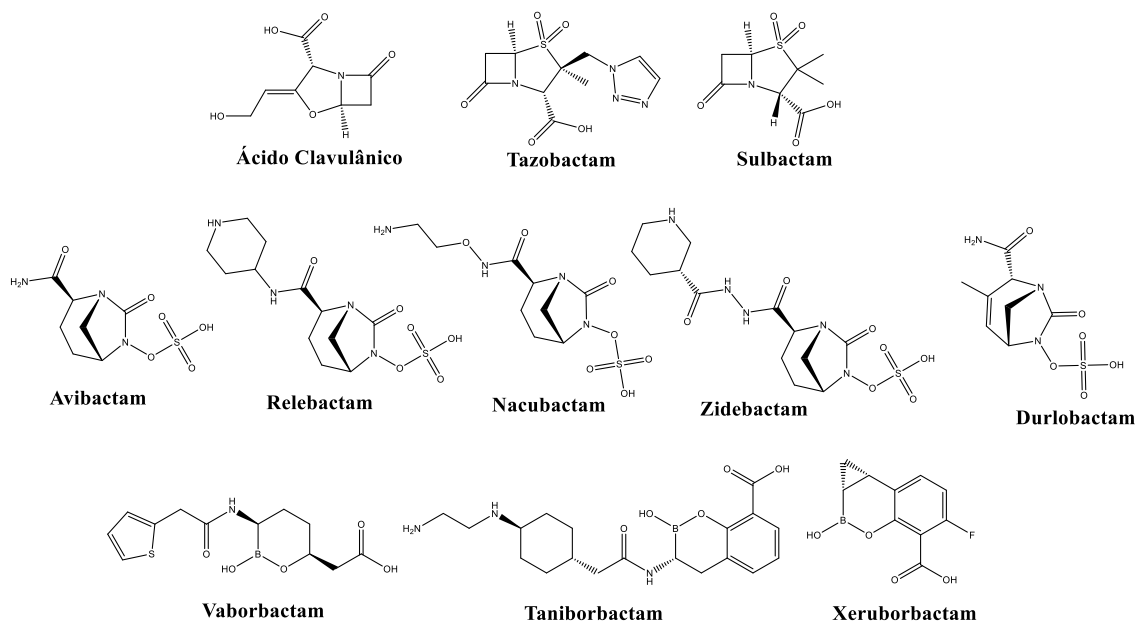
clavulânico (Figura 7), um metabólito secundário da *Streptomyces clavuligerus* que inibia a atividade das β -lactamases de classe A predominantes na época, tais como as expressões TEM-1 e PC1 (READING e COLE, 1977; GEDDES, KLUGMAN e ROLINSON, 2007). O ácido clavulânico representou um marco significativo na descoberta de fármacos moduladores da ação de β -lactamases, sendo lançado comercialmente em 1981, em combinação com a amoxicilina, como Augmentin[®] (HUTTNER *et al.*, 2020; FDA, 2024). O sucesso comercial do Augmentin[®] levou ao desenvolvimento de outras combinações similares, como Tazobactam e Sulbactam (Figura 7) (SAUDAGAR, SURVASE e SINGHAL, 2008).

Recentemente, novos inibidores não- β -lactâmico foram planejados com o intuito de abranger as classes B, C e D de β -lactamases. O primeiro exemplo é o Avibactam, um inibidor de diazabicyclo[3.2.1]octanona (DBO) formalmente conhecido como NXL104 (Figura 7). Lançado em 2015 e comercializado como Avycaz[®], é usado em combinação com Ceftazidima para o tratamento de infecções no trato urinário e intra-abdominal, sendo eficaz contra β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), KPC e OXA-48 (EHMANN *et al.*, 2013; STACHYRA *et al.*, 2009; AKTAŞ, KAYACAN e ONCUL, 2012; MAWAL *et al.*, 2015). É importante frisar que o Avibactam foi o primeiro de uma série de DBOs, seguido por Relebactam, Nacubactam, Zidebactam e Durlobactam (Figura 7) (DAVIES e EVERETT, 2021).

Nos últimos anos, outros compostos derivados de ácidos borônicos têm sido apontados como potentes inibidores de S β Ls, sendo o Vaborbactam (RPX7009) o primeiro deles (Figura 7). Introduzido no mercado em 2017 e comercializado como Vabomere[®], o Vaborbactam é utilizado em combinação com Meropenem para o tratamento clínico de infecções urinárias, com capacidade de inibir muitas S β Ls das classes A e C, incluindo as carbapenemases KPC (PAPP-WALLACE, 2019; LEE, KIM e TRINH, 2019). Com cobertura mais ampla em relação ao Vaborbactam, o Taniborbactam (VNRX-5133) surgiu logo após em combinação com Cefepima (Figura 7). Estudos *in vitro* e *in vivo* conduzidos por Liu *et al.* (2020) observaram que o Taniborbactam foi capaz de inibir enzimas S β Ls das classes A, C e D, assim como duas M β Ls da classe B, restaurando a atividade dos antibióticos β -lactâmicos contra *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias da família *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos. No momento o Taniborbactam se encontra em fase clínica III de investigação (ClinicalTrials.gov, 2024a). Um outro inibidor de β -lactamase de amplo espectro contendo ácido borônico há pouco tempo empregado na fase clínica I é o Xeruborbactam (QPX7728) (Figura 7) (ClinicalTrials.gov, 2024b). Nos estudos realizados por Hecker *et al.* (2020), o Xeruborbactam

exibiu atividade inibitória contra as enzimas SβLs das classes A, C e D, além de metaloenzimas como NDM-1. Ainda no mesmo estudo, o Xeruborbactam demonstrou, em ratos, um perfil farmacocinético semelhante à dos antibióticos β-lactâmicos, bem como boa biodisponibilidade oral sem necessidade de uma formulação usando um pró-fármaco.

Figura 7 - Inibidores de β-lactamases.

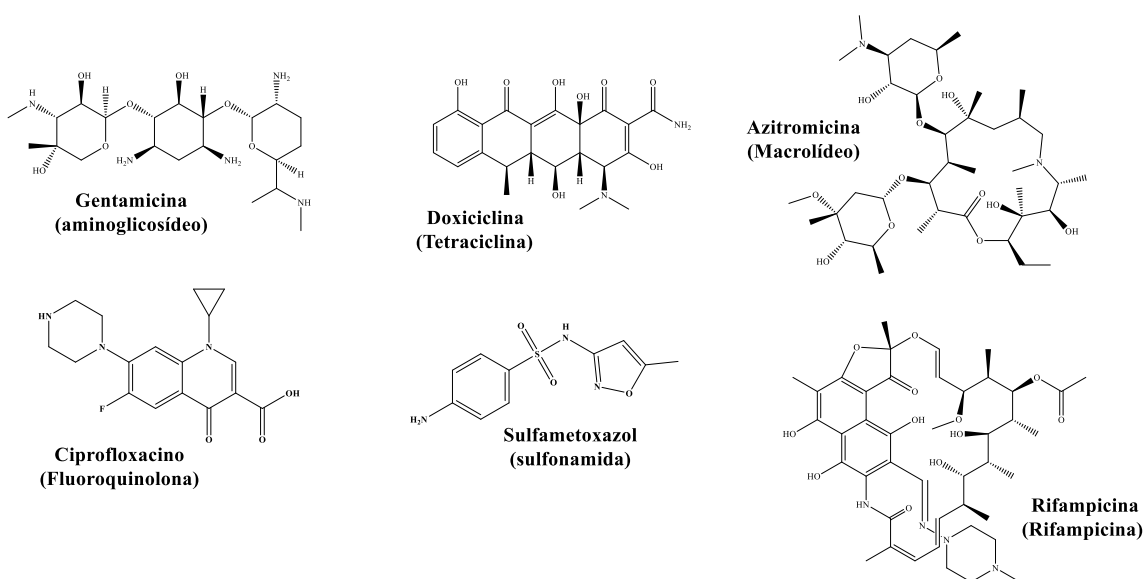


Fonte: AUTORA, 2024.

É importante destacar que o mecanismo de ação dos antibióticos β-lactâmicos afeta a síntese dos peptidoglicanos, um componente heteropolímero da parede celular bacteriana que lhe confere rigidez e estabilidade. A síntese da rede do peptidoglicano é guiada por diversas enzimas transpeptidases (proteínas de ligação à penicilina - PBPs) que catalisam a formação de ligações cruzadas peptídicas (RADKOV *et al.*, 2018). A ação dos antibióticos β-lactâmicos atua neste processo de transpeptidação, inativando-o ao acilar o resíduo de serina catalítico das PBPs para deixar a parede celular enfraquecida e levar a autólise da bactéria (LIMA *et al.*, 2020; BUSH *et al.*, 2019). Neste caso, a característica singular da inibição enzimática é sua irreversibilidade, formando uma ligação covalente estável que não pode ser facilmente rompida. No entanto, inibidores não β-lactâmicos apresentam uma variedade de mecanismos de ação, tais como inibição de enzimas essenciais para o metabolismo bacteriano (como a DNAGirase ou a topoisomerase IV), interferência na síntese de proteínas e alteração da permeabilidade da

membrana celular (RANG *et al.*, 2015; PATRICK e SPENCER, 2023). Os inibidores não- β -lactâmicos incluem diferentes classes de compostos, tais como aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, quinolonas, rifamicinas, sulfonamidas, etc (FOYE, 2008; GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010). A Figura 8 mostra alguns exemplos de inibidores não- β -lactâmicos.

Figura 8 - Alguns inibidores não- β -lactâmicos.



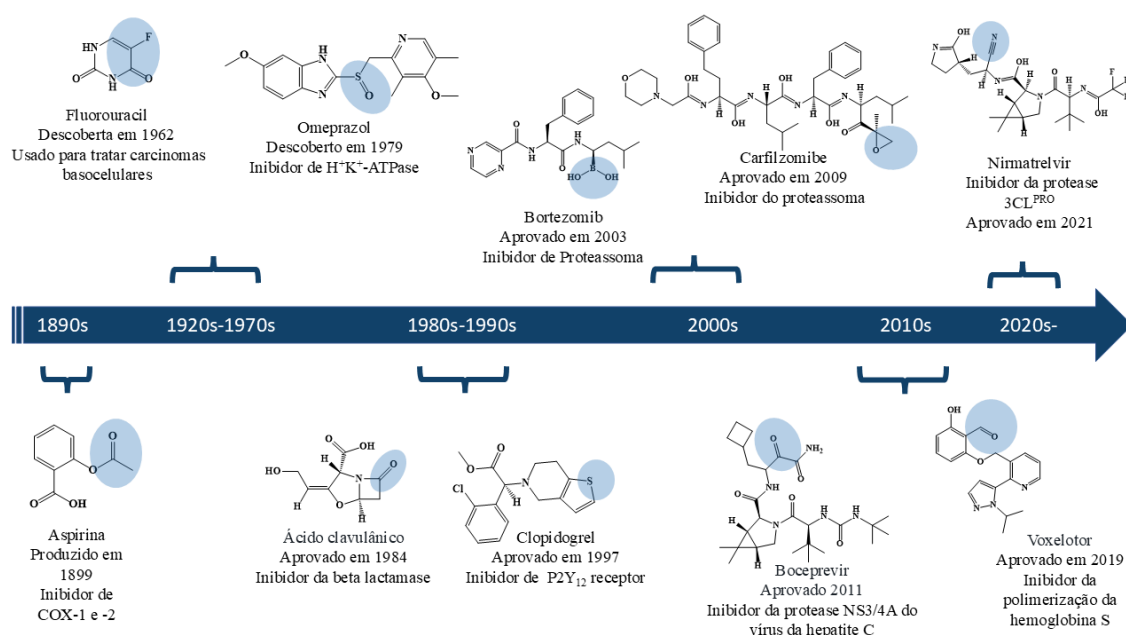
Fonte: AUTORA, 2024.

2.5 Inibição covalente e os aceptores de Michael

A concepção da grande maioria dos fármacos como pequenas moléculas geralmente é baseada nas interações não-covalentes que podem realizar com seus alvos biológicos, incluindo interações de van der Waals, ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos. Essas interações não-covalentes referem-se a um processo bioquímico rápido e reversível em condições de equilíbrio de ligação, que depende da afinidade entre a macromolécula e o seu inibidor (Figura 10, esquema (a)). O setor de pesquisa e desenvolvimento da indústria farmacêutica e determinados grupos de pesquisa acadêmicos têm buscado maximizar as interações de um fármaco com o seu alvo, com intuito de obter um evento mais duradouro na inibição de sua atividade. Com isso vem à luz a inibição covalente. Neste tipo de inibição, diferentemente do método de inibição convencional, os alvos biomoleculares podem ser neutralizados completamente de forma seletiva. No entanto, esta abordagem tem sido muito controversa

dentro da comunidade científica e também na indústria farmacêutica devido a toxicidade, ligações não-específicas fora do alvo (*off-target*), baixa biodisponibilidade, desafios relacionados às avaliações farmacodinâmica e farmacocinética. Contudo, muitos fármacos com perfil de inibidor covalente têm sido introduzidos no mercado com segurança e eficácia favoráveis. Entre as várias opções de tratamento, podemos citar Aspirina, Fluorouracil, Omeprazol, Ácido Clavulânico, Clopidogrel, Bortezomibe, Boceprevir, Carfilzomibe, Voxelotor e Nirmatrelvir (Figura 9) (ROTH, *et al.*, 1975; THOMAS e ZALCBERG, 1998; WALLMARK, BRÄNDSTRÖM e LARSSON, 1984; DING *et al.*, 2003; RICHARDSON, HIDESHIMA e ANDERSON, 2003; VENKATRAMAN, 2012; BROWN, APLIN e SCHOFIELD, 1996; BOÁKIM *et al.*, 2013; BLAIR, 2020; OWEN *et al.*, 2021).

Figura 9 - Linha do tempo do desenvolvimento de principais fármacos inibidores covalentes.

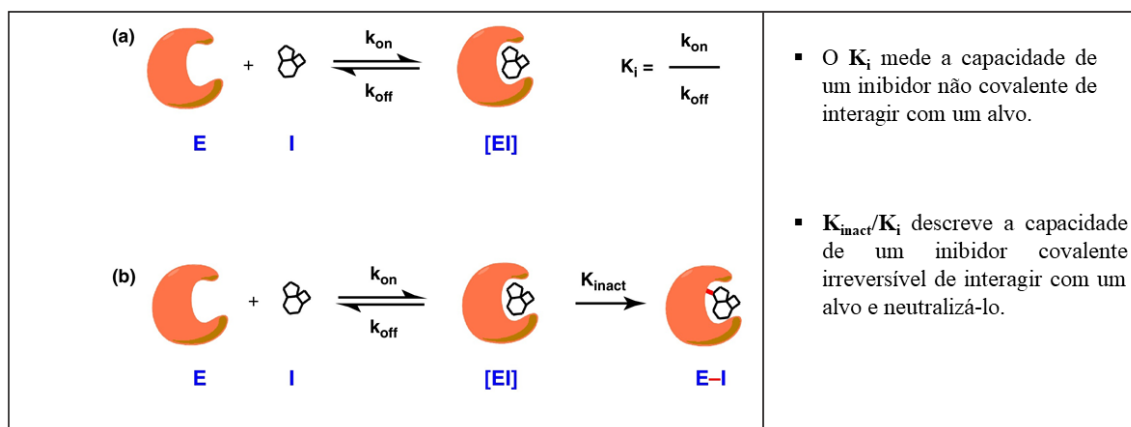


Fonte: AUTORA, 2024.

Geralmente, os inibidores covalentes são direcionados a uma proteína como processo a ser realizado em duas etapas, embora nem sempre sigam este padrão (NOE e GILBERT, 2012). No primeiro momento envolve a ligação reversível do composto ao local ativo da proteína-alvo, representada pelo K_i , como um inibidor reversível mais tradicional. Uma vez que o composto está ligado ao local ativo, pode ocorrer a formação da ligação covalente entre o inibidor e a proteína que é denotada por K_{inact} . No entanto, vale ressaltar que a formação e a

ligação covalente podem ocorrer simultaneamente em uma única etapa para alguns inibidores covalentes. Para a categorização dos inibidores covalentes é mais apropriado considerar as suas taxas de inativação do alvo ($K_{inact}:K_i$) (Figura 10, esquema (b)) em vez das medidas convencionais de concentração inibitória (CI_{50}) na avaliação da potência em relação a um alvo específico.

Figura 10 - Comparação da interação entre um inibidor (I) e uma enzima (E) em ligação não covalente tradicional (a) e ligação covalente (b).

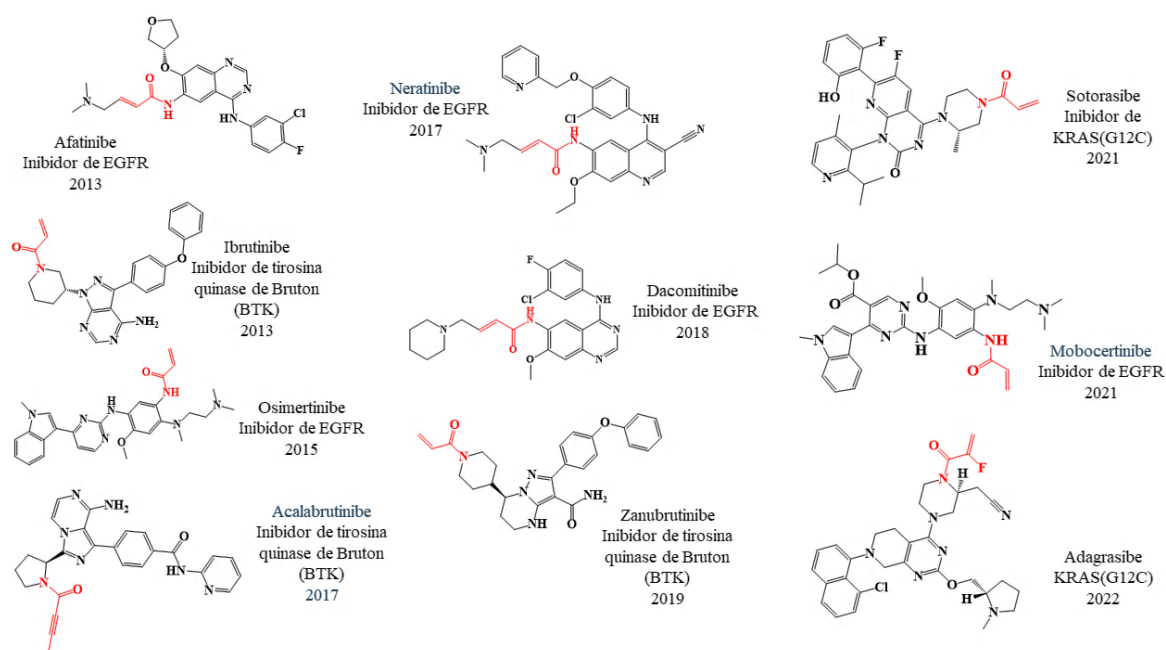


Fonte: BAUER, 2015 (ADAPTADO).

As interações intermoleculares modulam a forma e a complementaridade eletrostática entre o inibidor covalente e o seu alvo biológico, assim como a presença de um grupo eletrofílico na estrutura dos inibidores covalentes (STRELOW, 2017). Esses grupos eletrofílicos são chamados comumente de "*warhead*". Dentre as *warheads* de destaque, a classe dos aceptores de Michael é notável por sua versatilidade, sendo amplamente utilizada no desenvolvimento de compostos com diversas atividades biológicas, tais como antiviral, antibacteriana, anticâncer e anti-inflamatória (YU et al., 2022; NODWELL, et al. 2012; AHN e SOK, 1996; YANG et al., 2023). Na busca por novos inibidores utilizando esta classe química, identificam-se vantagens significativas, tais como a capacidade de formação de ligações covalentes irreversíveis com o receptor biológico, proporcionando uma inibição mais eficiente e duradoura. Além disso, a adaptação para alvos específicos amplia a seletividade, enquanto a habilidade de superar as resistências causadas por mutações destaca-se pela capacidade de ajuste à afinidade de um fármaco por um determinado alvo. Assim, a inibição covalente e os aceptores de Michael têm caminhado juntos, emergindo como uma estratégia válida nas últimas duas décadas. Casos de sucesso na indústria farmacêutica são bastante citados como os

antineoplásicos Afatinibe (2013), Ibrutinibe (2013), Osimertinibe (2015), Acalabrutinibe (2017), Neratinibe (2017), Dacomitinibe (2018), Zanubrutinibe (2019), Sotorasibe (2021), Mobocertinibe (2021) e Adagrasibe (2022) (Figura 11) (HELENA e PAO, 2013; BURGER e BUGGY, 2013; BUTTERWORTH et al., 2017; WU, ZHANG e LIU, 2016; DEEKS, 2017; SHIRLEY, 2018; SYED, 2020; SKOULIDIS et al., 2021; MARKHAM, 2021; DHILLON, 2023).

Figura 11 - Fármacos contendo grupos aceptores de Michael em suas estruturas moleculares.

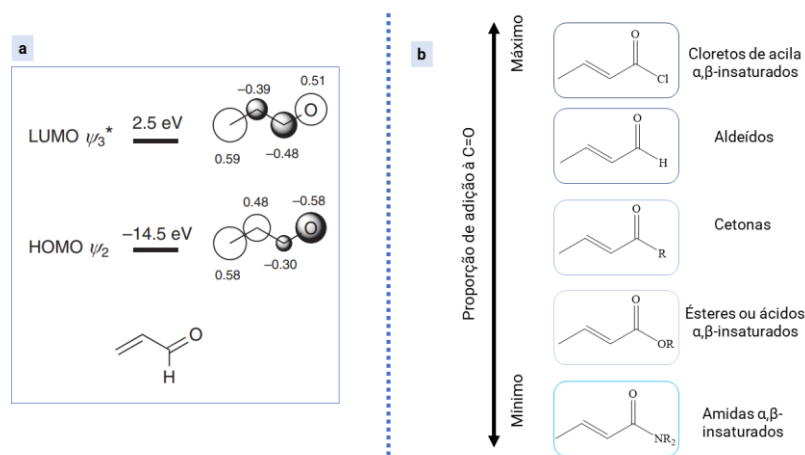


Fonte: AUTORA, 2024.

Os aceptores de Michael possuem uma α,β -insaturação próxima a um grupo retirador de elétrons, abrangendo ésteres acrílicos, metacrilatos alquilados, acrilonitrila, maleimidas, acrilamidas, nitroacrilatos, acrilatos, cloroacetamidas, vinil sulfonas, dentre outros (Figura 12). Em 1887, Arthur Michael foi o primeiro químico orgânico a reportar na literatura reações envolvendo aceptores de Michael em adições nucleofílicas conjugadas (TOKOROYAMA, 2010). Geralmente, a reação de adição de Michael ocorre por meio da adição de um nucleófilo, conhecido como doador de Michael, a uma olefina ativada, o acceptor de Michael (Figura 13). Os doadores de Michael comuns incluem tióis, aminas, álcoois, enolatos/ânions de grupos de metileno ativos, selenóis e fosfinas. Com base na natureza destes nucleófilos, as reações são nomeadas como adição de tiol-Michael, adição de aza-Michael, adição de oxa-Michael, adição

Assim, esta característica indica que a posição β é mais propensa a ataques de nucleófilos macios (polarizáveis) (PEARSON, 1963; HO *et al.*, 2012; HOWELL, 2012). Isto é visualizado em sínteses químicas que envolvem enolatos, carbânions estabilizados por ressonância, reagentes cúpricos, radicais e heteronucleófilos demonstrando uma forte preferência por adição ao carbono β de compostos carbonílicos α,β -insaturados (JOSHI e SINGH, 2022; FERREIRA *et al.*, 2004; HONNANAYAKANAVAR *et al.*, 2022; ZHANG, 2001; ZHAO e YUAN, 2023; HOWELL, 2012). Contudo, a protonação ou coordenação de um ácido de Lewis ao oxigênio da carbonila altera significativamente a distribuição eletrônica, tornando o carbono carbonílico mais eletrofílico (FLEMING, 2011; TRUONG *et al.*, 2018). Outra situação interessante é que a reatividade de compostos carbonílicos α,β -insaturados à adição conjugada na posição β varia dependendo da natureza do grupo carbonila, com amidas, ésteres, cetonas sendo mais suscetíveis do que aldeídos e cloretos de acila α,β -insaturados (Figura 14, esquema (b)) (CLAYDEN, GREEVES e WARREN, 2012). Além disso, a presença de um segundo grupo retirador de elétrons, como em ésteres α,β -insaturados dissustituídos, aumenta consideravelmente a taxa de adição 1,4 conjugada, devido à estabilização do ânion enolato formado e a fatores eletrônicos que favorecem o ataque nucleofílico (MARSHALL e CARROLL, 1965; FLEMING, 2011).

Figura 14 - (a) Energias dos orbitais de fronteira e coeficientes para acroleína; (b) A reatividade de fragmentos α,β -insaturados frente à adição ao grupo carbonílico.

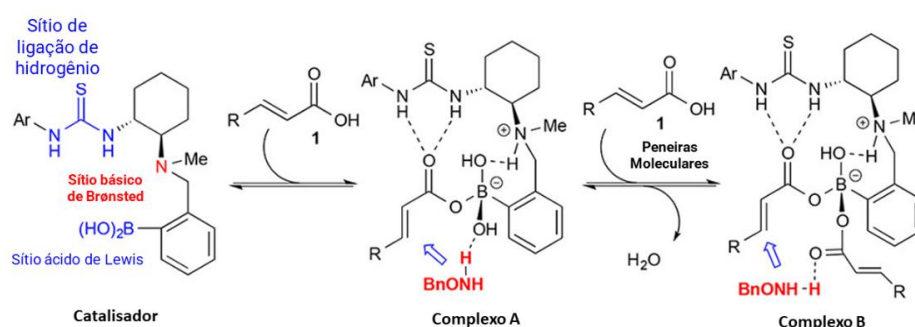


Fonte: FLEMING, 2011; CLAYDEN, GREEVES e WARREN, 2012 (ADAPTADO).

2.6 Aplicações químicas de ácidos acrílicos e seus derivados

Uma das classes de carbonilas α,β -insaturadas conhecida como ácidos acrílicos são abundantemente encontradas na natureza e empregadas em larga escala na indústria. Estudos sugerem que os ácidos acrílicos e seus derivados podem atuar como eletrófilos em catálises assimétricas para fornecer produtos estereosseletivos e com alto rendimento. A exemplo disto, Hayama *et al.* (2018) propôs um catalisador com sistema dual de ácido arilborônico-aminotioureia para a promoção da reação de adição 1,4 sobre o ácido acrílico requerido (Figura 15). Através de interações com ácido borônico e ligações de hidrogênio, o ácido acrílico é desprotonado e forma um complexo onde o íon carboxilato se liga ao boro. Por sua vez, isso facilita o ataque do nucleófilo na posição eletrofílica do ânion carboxilato e resulta em um produto altamente enantiosseletivo após a protonação do enolato. Esta proposta foi aplicada na síntese do fármaco antidiabético Sitagliptina, no qual a reação produziu o composto desejado com 91% de excesso enantiomérico *R*. Como relatado na revisão de Majumdar (2022), em outros trabalhos os fragmentos de ácidos acrílicos presentes em diferentes compostos apenas participam de reações de hidrogenação assimétrica catalítica na transformação da α,β -insaturação para uma ligação simples carbono-carbono.

Figura 15 - Catalisador duplo de ácido arilborônico-aminotioureia para promover a adição de conjugados em ácidos acrílicos insaturados livres.

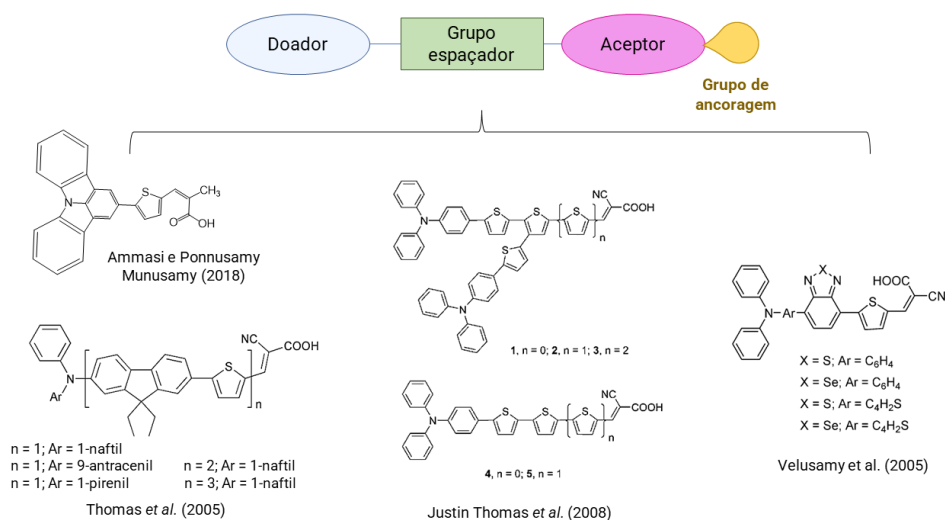


Fonte: HAYAMA *et al.*, 2018 (ADAPTADO).

Além da catálise assimétrica, fragmentos derivados de ácidos acrílicos são comumente empregados no design de complexos orgânicos que atuam como corantes em células solares sensibilizadas, ligando os aceptores de Michael como uma porção doadora de elétrons por um espaçador conjugado para adquirir excelentes eficiência de fotoconversão (Figura 16)

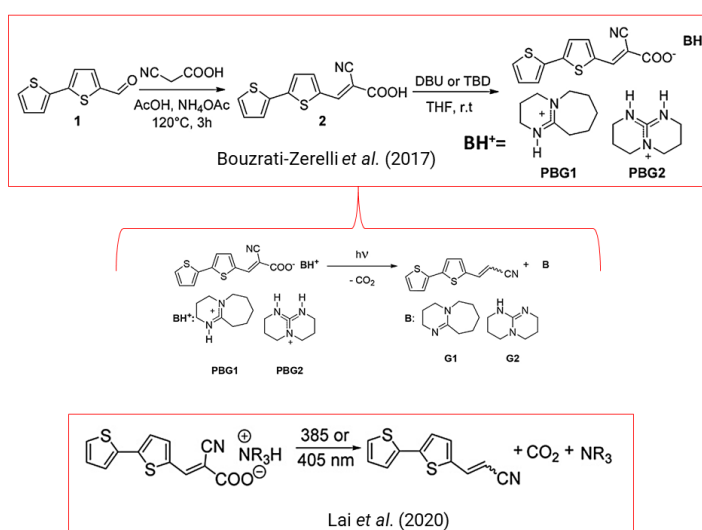
(THOMAS *et al.*, 2005; VELUSAMY *et al.*, 2005; JUSTIN THOMAS *et al.*, 2008; AMMASI e PONNUSAMY MUNUSAMY, 2018). Outra aplicação utilizando ácidos acrílicos são fotorreações para gerar bases orgânicas na regulação de polimerizações como descrito por Bouzrati-Zerelli *et al.* (2017) e também por Lai *et al.* (2020) (Figura 17).

Figura 16 - Design de corantes empregando ácidos 2-cianoacrílicos.



Fonte: AUTORA, 2024 (ADAPTADO).

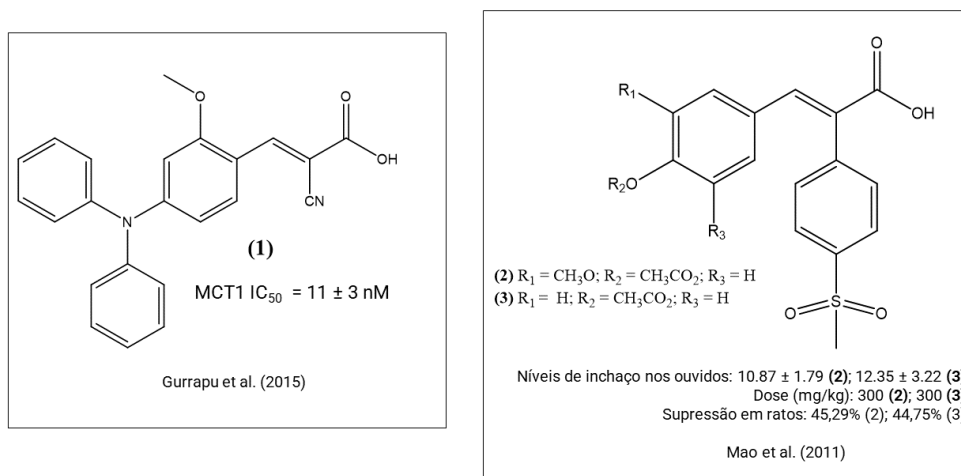
Figura 17 - Fotorreações com participação de derivados de ácidos acrílicos.



Fonte: AUTORA, 2024.

No campo da química medicinal, derivados de ácidos acrílicos demonstram ser uma boa estratégia para a atividade antitumoral e anti-inflamatória. Em um trabalho publicado por Gurrupu *et al.* (2015) foram identificados diversos inibidores de derivados de ácidos acrílicos como potentes inibidores de MCT1 (transportador de monocarboxilato 1) ativos em concentrações nanomolares e sem efeitos colaterais graves em estudos *in vivo*. Dentre os compostos baseados no modelo de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, o composto **(1)** apresentou atividade antitumoral como monoterapia em modelo animal de adenocarcinoma colorretal (Figura 18). Um outro trabalho publicado por Mao *et al.* (2011), uma série de derivados de ácido acrílico 4-hidroxibenzeno foram planejados e sintetizados com base no ácido ferúlico. Os compostos **(2)** e **(3)** tiveram atividade anti-inflamatória significativa sem causar danos ao coração, com taxas de supressão de 45,29% e 44,75% respectivamente (Figura 18), em comparação com a Indometacina.

Figura 18 - Compostos com atividades anticâncer e anti-inflamatória.

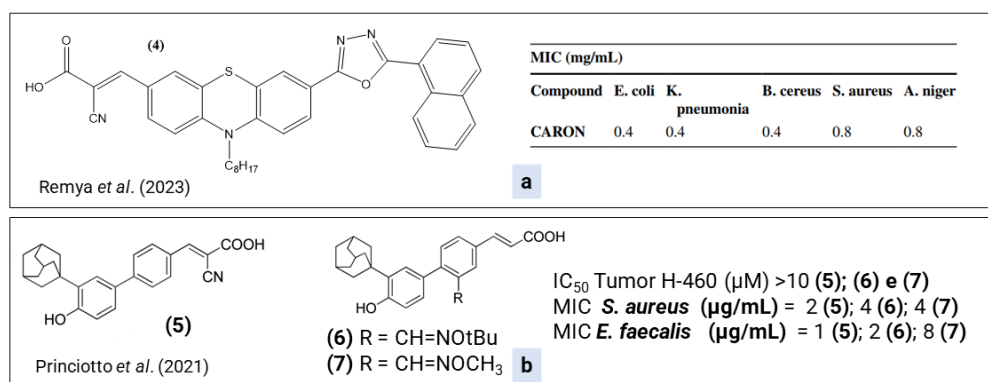


Fonte: AUTORA, 2024.

Comparativamente, outros compostos contendo em sua estrutura porções de ácidos acrílicos, também apresentam atividade antimicrobiana. A título de exemplo, no estudo recente de Remya *et al.* (2023) foi relatado que a molécula **(4)** foi capaz de inibir a cepa bacteriana *Klebsiella pneumonia* e a cepa antifúngica *Aspergillus niger*, sendo a atividade atribuída à presença do grupo ácido cianoacrílico (Figura 19, esquema (a)). Enquanto Princiotta *et al.* (2021) descobriu que o arcabouço molecular do adaroteno pode ser explorado para o desenvolvimento de novos antibióticos eficazes contra bactérias resistentes. Os compostos **(5-**

7), em particular, mostraram excelente atividade contra bactérias *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (Figura 19, esquema (b)). Juntamente com o formato da molécula, a presença de grupos hidroxila e carboxila são cruciais para a atividade. Estudos de RMN indicam que esses retinoides interagem com a membrana bacteriana.

Figura 19 - Compostos ativos frente as cepas de *Klebsiella pneumonia*, *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.



Fonte: AUTORA, 2024.

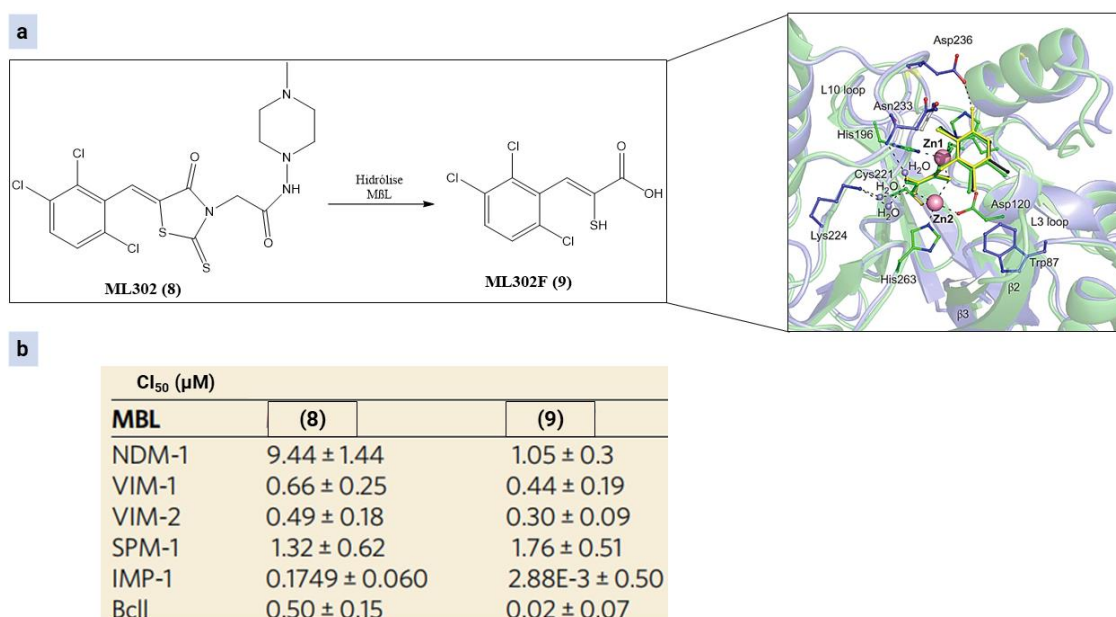
2.7 Justificativa para a execução da pesquisa

Em um trabalho realizado por Brem *et al.* (2014), um inibidor à base de rodanina ML302 (**8**), teve seu mecanismo de inibição da MβL VIM-2 estudado por meio de análises cristalográficas, que revelaram que o anel de rodanina sofre hidrólise para gerar um tioenolato (ou ácido (Z)-2-mercapto-3-(2,3,6-triclorofenil)acrílico) ML302F (**9**). Os estudos de cristalografia demonstram que o composto (**9**) se liga aos íons de zinco no sítio ativo da MβL, formando um complexo estável em que mimetiza a ligação de intermediários na hidrólise de anéis β-lactâmicos (Figura 20, esquema (a)). Também foi observado um complexo ternário entre a MβL VIM-2, composto (**8**) intacto e composto (**9**), mas não sendo necessário a inibição da atividade enzimática.

A combinação de dados cristalográficos, estudos cinéticos e biofísicos, incluindo RMN de ¹⁹F, apontam para o tioenolato de rodanina (**9**) como um potente inibidor de uma ampla variedade de MβLs. Os valores de CI₅₀ revelaram que a molécula (**9**) inibiu as MβLs IMP-1 e BcII com uma eficiência até 50 vezes maior em comparação com ML302 (Figura 20, esquema (b)). Enquanto para as MβLs NDM-1, VIM-1 e VIM-2, as diferenças de inibição entre os

compostos **(8)** e **(9)** foram de aproximadamente 9; 1,5; e 1,6 vezes, respectivamente (Figura 20, esquema (b)). A MβL SPM-1 foi a única exceção, mostrando inibição similar para ambos os compostos, sendo $1,32 \pm 0,62 \mu\text{M}$ para composto **(8)** versus $1,76 \pm 0,51 \mu\text{M}$ para composto **(9)** (Figura 20, esquema (b)). A concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ do composto **(9)** foi capaz de reverter a resistência ao Meropenem em cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de IMP-1. No entanto, para alcançar a sensibilidade clínica, foram necessárias concentrações substancialmente mais altas em comparação ao composto **(8)**. Em cepas produtoras de VIM-4 e NDM-1, o composto **(9)** demonstrou atividade inibitória, mas não foi eficaz em restaurar a susceptibilidade ao antibiótico, mesmo na dose máxima de $100 \mu\text{g/mL}$ testada.

Figura 20 - (a) Hidrólise do inibidor a base de rodanina **(8)** no sítio ativo de MβLs para gerar o ácido 2-mercaptoacrílico derivado **(9)**; (b) Tabela com valores de CI_{50} dos compostos **(8)** e **(9)** contras diferentes MβLs.

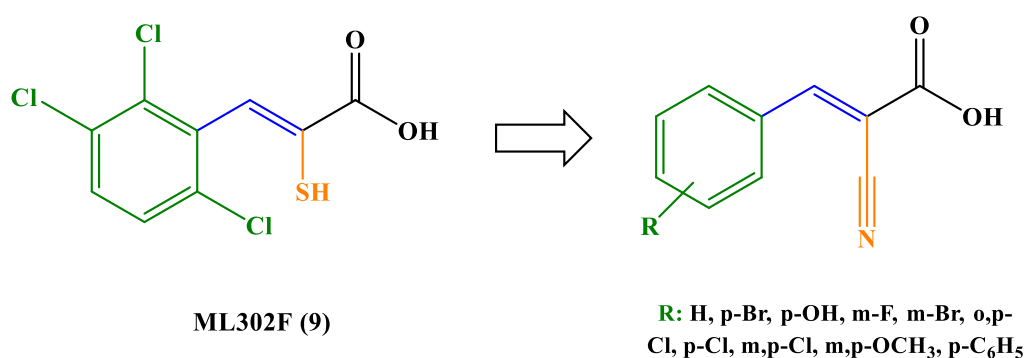


Fonte: BREM *et al.*, 2014 (ADAPTADO).

Com a intuito de desenvolver e identificar compostos mais potentes em comparação ao composto **(9)**, propusemos a síntese de dez derivados de ácidos acrílicos. Para isto, o presente trabalho tem pretensão em utilizar o fragmento do ácido 2-cianoacrílico ligado ao anel benzênico substituído com grupos doadores e retiradores de densidade eletrônica (Figura 21) para investigar a inibição da atividade das serina e metalo-β-lactamases, explorando a possibilidade de combinar os ácidos acrílicos com antibióticos β-lactâmicos para aumentar a

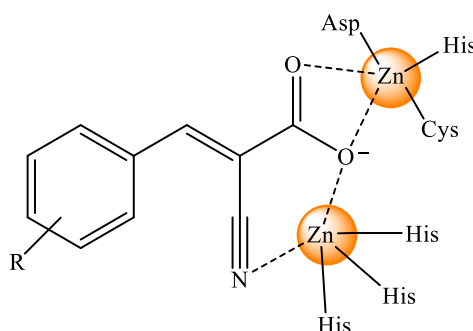
eficácia do tratamento e retardar o surgimento de resistência. Além disso, a nossa primeira hipótese a ser verificada é a inibição enzimática pelo modo de ligação dos ácidos acrílicos planejados aos sítios ativos das MβLs, com a expectativa de que formem pontes com os íons de Zn^{2+} através da coordenação aos oxigênios do grupo ácido carboxílico e ao nitrogênio do grupo ciano presentes nas moléculas (Figura 22). Essas moléculas análogas aos produtos de hidrólise de antibióticos β-lactâmicos podem se comportar como espécies aniônicas, permitindo que os centros metálicos de zinco atuem como ácidos de Lewis ao receber pares de elétrons dos átomos de oxigênio e de nitrogênio dos grupos funcionais mencionados.

Figura 21 - Planejamento estrutural dos novos derivados de ácidos acrílicos.



Fonte: AUTORA, 2024.

Figura 22 - Modo genérico de ligações com os íons de Zn^{2+} das MβLs.

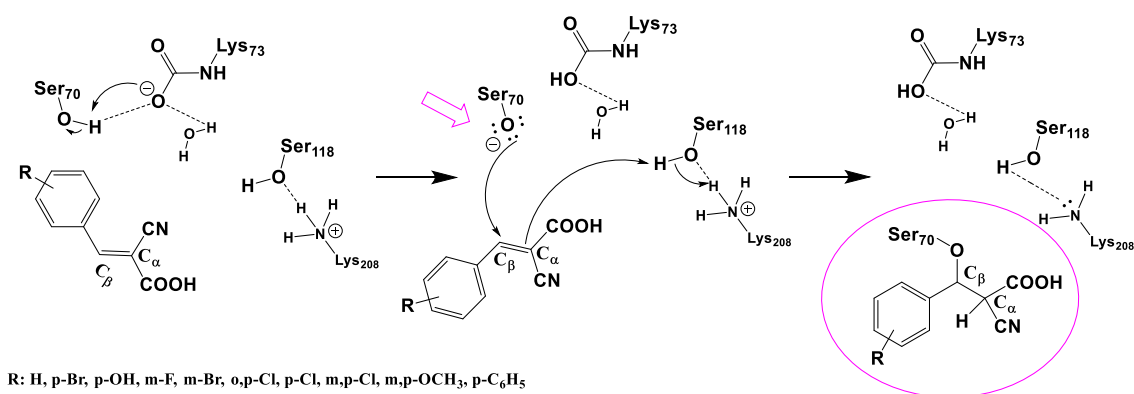


R: H, p-Br, p-OH, m-F, m-Br, o,p-Cl, p-Cl, m,p-Cl, m,p-OCH₃, p-C₆H₅

Fonte: AUTORA, 2024.

Por fim, a nossa segunda hipótese é baseada no fato de que o oxigênio dos resíduos de serina das SβLs podem atuar como nucleófilo, possuindo o potencial de atacar o carbono eletrofílico dos inibidores planejados (Figura 23). Desse modo, espera-se como resultado a formação de ligação covalente com os ácidos 2-cianoacrílicos e inibição da atividade enzimática e, por conseguinte, o sinergismo com antibióticos. Em teoria os aceptores de Michael são capazes de se envolver em reações de adição 1,2 conjugadas e adição 1,4 conjugadas, isto é, reação de adição direta ao grupo carbonílico e reação de adição de nucleófilos a sistemas insaturados conjugados a grupos eletronegativos. A combinação desses grupos no sistema conjugado pode modular a reatividade de modo seletivo, além das condições da reação e do tipo do nucleófilo. Mesmo tendo vista que o orbital molecular de menor energia desocupada (LUMO) possui maior coeficiente no carbono β e que nucleófilos difusos (macios) são mais propensos a atacar nesse sítio, as moléculas planejadas na referida pesquisa contêm a presença de dois grupos ativadores como o ácido carboxílico e o ciano no acceptor conjugado, acredita-se que estes exerçam um efeito cooperativo para aumentar significativamente a reatividade do sistema em relação a nucleófilo de serina.

Figura 23 - Mecanismo genérico de inibição de serino-β-Lactamase.



Fonte: AUTORA, 2024.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Planejar, sintetizar e caracterizar estruturalmente derivados de ácidos 2-cianoacrílicos análogos ao ML302F.

3.2 Objetivos específicos

- Promover a síntese química na formação dos ácidos 2-cianoacrílicos;
- Determinar propriedades físico-químicas dos compostos, tais como ponto de fusão (PF), fator de retenção (RF), tempo de retenção e grau de pureza em cromatografia líquida;
- Caracterizar estruturalmente todos os intermediários e compostos finais por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN - ^1H) e carbono treze (RMN - ^{13}C) unidimensionais;
- Caracterizar estruturalmente todos os intermediários e compostos finais por meio da técnica de espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS);
- Avaliar parâmetros físico-químicos seguindo os critérios das regras de Lipinski e de Veber.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais utilizados

4.1.1 Cromatografia

As análises das cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de Sílica Gel 60 F₂₅₄ da MERCK® de 0,20 mm de espessura com suporte de alumínio. A visualização destas e a interpretação dos resultados foi realizada através da luz emissora de radiação ultravioleta (UV) no comprimento de onda (λ) de 254 nm.

4.1.2 Ponto de fusão

Os pontos de fusão foram determinados utilizando o equipamento MICROQUÍMICA®, modelo MQAPF-302 Digital, em tubos capilares contendo cada amostra individualmente, sem calibração.

4.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por cromatografia líquida de alta pressão (do inglês *High performance liquid chromatography*, HPLC) foram realizadas em sistema UFLC Shimadzu® do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), cujo modelo é LC-20AD. O aparelho possui detector de ultravioleta (UV) em 205 nm, com coluna Phenomenex® C18 150x46 mm. A fase móvel foi composta por um sistema binário, utilizando os solventes acetonitrila e metanol. O solvente acetonitrila teve a proporção aumentada de 20 até 80% durante 10 minutos, sendo deixado nessas condições por mais 10 minutos. Todos os solventes utilizados têm grau HPLC de pureza.

4.1.4 Espectroscopia RMN ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos por meio dos equipamentos *Bruker*[®], modelo *Avance DRX 400 MHz – UltraShield*[®] e modelo *Avance DRX 600 MHz – UltraShield*[®], do Núcleo de Análises e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear (NAPRMN) – IQB/UFAL. Para as análises foi utilizado DMSO- d_6 como solvente deuterado. Os deslocamentos químicos (δ) foram computados em partes por milhão (ppm), onde foi empregado tetrametilsilano (TMS) o solvente DMSO- d_6 como referência interna. As constantes de acoplamento (J) característicos aos sinais de RMN de ^1H foram computadas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram estabelecidas da seguinte forma: simpleto (*s*), simpleto largo (*sl*), duplete (*d*), duplo duplete (*dd*), tripleto (*t*), quarteto (*q*), quinteto (*qi*), sexteto (*sex*), septeto (*sep*), e multiplete (*m*) triplo duplete (*td*); duplo-duplo duplete (*ddd*) e duplo tripleto (*dt*).

4.1.5 Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS)

Os espectros de massas dos compostos intermediários e finais foram registrados em sistema UHPLC ACQUITY Arc detector de massas QDa acoplado à cromatografia líquida de alta eficiência localizados na Central Analítica do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do NUPIT (Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica)/UFPE. Para as análises foi utilizado tanto o método de ionização por electrospray no modo de detecção positivo quanto no modo de detecção negativo, utilizando como fase móvel água em ácido fórmico 0,1% (v/v) e acetonitrila em ácido fórmico 0,1% (v/v).

4.1.6 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados nas sínteses foram do fabricante *Sigma-Aldrich* com grau de pureza >98%. Os solventes utilizados foram padrão P.A. (Para Análise) dos fabricantes *Neon*, *Qhemis*, *Êxodo científica* e *Sigma-Aldrich*.

4.2 Cálculos para a validação da regra de Lipinski e Veber

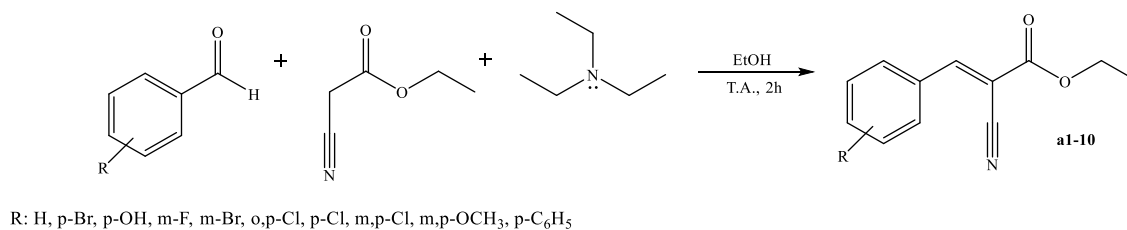
Os parâmetros farmacocinéticos *in silico* foram realizados para os compostos derivados de ácidos 2-cianoacrílicos. As análises de druglikeness foram realizadas utilizando como ferramenta o servidor SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) (DAINA *et al.*, 2017), no qual obteve-se medidas avaliativas conforme a Regra de Lipinski, que estabelece: massa molecular inferior ou igual a 500 g/mol, LogP menor ou igual a 5, menor ou igual a 5 átomos doadores de ligações de hidrogênio (DLH) e menor ou igual a 10 átomos aceptores de ligações de hidrogênio (ALH). Também foram adquiridos os parâmetros de Veber, que incluem a presença de menos de 10 ligações rotativas (LR) e uma área de superfície polar topológica (TPSA) inferior a 140 Å. Em adição, foram obtidos parâmetros de distribuição e absorção para as moléculas.

4.3 Procedimentos reacionais

4.3.1 Método geral para a obtenção dos acrilatos de etila (**a1-10**)

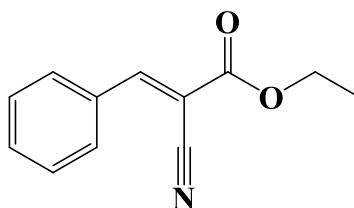
Os acrilatos de etila derivados foram utilizados como precursores para a síntese da série dos ácidos 2-cianoacrílicos, obtidos por meio da versátil condensação de Knoevenagel (KNOEVENAGEL, 1894; VAN BEURDEN *et al.*, 2020; PAWAR *et al.*, 2016; JIMENEZ *et al.*, 2019; POURSHOJAEI *et al.*, 2019).

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 1,0 mmol do correspondente aldeído em 10 mL de etanol absoluto, sob agitação à temperatura ambiente até a completa solubilização. Em seguida, foi adicionado lentamente a esta solução 1,1 equivalente da base trietilamina (Et₃N). Logo após, 1,1 mmol de cianoacetato de etila foi adicionado à solução de forma gradual e a reação foi mantida sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, o sistema reacional foi resfriado a 0°C durante 24h, resultando na formação de precipitados. Por fim, os sólidos requeridos foram então filtrados, lavados com etanol gelado e secos a vácuo (Figura 24).

Figura 24 - Método para a obtenção dos acrilatos de etila.

Fonte: AUTORA, 2024.

4.3.1.1 Dados físico-químicos do composto (*E*)-2-ciano-3-fenilacrilato de etila (**a1**)



Aspecto: Sólidos brancos; MM: 201,2250 g/mol; rendimento: 53,59%; PF: 59,6-60°C; RF: 0,76(Hex/AcOEt 9:1).

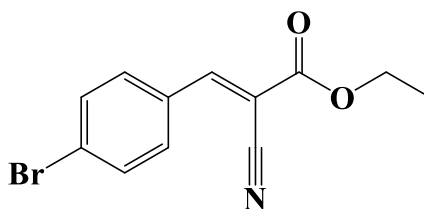
RMN ¹H (400 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ = 1.30 (t, 3H, *J* = 7.10 Hz, CH₃); 4.31 (q, 2H, *J* = 7.11 Hz, CH₂); 7.56-7.66 (m, 3H, CH ar); 8.05 (dd, 2H, *J* = 2.93 Hz e 7.12 Hz, CH ar); 8.40 (s, 1H, CH=C).

RMN ¹³C (100 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ = 14.01 (CH₃); 62.43 (CH₂); 102.64 (Cq); 115.64 (CN); 129.37 (C ar); 130.83 (C ar); 131.38 (C ar); 133.45 (C ar); 155.15 (CH=C); 161.83 (C=O).

HMRS ESI- (*m/z*): calculado para (C₇H₁₀NO₂): 201.23; encontrado ([M-H]⁻): 200.20.

(Anexo A)

4.3.1.2 Dados físico-químicos do composto (*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilato de etila (**a2**)



Aspecto: Sólidos brancos; MM: 280,1210 g/mol; rendimento: 78,22%; PF: 109-110°C; RF: 0,64(Hex/AcOEt 9:1).

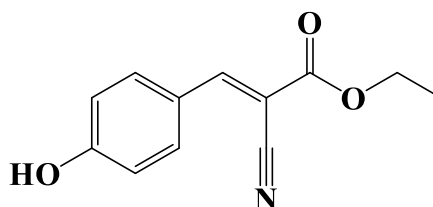
RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.30 (t, 3H, J = 7.11 Hz, CH_3); 4.31 (q, 2H, J = 7.10 Hz, CH_2); 7.81 (d, 2H, J = 8.5 Hz, CH ar); 7.97 (d, 2H, J = 8.5 Hz, CH ar); 8.38 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 13.98 (CH_3); 62.49 (CH_2); 103.32 (Cq); 115.44 (CN); 127.22 (C ar); 130.55 (C ar); 132.45 (C ar); 132.50 (C ar); 153.86 ($\text{CH}=\text{C}$); 161.64 (C=O).

HMRS ESI+ (m/z): calculado para ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{BrNO}_3$): 299.12; encontrado ($[\text{M}+\text{H}+\text{H}_2\text{O}]^+$): 298.30.

(Anexo B)

4.3.1.3 Dados físico-químicos do composto (*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxifenil)acrilato de etila (**a3**)



Aspecto: Sólidos amarelos; MM: 217,2240 g/mol; rendimento: 79,29%; PF: 178-179°C; RF: 0,52(Hex/AcOEt 7:3).

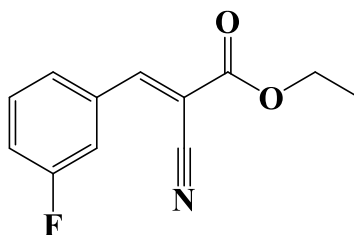
RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.28 (t, 3H, J = 7.11 Hz, CH_3); 4.27 (q, 2H, J = 7.10 Hz, CH_2); 6.94 (d, 2H, J = 8.76 Hz, CH ar); 7.99 (d, 2H, J = 8.82 Hz, CH ar); 8.22 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 14.05 (CH_3); 61.96 (CH_2); 97.07 (C_q); 116.40 (CN); 116.48 (C ar); 122.52 (C ar); 133.99 (C ar); 154.69 (CH=C); 162.62 (C ar); 162.93 (C=O).

HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_3$): 217.22; encontrado ($[\text{M-H}]^-$): 216.10.

(Anexo C)

4.3.1.4 Dados físico-químicos do composto (*E*)-2-ciano-3-(3-fluorofenil)acrilato de etila (**a4**)



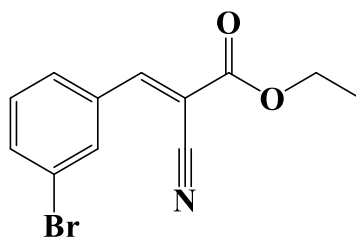
Aspecto: Sólidos brancos; MM: 219,2154 g/mol; rendimento: 50,26%; PF: 103,5-104°C; RF: 0,68(Hex/AcOEt 9:1).

RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.30 (t, 3H, J = 7.11 Hz, CH_3); 4.32 (q, 2H, J = 7.10 Hz, CH_2); 7.50 (td, 1H, J = 8.38 Hz e 2.31 Hz, CH ar), 7.64 (dt, 1H, J = 9.85 Hz e 6.08 Hz, CH ar); 7.86 (dt, 1H, J = 10.21 Hz e 3.64 Hz, CH ar); 7.90 (d, 1H, J = 7.82 Hz, CH ar); 8.42 (s, 1H, CH=C).

RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 13.96 (CH_3); 62.56 (CH_2); 104.29 (C_q); 115.29 (CN); 116.94 (C ar); 117.09 (C ar); 120.01 (C ar); 120.15 (C ar); 126.84 (C ar); 126.86 (C ar); 131.43 (C ar); 131.49 (C ar); 133.49 (C ar); 133.55 (C ar); 153.61 (CH=C); 161.17 (C ar); 161.47 (C ar); 162.79 (C=O).

HMRS ESI+ (m/z): calculado para ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{FNO}_2\text{K}_2$): 298.22; encontrado ($[\text{M}+\text{H}+2\text{K}]^+$): 297.20.

(Anexo D)

4.3.1.5 Dados físico-químicos do composto (*E*)-3-(3-bromofenil)-2-cianoacrilato de etila (**a5**)

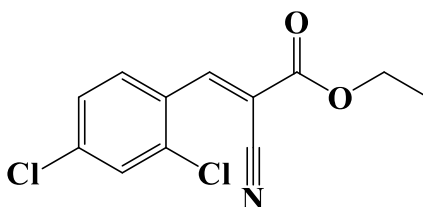
Aspecto: Sólidos brancos; MM: 280,1210 g/mol; rendimento: 85,01%; PF: 106-108°C; RF: 0,60(Hex/AcOEt 9:1).

RMN ^1H (600 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.30 (t, 3H, J = 7.11 Hz, CH_3); 4.32 (q, 2H, J = 7.10 Hz, CH_2); 7.55 (t, 1H, J = 7.94 Hz, CH ar); 7.83 (dt, 1H, J = 7.35 Hz, 1.09 Hz e 0.69 Hz, CH ar); 8.05 (d, 1H, J = 7.92 Hz, CH ar); 8.23 (t, 1H, J = 1.66 Hz, CH ar); 8.40 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (150 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 13.96 (CH_3); 62.55 (CH_2); 104.35 (Cq); 115.24 (CN); 122.29 (C ar); 129.32 (C ar); 131.34 (C ar); 133.09 (C ar); 133.62 (C ar); 135.63 (C ar); 153.38 ($\text{CH}=\text{C}$); 161.42 (C=O).

HMRS ESI $^+$ (m/z): calculado para ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{BrNO}_3$): 299.12; encontrado ($[\text{M}+\text{H}+\text{H}_2\text{O}]^+$): 297.20.

(Anexo E)

4.3.1.6 Dados físico-químicos do composto (*E*)-2-ciano-3-(2,4-diclorofenil)acrilato de etila (**a6**)

Aspecto: Sólidos brancos; MM: 270,1090 g/mol; rendimento: 67,42%; PF: 102-103°C; RF: 0,87 (Hex/AcOEt 9:1).

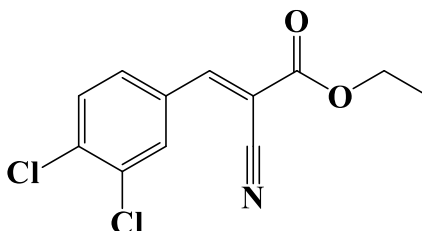
RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.30 (t, 3H, J = 7.10 Hz, CH_3); 4.34 (q, 2H, J = 7.11 Hz, CH_2); 7.69 (dd, 1H, J = 2.03 Hz, 1.56 Hz e 0.35 Hz, CH ar); 7.90 (d, 1H, J = 2.11 Hz, CH ar); 8.10 (d, 1H, J = 8.55 Hz, CH ar); 8.45 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 13.92 (CH_3); 62.80 (CH_2); 107.20 (Cq); 114.53 (CN); 128.28 (C ar); 128.64 (C ar); 129.93 (C ar); 130.91 (C ar); 135.78 (C ar); 137.99 (C ar); 149.48 ($\text{CH}=\text{C}$); 161.00 (C=O).

HMRS ESI+ (m/z): calculado para ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$): 312.11; encontrado ($[\text{M}+\text{H}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$): 311.10.

(Anexo F)

4.3.1.7 Dados físico-químicos do composto (*E*)-2-ciano-3-(3,4-diclorofenil)acrilato de etila (a7)



Aspecto: Sólidos brancos; MM: 270,1090 g/mol; rendimento: 79,72%; PF: 160-162°C; RF: 0,82 (Hex/AcOEt 9:1).

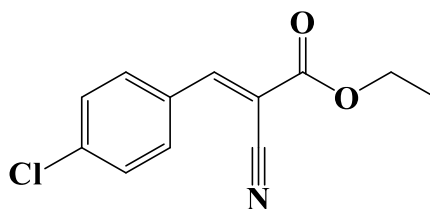
RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.30 (t, 3H, J = 7.10 Hz, CH_3); 4.32 (q, 2H, J = 7.10 Hz, CH_2); 7.88 (d, 1H, J = 8.48 Hz, CH ar); 8.04 (dd, 1H, J = 10.96 Hz, 8.39 Hz, 2.19 Hz e 1.89 Hz, CH ar); 8.27 (d, 1H, J = 2.10 Hz, CH ar); 8.41 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 13.95 (CH_3); 62.61 (CH_2); 104.70 (Cq); 115.15 (CN); 129.97 (C ar); 131.52 (C ar); 131.92 (C ar); 132.03 (C ar); 132.61 (C ar); 135.61 (C ar); 152.32 ($\text{CH}=\text{C}$); 161.62 (C=O).

HMRS ESI+ (m/z): calculado para ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{Na}$): 294.11; encontrado ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^+$): 295.00.

(Anexo G)

4.3.1.8 Dados físico-químicos do composto (*E*)-3-(4-clorofenil)-2-cianoacrilato de etila (**a8**)



Aspecto: Sólidos brancos; MM: 235,6670 g/mol; rendimento: 74,82%; PF: 116-117°C; RF: 0,77 (Hex/AcOEt 9:1).

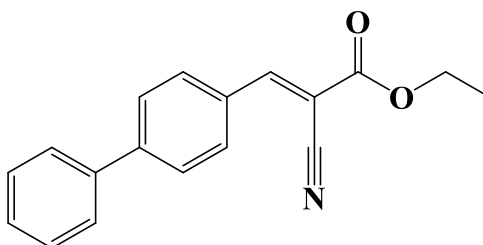
RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.30 (t, 3H, J = 7.10 Hz, CH_3); 4.32 (q, 2H, J = 7.10 Hz, CH_2); 7.68 (d, 2H, J = 8.62 Hz, CH ar); 8.06 (d, 2H, J = 8.62 Hz, CH ar); 8.41 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 13.98 (CH_3); 62.47 (CH_2); 103.24 (Cq); 115.44 (CN); 129.50 (C ar); 130.24 (C ar); 132.46 (C ar); 138.02 (C ar); 153.71 ($\text{CH}=\text{C}$); 161.63 (C=O).

HMRS ESI+ (m/z): calculado para ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{Na}$): 300.67; encontrado ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$): 297.10.

(Anexo H)

4.3.1.9 Dados físico-químicos do composto (*E*)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-cianoacrilato de etila (**a9**)



Aspecto: Sólidos amarelos claros; MM: 277,3230 g/mol; rendimento: 92,32%; PF: 177-178°C; RF: 0,72 (Hex/AcOEt 9:1).

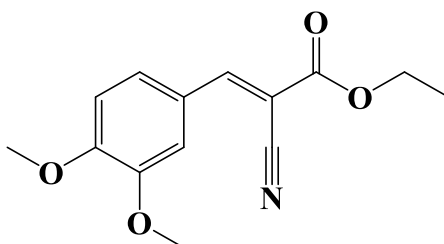
RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.31 (t, 3H, J = 7.10 Hz, CH_3); 4.32 (q, 2H, J = 7.10 Hz, CH_2); 7.44 (tt, 1H, J = 4.55 Hz, 2.63 Hz e 1.21 Hz, CH ar); 7.51 (t, 2H, J = 7.38 Hz, CH ar); 7.78 (d, 2H, J = 7.11 Hz, CH ar); 7.91 (d, 2H, J = 8.47 Hz, CH ar); 8.16 (d, 2H, J = 8.41 Hz, CH ar); 8.43 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 14.00 (CH_3); 62.37 (CH_2); 101.93 (Cq); 115.81 (CN); 127.01 (C ar); 127.38 (C ar); 128.69 (C ar); 129.15 (C ar); 130.35 (C ar); 131.62 (C ar); 138.48 (C ar); 144.70 (C ar); 154.46 ($\text{CH}=\text{C}$); 161.92 (C=O).

HMRS ESI+ (m/z): calculado para ($\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{NO}_3$): 295.32; encontrado ($[\text{M}+\text{H}+\text{H}_2\text{O}]^+$): 297.10.

(Anexo I)

4.3.1.10 Dados físico-químicos do composto (*E*)-2-ciano-3-(3,4-dimetoxifenil)acrilato de etila (a10)



Aspecto: Sólidos amarelos claros; MM: 261,2770 g/mol; rendimento: 93,01%; PF: 179-180°C; RF: 0,45 (Hex/AcOEt 9:1).

RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 1.29 (t, 3H, J = 7.06 Hz, CH_3); 3.80 (s, 3H, OCH_3); 3.87 (s, 3H, OCH_3); 4.30 (q, 2H, J = 7.06 Hz, CH_2); 7.18 (d, 1H, J = 8.42 Hz, CH ar); 7.75 (t, 2H, J = 7.13 Hz, CH ar); 8.30 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 14.06 (CH_3); 55.51 (OCH_3); 55.93 (OCH_3); 62.09 (CH_2); 98.47 (Cq); 111.92 (CN); 112.98 (C ar); 116.43 (C ar); 124.01 (C ar); 126.77 (C ar); 148.70 (C ar); 153.53 (C ar); 154.85 ($\text{CH}=\text{C}$); 162.41 (C=O).

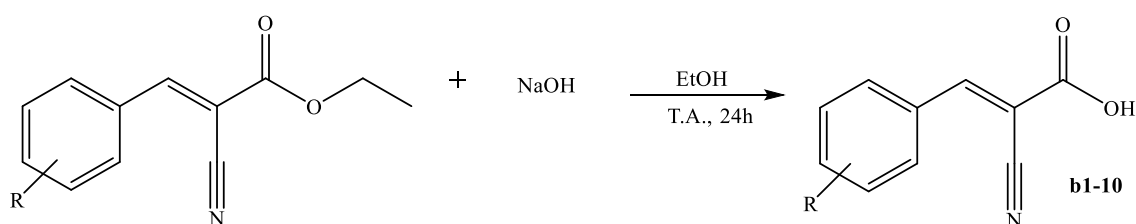
HMRS ESI+ (m/z): calculado para ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_4$): 261.28; encontrado ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 262.00.

(Anexo J)

4.3.2 Método para a obtenção dos ácidos 2-cianoacrílicos (**b1-10**)

Inicialmente, em um balão de fundo redondo dissolveu-se 3 equivalentes de NaOH em 5 mL de etanol sob agitação à temperatura ambiente. Após a completa solubilização da base, adicionou-se 1 equivalente do ciano éster correspondente à solução. Após 24 horas, o término da reação foi verificado por CCD e foi observado a formação de precipitados. Em seguida, o solvente foi completamente destilado sob pressão reduzida. Posteriormente, foram adicionadas 40 gotas de HCl 1M de modo a observar turbidez na solução aquosa. O pH foi verificado após acidificação, indicando cerca de 3 na escala de potencial hidrogeniônico. Depois foi adicionado 3 mL de H₂O destilada à solução e a deixou na temperatura de 0 °C durante 24h. Os sólidos formados foram filtrados, lavados com água gelada destilada e secos à vácuo (Figura 25).

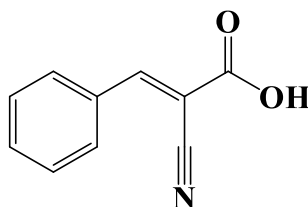
Figura 25 - Método para a obtenção dos ácidos 2-cianoacrílicos.



R: H, p-Br, p-OH, m-F, m-Br, o,p-Cl, p-Cl, m,p-Cl, m,p-OCH₃, p-C₆H₅

Fonte: AUTORA, 2024.

4.3.2.1 Dados físico-químicos do composto Ácido (*E*)-2-ciano-3-fenilacrílico (**b1**)



Aspecto: Sólidos amarelos claros; MM: 173,1710 g/mol; rendimento: 74,60%; PF: 213-215 °C; RF: 0,6(AcOEt/MeOH 8:2).

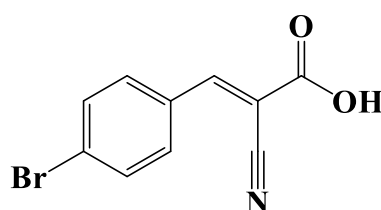
RMN ¹H (400 MHz, ppm, DMSO-*d*₆): δ = 7.55-7.64 (m, 3H, CH ar); 8.03 (dd, 2H, *J* = 6.91 Hz e 9.37 Hz, CH ar); 8.34 (s, 1H, CH=C).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 103.84 (Cq); 116.11 (CN); 129.34 (C ar); 130.67 (C ar); 131.56 (C ar); 133.18 (C ar); 154.52 ($\text{CH}=\text{C}$); 163.28 (C=O).

HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_2$): 173.17; encontrado ($[\text{M}-\text{H}]^-$): 172.20.

(Anexo K)

4.3.2.2 Dados físico-químicos do composto Ácido (*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrílico (**b2**)



Aspecto: Sólidos amarelos claros; MM: 252,0670 g/mol; rendimento: 90,02%; PF: 258-260°C; RF: 0,48 (AcOEt/MeOH 8:2).

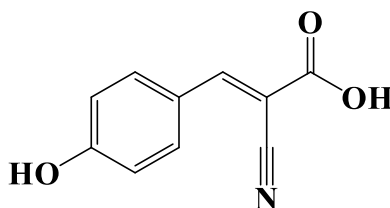
RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 7.80 (d, 2H, J = 8.57 Hz, CH ar); 7.95 (d, 2H, J = 8.59 Hz, CH ar); 8.32 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 104.57 (Cq); 115.92 (CN); 126.89 (C ar); 130.75 (C ar); 132.37 (C ar); 132.42 (C ar); 153.23 ($\text{CH}=\text{C}$); 163.10 (C=O).

HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{10}\text{H}_6\text{BrNO}_2$): 252.06; encontrado ($[\text{M}-\text{H}]^-$): 251.20.

(Anexo L)

4.3.2.3 Dados físico-químicos do composto Ácido (*E*)-2-ciano-3-(4-hidroxifenil)acrílico (**b3**)



Aspecto: Sólidos amarelos; MM: 189,1700 g/mol; rendimento: 67,98%; PF: 260-262°C; RF: 0,72(AcOEt/MeOH 8:2).

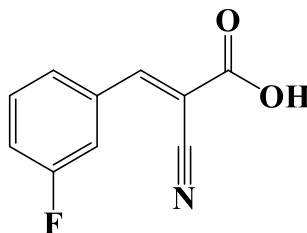
RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 6.93 (d, 2H, J = 8.78 Hz, CH ar); 7.96 (d, 2H, J = 8.83 Hz, CH ar); 8.18 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$); 10.75 (s, 1H, OH).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 98.32 (Cq); 116.34 (CN); 116.92 (C ar); 122.66 (C ar); 133.72 (C ar); 154.16 ($\text{CH}=\text{C}$); 162.59 (C ar); 164.04 (C=O).

HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3$): 189.17; encontrado ($[\text{M}-\text{H}]^-$): 188.20.

(Anexo M)

4.3.2.4 Dados físico-químicos do composto Ácido (*E*)-2-ciano-3-(3-fluorofenil)acrílico (**b4**)



Aspecto: Sólidos amarelos claros; MM: 191,1614 g/mol; rendimento: 72,24%; PF: 279-281°C; RF: 0,46(AcOEt/MeOH 8:2).

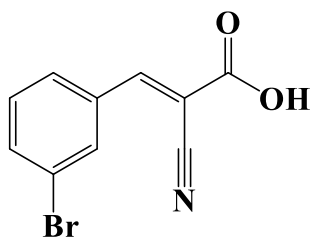
RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 7.40 (td, 1H, J = 8.46 Hz e 2.12 Hz, CH ar), 7.59 (dt, 1H, J = 9.94 Hz e 6.43 Hz, CH ar); 7.79 (dd, 2H, J = 5.40 Hz e 2.24 Hz, CH ar); 8.15 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 110.30 (Cq); 116.06 (C ar); 116.29 (C ar); 117.32 (CN); 118.55 (C ar); 118.76 (C ar); 126.18 (C ar); 126.21 (C ar); 131.19 (C ar); 131.27 (C ar); 134.66 (C ar); 134.73 (C ar); 149.40 ($\text{CH}=\text{C}$); 160.86 (C ar); 162.83 (C ar); 163.29 (C=O).

HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{10}\text{H}_6\text{FNO}_2\text{Na}$): 214.16; encontrado ($[\text{M}-\text{H}+\text{Na}]^-$): 214.10.

(Anexo N)

4.3.2.5 Dados físico-químicos do composto Ácido (*E*)-3-(3-bromofenil)-2-cianoacrílico (**b5**)



Aspecto: Sólidos amarelos claros; MM: 252,0670 g/mol; rendimento: 46,01%; PF: 226-228°C; RF: 0,48(AcOEt/MeOH 8:2).

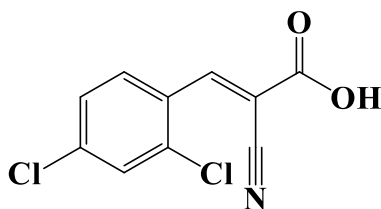
RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 7.54 (t, 1H, J = 7.95 Hz, CH ar); 7.81 (dq, 1H, J = 10.00 Hz, 8.04 Hz, 1.06 Hz e 0.87 Hz, CH ar); 8.02 (dt, 1H, J = 7.87 Hz, 7.72 Hz e 1.31 Hz, CH ar); 8.21 (t, 1H, J = 1.76 Hz, CH ar); 8.33 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 105.58 (Cq); 115.75 (CN); 122.31 (C ar); 129.24 (C ar); 131.34 (C ar); 132.92 (C ar); 133.85 (C ar); 135.40 (C ar); 152.75 ($\text{CH}=\text{C}$); 162.90 (C=O).

HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{10}\text{H}_6\text{BrNO}_2$): 252.06; encontrado ($[\text{M}-\text{H}]^-$):251.20.

(Anexo O)

4.3.2.6 Dados físico-químicos do composto Ácido (*E*)-2-ciano-3-(2,4-diclorofenil)acrílico (**b6**)



Aspecto: Sólidos amarelos claros; MM: 242,0550 g/mol; rendimento: 83,69%; PF: 218-220°C; RF: 0,40(AcOEt/MeOH 8:2).

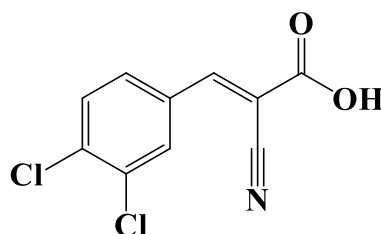
RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 7.69 (dd, 1H, J = 10.44 Hz, 1.54 Hz e 0.33 Hz, CH ar); 7.89 (d, 1H, J = 2.08 Hz, CH ar); 8.10 (d, 1H, J = 8.53 Hz, CH ar); 8.41 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 108.47 (Cq); 115.03 (CN); 128.25 (C ar); 128.85 (C ar); 129.88 (C ar); 130.87 (C ar); 135.64 (C ar); 137.70 (C ar); 148.87 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{C}$); 162.42 (C=O).

HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{10}\text{H}_5\text{Cl}_2\text{NO}_2$): 241.05; encontrado ($[\text{M}-\text{H}]^-$): 240.10.

(Anexo P)

4.3.2.7 Dados físico-químicos do composto Ácido (*E*)-2-ciano-3-(3,4-diclorofenil)acrílico (b7)



Aspecto: Sólidos bege; MM: 242,0550 g/mol; rendimento: 78%; PF: 183-184°C; RF: 0,40(AcOEt/MeOH 8:2).

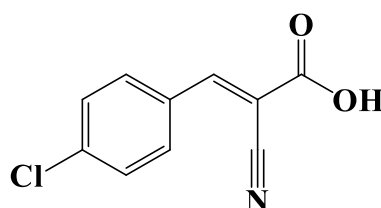
RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 7.87 (d, 1H, J = 8.45 Hz, CH ar); 8.02 (dd, 1H, J = 8.58 Hz, 3.55 Hz e 2.08 Hz, CH ar); 8.25 (d, 1H, J = 2.04 Hz, CH ar); 8.34 (s, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 105.96 (Cq); 115.63 (CN); 129.88 (C ar); 131.47 (C ar); 131.99 (C ar); 132.13 (C ar); 132.40 (C ar); 135.31 (C ar); 151.66 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{C}$); 162.77 (C=O).

HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_4$): 483.09; encontrado ($[\text{2M}-\text{H}]^-$): 483.40.

(Anexo Q)

4.3.2.8 Dados físico-químicos do composto Ácido (*E*)-3-(4-clorofenil)-2-cianoacrílico (b8)



Aspecto: Sólidos amarelos claros; MM: 207,6130 g/mol; rendimento: 71,06%; PF: 232,5-234°C; RF: 0,64(AcOEt/MeOH 8:2).

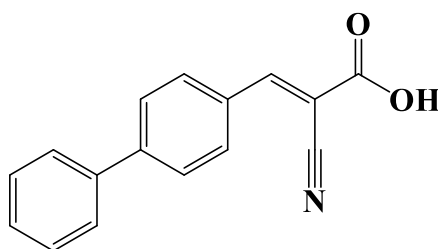
RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 7.66 (d, 2H, J = 8.61 Hz, CH ar); 8.04 (d, 2H, J = 8.61 Hz, CH ar); 8.35 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 104.44 (Cq); 115.90 (CN); 129.45 (C ar); 130.42 (C ar); 132.29 (C ar); 137.71 (C ar); 153.04 ($\text{CH}=\text{C}$); 163.08 (C=O).

HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{10}\text{H}_6\text{ClNO}_2$): 207.61; encontrado ($[\text{M}-\text{H}]^-$): 206.10.

(Anexo R)

4.3.2.9 Dados físico-químicos do composto Ácido (*E*)-3-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-cianoacrílico (b9)



Aspecto: Sólidos amarelos; MM: 249,2690 g/mol; rendimento: 91,89%; PF: 262,3-263°C; RF: 0,58 (AcOEt/MeOH 8:2).

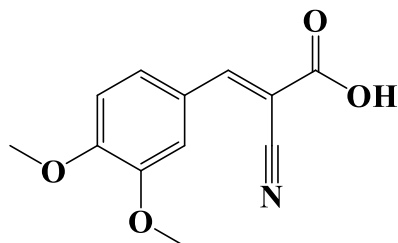
RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 7.43 (tt, 1H, J = 4.37 Hz, 2.61 Hz e 1.12 Hz, CH ar); 7.51 (t, 2H, J = 7.43 Hz, CH ar); 7.78 (d, 2H, J = 7.16 Hz, CH ar); 7.90 (d, 2H, J = 8.48 Hz, CH ar); 8.14 (d, 2H, J = 8.47 Hz, CH ar); 8.38 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 103.18 (Cq); 116.28 (CN); 127.01 (C ar); 127.37 (C ar); 128.64 (C ar); 129.16 (C ar); 130.54 (C ar); 131.44 (C ar); 138.57 (C ar); 144.43 (C ar); 153.84 ($\text{CH}=\text{C}$); 163.38 (C=O).

HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_4$): 294.26; encontrado ($[\text{M}-\text{H}+\text{CH}_2\text{O}_2]^-$): 293.10.

(Anexo S)

4.3.2.10 Dados físico-químicos do composto Ácido (*E*)-2-ciano-3-(3,4-dimetoxifenil)acrílico
(b10)



Aspecto: Sólidos amarelos claros; MM: 233,2230 g/mol; rendimento: 70,46%; PF: 216-218 °C; RF: 0,56 (AcOEt/MeOH 8:2).

RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 3.80 (s, 3H, OCH₃); 3.86 (s, 3H, OCH₃); 7.17 (d, 1H, J = 8.56 Hz, CH ar); 7.70 (dd, 1H, J = 8.57 Hz e 2.06 Hz, CH ar); 7.76 (d, 1H, J = 2.07 Hz, CH ar); 8.25 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ = 55.49 (OCH₃); 55.89 (OCH₃); 99.69 (Cq); 111.87 (CN); 112.76 (C ar); 116.87 (C ar); 124.15 (C ar); 126.51 (C ar); 148.70 (C ar); 153.25 (C ar); 154.30 ($\text{CH}=\text{C}$); 163.83 (C=O).

HMRS ESI- (m/z): calculado para (C₁₂H₁₁NO₄): 233.22; encontrado ([M-H]⁻): 234.10.
(Anexo T)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

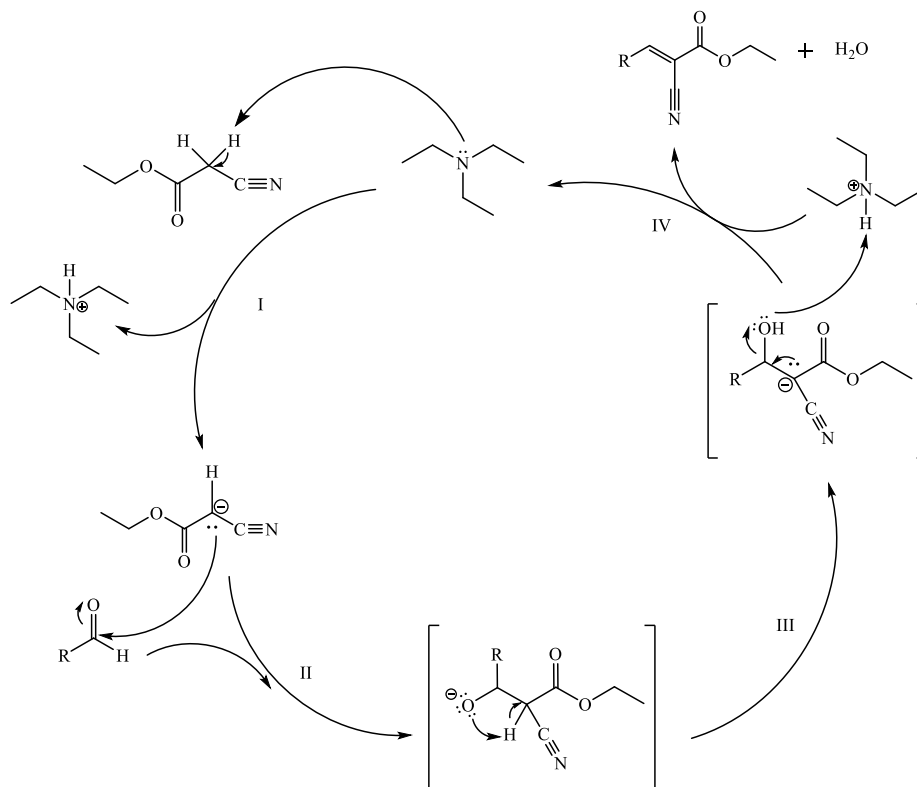
5.1 Obtenção dos compostos intermediários e compostos finais.

A condensação de Knoevenagel permitiu a obtenção dos derivados de acrilatos de etila de forma eficiente, sem maiores dificuldades nas etapas de síntese e purificação. A substituição do organocatalisador piperidina e do solvente básico piridina, considerados clássicos para essa síntese, pela trietilamina em etanol como meio de solvatação das espécies proporcionou rendimentos satisfatórios dos produtos desejados. Quanto à obtenção dos compostos finais, a síntese química foi realizada por metodologia convencional, utilizando os acrilatos de etila derivados e hidróxido de sódio, de modo que os produtos finais foram obtidos com rendimentos entre 46% e 92%.

5.2 Mecanismos reacionais para as moléculas intermediárias (a1-10)

Para a obtenção dos intermediários acrilatos de etila o mecanismo reacional envolve a reação clássica da condensação de Knoevenagel, utilizando aldeídos aromáticos com uma amina terciária. No mecanismo proposto, a trietilamina é usada como catalisador e desprotona o cianoacetato de etila na etapa I, formando um carbânion. Em seguida, esse carbânion realiza um ataque nucleofílico no aldeído (etapa II), levando a formação de uma nova ligação carbono-carbono e resultando na formação de um intermediário. Na etapa III, a reação progride ocorrendo uma transferência de próton, originando um grupo hidroxila. Este grupo hidroxila, após ser protonado pelo ânion trietilamônio, sofre uma reação de eliminação E1cb para liberar molécula H₂O na quarta etapa. O resultado final desse processo é um composto α,β -insaturado com configuração E (Figura 26).

Figura 26 - Esquema do mecanismo proposto da condensação de Knoevenagel para obtenção dos acrilatos de etila.



Fonte: AUTORA, 2024.

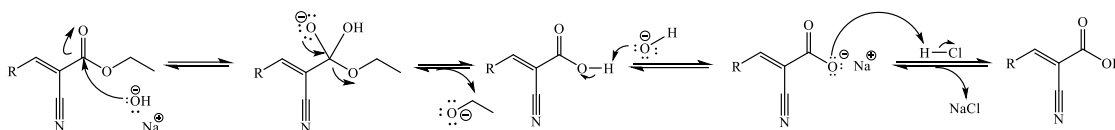
5.2.1 Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos intermediários (**a1-10**)

Foi verificada a formação dos compostos intermediários por meio das análises de RMN de ^1H e ^{13}C . Pelos espectros de RMN de ^1H , observou-se sinais característicos referentes aos prótons de metila (CH_3) e de metileno (CH_2) em torno de δ 1.30 ppm e δ 4.30 ppm como um tripleto e um quarteto, respectivamente. Por meio dos espectros foi possível caracterizar os sinais dos hidrogênios ligados aos anéis aromáticos das moléculas entre δ 6.90 ppm e δ 8.35 ppm. Além desses sinais, foi notado a presença de um singlete do hidrogênio vinílico entre δ 8.0 e δ 8.5 ppm, com valores diferenciando para cada molécula dentro desta faixa. Enquanto através dos espectros de RMN de ^{13}C , foi possível caracterizar as quantidades de carbonos contidos nas moléculas, com destaque para os sinais dos carbonos da metila, do metileno, da nitrila, da posição vinílica e da carbonila de éster em torno de δ 14.0 ppm, δ 62.5 ppm, δ 115 ppm, δ 153 ppm e 163 ppm, respectivamente.

5.3 Mecanismos reacionais para as moléculas finais (b1-10)

Para a obtenção dos compostos finais, os ciano-ésteres formados na etapa anterior foram convertidos em ácidos carboxílicos através do tratamento com hidróxido de sódio seguido da adição de ácido clorídrico. Na primeira etapa, o íon hidróxido atua como um nucleófilo atacando o grupo carbonila. Em seguida, o grupo carbonila é restituído pela liberação do íon alcóxido como um grupo de saída. Como se trata de uma hidrólise sob condições fortemente básicas, o ácido carboxílico produzido não se mantém e então ele é desprotonado pelo íon hidróxido se encontra presente em quantidade no meio reacional, formando um sal carboxilato. Posteriormente, com a adição de ácido clorídrico para protonar o íon carboxilato, é formado o ácido carboxílico requerido (Figura 27).

Figura 27 - Esquema do mecanismo proposto da hidrólise básica para obtenção dos ácidos acrílicos.



Fonte: Autora, 2024.

5.3.1 Caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos finais (b1-10)

Na caracterização estrutural dos compostos finais, é perceptível nos espectros de RMN de ^1H o desaparecimento dos sinais referentes a metila e ao metileno ligados ao éster, demonstrando a confirmação do composto. Apenas foram mantidos os sinais dos hidrogênios ligados aos anéis aromáticos das moléculas entre δ 6.90 ppm e δ 8.35 ppm, e também o singlete do hidrogênio vinílico entre δ 8.0 ppm e δ 8.5 ppm. Na análise de RMN de ^{13}C , é também característicos o desaparecimento dos sinais referentes aos dos carbonos da metila e do metileno. Em adição, foi possível verificar as quantidades de carbonos contidos nas moléculas por meio dos sinais característicos, como o carbono da posição vinílica e da carbonila de ácido carboxílico em torno de δ 150 ppm e δ 163 ppm, respectivamente.

5.4 Avaliação do grau de pureza relativo utilizando Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE/HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência tem ampla aplicabilidade em diversas áreas da química e trata-se de um método analítico importante para diversas substâncias. A CLAE utiliza altas pressões para impulsionar o solvente (fase móvel) através de colunas fechadas (fase estacionária) contendo partículas extremamente finas, que permitem realizar separações com grande eficiência e alta resolução (DONG, 2006; SKOOG *et al.*, 2008; YENDURI *et al.*, 2023).

Após a obtenção de todos os acrilatos de etila e dos ácidos 2-cianoacrílicos, os compostos foram analisados quanto a seus respectivos graus de pureza, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector de luz ultravioleta visível (Tabela 2). Para os experimentos foram utilizados como fases móveis os solventes acetonitrila e metanol, sendo que todos os compostos foram diluídos em acetonitrila (grau espectroscópico) na proporção de 0,2 mg/mL.

Tabela 2 - Análise do grau de pureza relativo dos acrilatos de etila e dos ácidos 2-cianoacrílicos.

Código	Tempo de retenção (min.)	Grau de pureza %	Anexo
a1	8.951	98,01	A
a2	9.324	100	B
a3	8.503	100	C
a4	8.895	100	D
a5	9.295	100	E
a6	9.670	100	F
a7	9.490	100	G
a8	9.174	100	H
a9	9.573	95,95	I
a10	8.945	100	J
b1	8.529	97,90	K
b2	8.913	95,90	L
b3	8.642	100	M

b4	8.639	95,31	N
b5	9.078	98,72	O
b6	8.769	96	P
b7	8.977	96,22	Q
b8	9.173	99,15	R
b9	9.300	97,50	S
b10	9.290	99,028	T

Fonte: AUTORA, 2024.

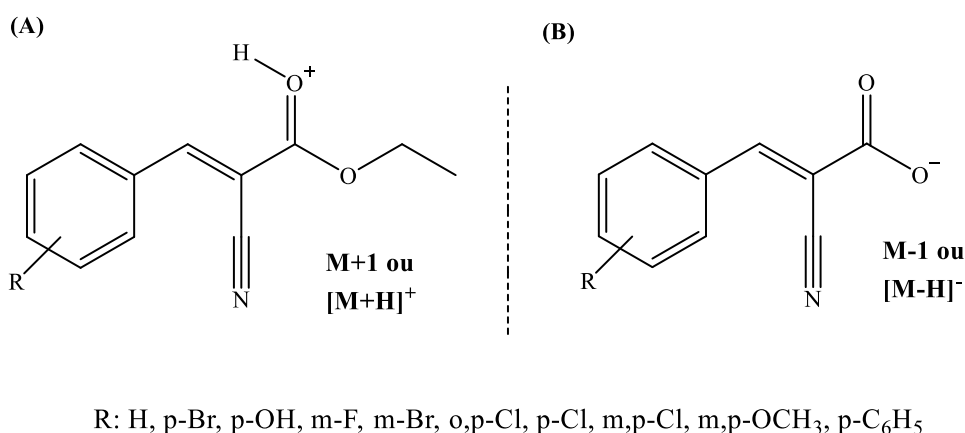
Dessa forma, conforme os dados da tabela 2, todas substâncias apresentaram grau de pureza satisfatória, acima de 95%, corroborada pela caracterização por RMN de ^1H e de ^{13}C .

5.5 Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS)

A espectrometria de massas tem sido uma ferramenta valiosa na elucidação e na determinação precisa de massas moleculares para compostos orgânicos, organometálicos e macromoléculas biológicas (GROSS, 2006; BECKER, 2008; DE HOFFMANN e STROOBANT, 2007). A espectrometria de massa também pode mensurar a massa de células individuais e de vírus (TAJIK *et al.*, 2022; NIKOLAEV *et al.* 2020). Em geral, um espectrômetro de massas é composto por três componentes principais: uma fonte de ionização, um analisador de massa e um detector (PAVIA *et al.*, 2010). A fonte de ionização é responsável por transformar as moléculas da amostra em íons carregados em fase gasosa. O analisador de massa separa esses íons com base em sua razão massa/carga (m/z), enquanto o detector registra a quantidade de íons que chegam a ele e o sinal é levado ao sistema de dados computadorizado para gerar o espectro de massa. A escolha do método de ionização, separação e detecção depende das características específicas da amostra e dos objetivos da análise, como sensibilidade, resolução e custo (BORONAT ENA *et al.*, 2023; TSUCHIDA *et al.*, 2020; TAMARA *et al.*, 2021; LÓPEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2020). Para as análises de caracterização dos compostos sintetizados, foi empregada a ionização por electrospray (ESI-MS) acoplada a um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC – do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*), permitindo a detecção de íons a partir de espécies lábeis ou pouco voláteis presentes em fase líquida.

As soluções preparadas para análise continham água em ácido fórmico 0,1% (v/v) e acetonitrila em ácido fórmico 0,1% (v/v). O ácido fórmico atua como um agente acidificante para favorecer a protonação de moléculas que se comportam como bases de Brønsted-Lowry, permitindo que sejam detectadas como íons carregados pelo espectrômetro de massas. Quando uma molécula a ser analisada atuar como base de Brønsted-Lowry, ela poderá capturar um próton do ácido fórmico, e o espectrômetro detectará sua massa acrescida de uma unidade de massa do próton, resultando em uma massa $M+1$. Este tipo de resultado foi visto para a maioria das análises dos compostos intermediários, que apesar de serem ciano ésteres foram protonados no oxigênio carbonílico gerando um íon positivo (Figura 28, esquema (a)). Em contrapartida, moléculas ácidas, como os ácidos 2-cianoacrílicos, tendem a perder um próton em condições adequadas, gerando um íon negativo (Figura 28, esquema (b)). Neste caso, o espectrômetro, operando no modo negativo, detectará a massa subtraída de um próton, resultando em uma massa $M-1$.

Figura 28 - Modos de detecção do íon molecular em ESI-MS.



Fonte: AUTORA, 2024.

As análises dos compostos **a1**, **a2**, **a3**, **a4**, **a5**, **a6**, **a7**, **a9** e **a10** revelaram valores de m/z experimentais com precisão satisfatória, apresentando desvios inferiores a 1% em relação aos valores teóricos calculados (Tabela 3). No entanto, para o composto **a8** foi observado desvio acima de 1% devido a algum erro aleatório que afetou na precisão do resultado. Nas análises de ESI-MS no modo positivo para maioria dos compostos intermediários foram observados picos de adutos comuns, conforme listado abaixo, os quais refletem interações características

da fase móvel e das propriedades químicas das moléculas (WATSON e SPARKMAN, 2007; WANNER e HÖFNER, 2007; COLE, 2011; THINIUS *et al.*, 2020):

- $[M+H+H_2O]^+$
- $[M+H+2K]^+$
- $[M+H+CH_3CN]^+$
- $[M+H+Na]^+$
- $[M+H+Na+CH_3CN]^+$

Os compostos **a1** e **a3** exibiram picos de íons desprotonados $[M-H]^-$ em modo negativo, e **a10** apresentou o íon protonado $[M+H]^+$ em modo positivo. Todos os espectros podem ser vistos nos anexos correspondentes descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Perfil químico dos espectros de (ESI – MS) obtidos para os acrilatos de etila.

Código	Fórmula Molecular	Íon encontrado	m/z calculado	m/z encontrado	Erro Relativo Percentual (%)	Anexo
a1	$C_7H_{10}NO_2$	$[M-H]^-$	201.23	200.20	0.51	A
a2	$C_{12}H_{10}BrNO_2$	$[M+H+H_2O]^+$	299.12	298.30	0.27	B
a3	$C_{12}H_{11}NO_3$	$[M-H]^-$	217.22	216.10	0.52	C
a4	$C_{12}H_{10}FNO_2$	$[M+H+2K]^+$	298.22	297.20	0.34	D
a5	$C_{12}H_{10}BrNO_2$	$[M+H+H_2O]^+$	299.12	297.20	0.64	E
a6	$C_{12}H_9Cl_2NO_2$	$[M+H+CH_3CN]^+$	312.11	311.10	0.32	F
a7	$C_{12}H_9Cl_2NO_2$	$[M+H+Na]^+$	294.11	295.00	0.30	G
a8	$C_{12}H_{10}ClNO_2$	$[M+H+Na+CH_3CN]^+$	300.67	297.10	1.19	H

a9	C ₁₈ H ₁₅ NO ₂	[M+H+H ₂ O] ⁺	295.32	297.10	0.60	I
a10	C ₁₄ H ₁₅ NO ₄	[M+H] ⁺	261.28	262.00	0.28	J

Fonte: AUTORA, 2024.

Também foram visualizados os valores de m/z encontrados para os compostos **b1**, **b2**, **b3**, **b5**, **b6**, **b8** e **b10** cujo valores de erros relativos percentuais são inferiores a 1%, indicando que os resultados obtidos são próximos dos valores calculados (Tabela 4). Vale ressaltar que os pKas do ácido fórmico e dos ácidos 2-cianoacrílicos analisados são respectivamente iguais a 4,1 e 1,2 (valores calculados através do *MolGpka* no servidor <http://xundrug.cn/molgpka/silicopka>; PAN *et al.*, 2021), o que em teoria classifica o ácido fórmico como uma espécie aceptora de prótons. Para o composto **b4** observou-se um pico [M-H+23, Na]⁻, que corresponde ao pico do íon molecular desprotonado associado ao íon de sódio com m/z igual 214.10, caracterizando devidamente o composto. De acordo com Silverstein *et al.* (2019), este tipo de aduto é comum ocorrer durante as análises ESI-MS, pois os íons de sódio estão sempre presentes nas soluções aquosas. Na análise do composto **b9**, foi observado o pico característico [M-H+46, CH₂O₂]⁻ com m/z igual 293.10, que condiz o pico do íon molecular desprotonado com ácido fórmico. Finalmente, o valor de m/z igual a 483.04 para o pico [2M-H]⁻ refere-se à formação de um dímero desprotonado, sugerindo que o grupo ácido carboxílico na molécula analisada facilita a formação de duas unidades ligadas por pontes de hidrogênio. Este pico caracteriza o composto **b7**. Para todos os compostos mencionados, os valores m/z experimentais obtidos estão próximos aos valores teóricos, com erros relativos percentuais abaixo de 1% conforme detalhado na Tabela 4. Todos os espectros correspondentes estão disponíveis nos anexos listados na tabela a seguir.

Tabela 4 - Perfil químico dos espectros de (ESI – MS) obtidos para os ácidos 2-cianoacrílicos.

Código	Fórmula Molecular	Íon encontrado	m/z calculado	m/z encontrado	Erro Relativo Percentual (%)	Anexo
b1	C ₇ H ₁₀ NO ₂	[M-H] ⁻	173.17	172.20	0.56	K
b2	C ₁₀ H ₆ BrNO ₂	[M-H] ⁻	252.06	251.20	0.34	L

b3	C ₁₀ H ₇ NO ₃	[M-H] ⁻	189.17	188.20	0.51	M
b4	C ₁₀ H ₆ FNO ₂	[M-H+Na] ⁻	214.16	214.10	0.02	N
b5	C ₁₀ H ₆ BrNO ₂	[M-H] ⁻	252.06	251.20	0.34	O
b6	C ₁₀ H ₅ Cl ₂ NO ₂	[M-H] ⁻	241.05	240.10	0.39	P
b7	C ₁₀ H ₅ Cl ₂ NO ₂	[2M-H] ⁻	483.09	483.40	0.06	Q
b8	C ₁₀ H ₆ ClNO ₂	[M-H] ⁻	207.61	206.10	0.72	R
b9	C ₁₆ H ₁₁ NO ₂	[M-H+CH ₂ O ₂] ⁻	294.26	293.10	0.39	S
b10	C ₁₂ H ₁₁ NO ₄	[M-H] ⁻	233.22	234.10	0.38	T

Fonte: AUTORA, 2024.

5.6 Análise de propriedades ADME segundo os critérios de Lipinski e Veber

Os estudos de ADME (abreviação de absorção, distribuição, metabolismo e excreção) *in silico* são ferramentas preditivas de propriedades farmacocinética. Estes estudos são fundamentais para o reconhecimento precoce de substâncias com maiores semelhanças com fármacos já conhecidos, evitando que os protótipos moleculares falhem no estágio final de desenvolvimento (VRBANAC e SLAUTER, 2017; JIA *et al.*, 2020; LUCAS *et al.*, 2019). Dessa forma, vários filtros foram desenvolvidos para identificar propriedades relacionadas à biodisponibilidade oral e aos perfis ADME, sendo a regra dos cinco de Lipinski e os filtros de Veber os mais requisitados (HAMMOUDI *et al.*, 2022; GARCIA JIMENEZ *et al.*, 2023; ELKAEED *et al.*, 2024).

Neste sentido, os derivados de ácidos 2-cianoacrílicos foram submetidos às análises de ADME *in silico* para a predição de suas propriedades físico-químicas relacionadas a regra dos cinco de Lipinski e aos filtros de Veber (LIPINSKI *et al.*, 1997; VEBER *et al.*, 2002). Como apresentados os resultados dos estudos na Tabela 5 e comparando com a análise individual realizada para o composto ML302F, podemos verificar que todos os compostos estão condizentes com as variáveis físico-químicas necessárias para a biodisponibilidade oral: peso molecular ≤ 500 g/mol, coeficiente de partição água/óleo (LogP) ≤ 5 , doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5 , aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10 , ligações rotacionáveis ≤ 10 , e área de superfície polar topológica < 140 Å². Esses resultados indicam que todos os compostos devem ter boa solubilidade, permeabilidade e biodisponibilidade oral.

Tabela 5 - Previsão farmacocinética para os compostos ML302F e derivados de ácidos 2-cianoacrílicos.

Composto	MM (g/mol)	TPSA (Å²)	Log P	DLH	ALH	LR	Absorção GI	BHE	Substrato gp-P
ML302F	283,56	76,10	3,58	1	2	2	Alta	Sim	Não
b1	173,1710	61,09	1,24	1	3	2	Alta	Sim	Não
b2	252,0670	61,09	1,94	1	3	2	Alta	Sim	Não
b3	189,1700	81,32	0,65	2	4	2	Alta	Não	Não
b4	191,1614	61,09	1,65	1	4	2	Alta	Sim	Não
b5	252,0670	61,09	1,94	1	3	2	Alta	Sim	Não
b6	242,0550	61,09	2,35	1	3	2	Alta	Sim	Não
b7	242,0550	61,09	2,35	1	3	2	Alta	Sim	Não
b8	207,6130	61,09	1,80	1	3	2	Alta	Sim	Não
b9	249,2690	61,09	2,62	1	3	3	Alta	Sim	Não
b10	233,2230	79,55	0,67	1	5	4	Alta	Não	Não

Fonte: AUTORA, 2024.

Em adição, todos os derivados de ácidos acrílicos demonstram absorção intestinal passiva altamente provável, corroborando com o indicativo de boa biodisponibilidade oral. Em comparação com ML302F, uma grande maioria dos compostos apresentam também probabilidade de permear a barreira hematoencefálica, com exceção para **b3** e **b10**. Conjuntamente, verificou-se que nenhum dos compostos foi sugerido como substrato da glicoproteína-P (gp-P). A gp-P é uma proteína de transporte que pode interferir na absorção e distribuição de diversos fármacos, causando interações medicamentosas (ELMELIEGY et al., 2020; COX, NICOLAÏ e WILLIAMSON, 2023). Assim, como os compostos estudados não interagem com a gp-P, infere-se que a probabilidade de ocorrerem interações medicamentosas relacionadas a essa proteína é baixa. Por fim, foi observado dados indicativos de inibição somente para a enzima CYP1A2 pela maioria das substâncias analisadas, exceto para **b1**, **b3**, **b4** e **b9**. Esses resultados mostram riscos mínimos de interações medicamentosas mediadas pelas principais enzimas hepáticas CYP. Vale ressaltar que o fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de medicamentos, sendo as enzimas CYP as principais executoras desse processo (BRÄNDÉN *et al.*, 2014; ZHANG e TANG, 2018; LAI *et al.*, 2022).

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A resistência bacteriana representa um dos maiores problemas de saúde pública global, limitando os tratamentos disponíveis para diversas doenças infecciosas. A pressão seletiva exercida pelo uso excessivo e inadequado de antibióticos induziu o desenvolvimento de mecanismos complexos de resistência bacteriana, destacando-se entre eles as mutações genéticas, a modificação de componentes da parede celular bacteriana, as alterações dos sítios-alvos e a produção de enzimas hidrolíticas, como as β -lactamases.

As enzimas β -lactamases desempenham um papel essencial na inativação dos antibióticos β -lactâmicos, amplamente considerados a principal linha terapêutica de defesa contra muitas infecções bacterianas. A evolução das β -lactamases ao longo dos anos superou a eficácia dos inibidores de β -lactamases, comprometendo o arsenal terapêutico contra bactérias produtoras dessas enzimas e resultando em um aumento na gravidade das doenças, tempo de internação e mortalidade. Além disso, a lentidão no desenvolvimento de novos antibióticos e a falta de alternativas terapêuticas inovadoras evidenciam a necessidade urgente de novas estratégias para combater esse problema.

Assim, o presente trabalho buscou desenvolver a síntese de derivados de ácidos 2-cianoacrílicos planejados racionalmente a partir do composto ML302F, um protótipo que demonstrou inibição *in vitro* de amplo espectro de M β LS e teve seu mecanismo de inibição analisado por Brem e colaboradores (2014) por meio da cristalografia de raios-X. Para obtenção dos compostos planejados foi realizada duas etapas reacionais: Inicialmente foi desenvolvida a condensação de Knoevenagel para obtenção dos acrilatos de etila α,β -insaturados, e em seguida foi desenvolvida as reações para obter os derivados de ácidos 2-cianoacrílicos planejados.

A metodologia de condensação aplicada acarreta na formação de 10 compostos intermediários com rendimentos entre 50 e 93% e com alto grau de pureza (> 95%). Acerca dos compostos finais produzidos pela conversão de ciano ésteres em ácidos acrílicos, 10 compostos finais foram obtidos com rendimentos entre 46 e 92%, com grau de pureza entre 96 e 99%. Os valores de rendimentos satisfatórios, assim como os graus de pureza vistas por cromatografia líquida de alta eficiência, corroboram com a eficácia dos métodos sintéticos e de purificação dos compostos. Em adicional, foram realizadas as medidas dos pontos de fusão para identificar e avaliar a pureza das substâncias.

Os compostos foram devidamente caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C , onde os deslocamentos químicos característicos obtidos forneceram evidências conclusivas sobre a formação dos compostos almeçados. Em adição, os compostos foram caracterizados por espectrometria de massas com ionização por electrospray, permitindo a análise dos perfis químicos das estruturas propostas e indicando a efetividade das metodologias sintéticas empregadas.

Através dos estudos *in silico* para a análise dos perfis farmacocinéticos das moléculas baseada nas regras de Lipinski e Veber, foi possível prever que os derivados de ácidos 2-cianoacrílicos apresentam boas propriedades em relação à solubilidade e permeabilidade nas membranas biológicas, sendo então considerados bons candidatos a fármacos.

Como perspectivas deste trabalho, os compostos sintetizados serão posteriormente avaliados quanto ao seu efeito antibacteriano em cepas de bactérias resistentes, e também quanto a sua capacidade de inibição de enzimas M β Ls e S β Ls em sinergia com antibióticos β -lactâmicos, com a finalidade de contribuir com o desenvolvimento de protótipos inibidores de β -lactamases.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. P. History of β -lactam antibiotics. In: *Antibiotics: Containing the Beta-Lactam Structure*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1983. p. 1-14.
- AHN, Byung-Zun; SOK, Dai-Eun. Michael acceptors as a tool for anticancer drug design. *Current Pharmaceutical Design*, v. 2, n. 3, p. 247-262, 1996.
- ALDEYAB, Mamoon; LÓPEZ-LOZANO, José-María; GOULD, Ian M. Global antibiotics use and resistance. *Global Pharmaceutical Policy*, p. 331-344, 2020.
- AMMASI, Arunkumar; PONNUSAMY MUNUSAMY, Anbarasan. Highly efficient organic indolocarbazole dye in different acceptor units for optoelectronic applications—a first principle study. *Structural Chemistry*, v. 29, p. 967-976, 2018.
- AMBLER, Richard P. The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.
- AKTAŞ, Z.; KAYACAN, C.; ONCUL, O. In vitro activity of avibactam (NXL104) in combination with β -lactams against Gram-negative bacteria, including OXA-48 β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of antimicrobial agents*, v. 39, n. 1, p. 86-89, 2012.
- AMINOV, Rustam I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental microbiology*, v. 11, n. 12, p. 2970-2988, 2009.
- Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Confirma dados mundiais sobre resistência microbiana, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/confira-dados-mundiais-sobre-resistencia-microbiana>>. Acesso em: 13 de julho de 2024.
- ASLAM, B.; WANG, W.; ARSHAD, M. I.; KHURSHID, M.; MUZAMMIL, S.; RASOOL, M. H.; ... & BALOCH, Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance*, p. 1645-1658, 2018.
- BAHR, Guillermo; GONZALEZ, Lisandro J.; VILA, Alejandro J. Metallo- β -lactamases in the age of multidrug resistance: from structure and mechanism to evolution, dissemination, and inhibitor design. *Chemical reviews*, v. 121, n. 13, p. 7957-8094, 2021.

BAUER, Renato A. Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug discovery today*, v. 20, n. 9, p. 1061-1073, 2015.

BECKER, Sabine. *Inorganic mass spectrometry: principles and applications*. John Wiley & Sons, 2008.

BENNETT, Joan W.; CHUNG, King-Thom. Alexander Fleming and the discovery of penicillin. 2001.

BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BLAIR, Hannah A. Voxelotor: first approval. *Drugs*, v. 80, n. 2, p. 209-215, 2020.

BOÁKIM, Kyung et al. From epoxomicin to carfilzomib: chemistry, biology, and medical outcomes. *Natural product reports*, v. 30, n. 5, p. 600-604, 2013.

BONDI JR, Amedeo; DIETZ, Catherine C. Penicillin resistant staphylococci. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 60, n. 1, p. 55-58, 1945.

BORONAT ENA, Maria del Mar; COWAN, David A.; ABBATE, Vincenzo. Ambient ionization mass spectrometry applied to new psychoactive substance analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 42, n. 1, p. 3-34, 2023.

BOUZRATI-ZERELLI, M.; FRIGOLI, M.; DUMUR, F.; GRAFF, B.; FOUASSIER, J. P.; LALEVÉE, J. Design of novel photobase generators upon violet LEDs and use in photopolymerization reactions. *Polymer*, v. 124, p. 151-156, 2017.

BRÄNDÉN, G.; SJÖGREN, T.; SCHNECKE, V.; XUE, Y. Structure-based ligand design to overcome CYP inhibition in drug discovery projects. *Drug discovery today*, v. 19, n. 7, p. 905-911, 2014.

BREM, Jürgen et al. Rhodanine hydrolysis leads to potent thioenolate mediated metallo- β -lactamase inhibition. *Nature chemistry*, v. 6, n. 12, p. 1084-1090, 2014.

BROWN, Roland PA; APLIN, Robin T.; SCHOFIELD, Christopher J. Inhibition of TEM-2 β -lactamase from *Escherichia coli* by clavulanic acid: observation of intermediates by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry*, v. 35, n. 38, p. 12421-12432, 1996.

BURGER, Jan A.; BUGGY, Joseph J. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765). *Leukemia & lymphoma*, v. 54, n. 11, p. 2385-2391, 2013.

BUSH, Karen. A resurgence of β -lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *International journal of antimicrobial agents*, v. 46, n. 5, p. 483-493, 2015.

BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 6, n. 8, p. a025247, 2016.

BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 5, p. 295-306, 2019.

BUSH, Karen; JACOBY, George A. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

BUSH, Karen; JACOBY, George A.; MEDEIROS, Antone A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.

BUTTERWORTH, S.; CROSS, D. A.; FINLAY, M. R. V.; WARD, R. A.; WARING, M. J. The structure-guided discovery of osimertinib: the first US FDA approved mutant selective inhibitor of EGFR T790M. *Medchemcomm*, v. 8, n. 5, p. 820-822, 2017.

CLAYDEN, Jonathan; GREEVES, Nick; WARREN, Stuart. *Organic chemistry*. Oxford University Press, USA, 2012.

ClinicalTrials.gov. Safety and Efficacy Study of Cefepime/VNRX-5133 in Patients With Complicated Urinary Tract Infections (CERTAIN-1), 2024. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/study/NCT03840148?titles=NCT03840148&aggFilters=phase:3&rank=1>>, a. Acesso em: 04 de Agosto de 2024.

ClinicalTrials.gov. P1, DDI & MAD PK and Safety Study of Xeruborbactam Oral Prodrug in Combo With Ceftibuten in Healthy Participants, 2024. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/study/NCT06079775?titles=Xeruborbactam&rank=2>>, b. Acesso em: 04 de Agosto de 2024.

COLE, Richard B. (Ed.). *Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications*. 2011.

COX, BENOIT; NICOLAÏ, JOHAN; WILLIAMSON, BETH. The role of the efflux transporter, P-glycoprotein, at the blood–brain barrier in drug discovery. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v. 44, n. 1, p. 113-126, 2023.

CULP, Elizabeth; WRIGHT, Gerard D. Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *The Journal of antibiotics*, v. 70, n. 4, p. 366-377, 2017.

DAINA, ANTOINE; MICHIELIN, OLIVIER; ZOETE, VINCENT. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017.

DAVIES, David T.; EVERETT, Martin. Designing inhibitors of β -lactamase enzymes to overcome carbapenem resistance in Gram-negative bacteria. *Accounts of Chemical Research*, v. 54, n. 9, p. 2055-2064, 2021.

DAWSON, Martin Henry; HOBBY, Gladys L. The clinical use of penicillin: observations in one hundred cases. *Journal of the American Medical Association*, v. 124, n. 10, p. 611-622, 1944.

DE HOFFMANN, Edmond; STROOBANT, Vincent. *Mass spectrometry: principles and applications*. John Wiley & Sons, 2007.

DEEKS, Emma D. Neratinib: first global approval. *Drugs*, v. 77, p. 1695-1704, 2017.

DHILLON, Sohita. Adagrasib: First Approval. *Drugs*, v. 83, n. 3, p. 275-285, 2023.

DING, Z.; KIM, S.; DORSAM, R. T.; JIN, J.; KUNAPULI, S. P. Inactivation of the human P2Y₁₂ receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 101, n. 10, p. 3908-3914, 2003.

DRLICA, Karl S.; PERLIN, David S. *Antibiotic Resistance: Understanding and Responding to an Emerging Crisis*, Portable Documents. FT Press, 2010.

DOCQUIER, Jean-Denis; MANGANI, Stefano. An update on β -lactamase inhibitor discovery and development. *Drug Resistance Updates*, v. 36, p. 13-29, 2018.

DONG, Michael W. *Modern HPLC for practicing scientists*. John Wiley & Sons, 2006.

EHMANN, David E. et al. Kinetics of avibactam inhibition against class A, C, and D β -lactamases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 39, p. 27960-27971, 2013.

ELKAEED, E. B.; EISSA, I. H.; SALEH, A. M.; ALSFOUK, B. A.; METWALY, A. M. Computer-aided drug discovery of natural antiviral metabolites as potential SARS-CoV-2 helicase inhibitors. *Journal of Chemical Research*, v. 48, n. 1, p. 17475198231221253, 2024.

ELMELIEGY, M.; VOURVAHIS, M.; GUO, C.; WANG, D. D. Effect of P-glycoprotein (P-gp) inducers on exposure of P-gp substrates: review of clinical drug–drug interaction studies. *Clinical pharmacokinetics*, v. 59, p. 699-714, 2020.

EMARA, Y.; JOLLIET, O.; FINKBEINER, M.; HEß, S.; KOSNIK, M.; SIEGERT, M. W.; FANTKE, P. Comparative selective pressure potential of antibiotics in the environment. *Environmental Pollution*, v. 318, p. 120873, 2023.

FDA (Food and Drug Administration). Highlights Of Prescribing Information - Augmentin, 2024. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/050564s053s055,050575s040s042,050597s047s049,050720s026s028,050725s028s030,050726s022s024lbl.pdf>. Acesso em: 01 de Agosto de 2024.

FENG, J.; ZHENG, Y.; MA, W.; IHSAN, A.; HAO, H.; CHENG, G.; WANG, X. Multitarget antibacterial drugs: An effective strategy to combat bacterial resistance. *Pharmacology & Therapeutics*, p. 108550, 2023.

FERREIRA, A. R.; DE A. VILELA, G. V.; AMORIM, M. B.; PERRY, K. P.; DA SILVA, A. J.; DIAS, A. G.; COSTA, P. R. Stereoselective conjugate addition of benzyl phenylsulfonyl carbanions to enoates derived from D-mannitol. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 69, n. 12, p. 4013-4018, 2004.

FLEMING, Ian. *Molecular orbitals and organic chemical reactions*. John Wiley & Sons, 2011.

FOYE, William O. *Foye's principles of medicinal chemistry*. Lippincott williams & wilkins, 2008.

GARCIA JIMENEZ, DIEGO; POONGAVANAM, VASANTHANATHAN; KIHLEBERG, JAN. Macrocycles in drug discovery— learning from the past for the future. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 66, n. 8, p. 5377-5396, 2023.

GAYNES, Robert. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging infectious diseases*, v. 23, n. 5, p. 849, 2017.

GONZALEZ-BELLO, Concepcion et al. β -Lactamase inhibitors to restore the efficacy of antibiotics against superbugs. *Journal of medicinal chemistry*, v. 63, n. 5, p. 1859-1881, 2019.

GEDDES, Alasdair M.; KLUGMAN, Keith P.; ROLINSON, George N. Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. *International journal of antimicrobial agents*, v. 30, p. 109-112, 2007.

GEHRINGER, Matthias; LAUFER, Stefan A. Emerging and re-emerging warheads for targeted covalent inhibitors: applications in medicinal chemistry and chemical biology. *Journal of medicinal chemistry*, v. 62, n. 12, p. 5673-5724, 2018.

GROSS, Jürgen H. *Mass spectrometry: a textbook*. Springer Science & Business Media, 2006.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química nova*, v. 33, p. 667-679, 2010.

GURRAPU, S.; JONNALAGADDA, S. K.; ALAM, M. A.; NELSON, G. L.; SNEVE, M. G.; DREWES, L. R.; MEREDDY, V. R. Monocarboxylate transporter 1 inhibitors as potential anticancer agents. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, v. 6, n. 5, p. 558-561, 2015.

HAIDER, Ali; IKRAM, Muhammad; RAFIQ, Asma. Antimicrobials; drug resistance. In: *Green nanomaterials as potential antimicrobials*. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 109-124.

HAMMOUDI, Nour-El-Houda et al. In silico drug discovery of IKK- β inhibitors from 2-amino-3-cyano-4-alkyl-6-(2-hydroxyphenyl) pyridine derivatives based on QSAR, docking, molecular dynamics and drug-likeness evaluation studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 40, n. 2, p. 886-902, 2022.

HAYAMA, N.; KURAMOTO, R.; FÖLDES, T.; NISHIBAYASHI, K.; KOBAYASHI, Y.; PÁPAI, I.; TAKEMOTO, Y. Mechanistic insight into asymmetric hetero-Michael addition of α,β -unsaturated carboxylic acids catalyzed by multifunctional thioureas. *Journal of the American Chemical Society*, v. 140, n. 38, p. 12216-12225, 2018.

HECKER, Scott J. et al. Discovery of cyclic boronic acid QPX7728, an ultrabroad-spectrum inhibitor of serine and metallo- β -lactamases. *Journal of medicinal chemistry*, v. 63, n. 14, p. 7491-7507, 2020.

HELENA, A. Yu; PAO, William. Targeted therapies: Afatinib—new therapy option for EGFRmutant lung cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, v. 10, n. 10, p. 551, 2013.

HERNANDO-AMADO, S.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature microbiology*, v. 4, n. 9, p. 1432-1442, 2019.

HO, Tse-Lok. *Hard and soft acids and bases principle in organic chemistry*. Elsevier, 2012.

HONNANAYAKANAVAR, Jyoti M.; BEHERA, Purna Chandra; SURESH, Suriseti. Tandem Copper (I)-Catalyzed N-Arylation–1, 4-Conjugate Addition to Access Tetrahydroacridinones. *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 364, n. 23, p. 4043-4048, 2022.

HOWELL, Gareth P. Asymmetric and diastereoselective conjugate addition reactions: C–C bond formation at large scale. *Organic Process Research & Development*, v. 16, n. 7, p. 1258-1272, 2012.

HUTTNER, A.; BIELICKI, J.; CLEMENTS, M. N.; FRIMODT-MØLLER, N.; MULLER, A. E.; PACCAUD, J. P.; MOUTON, J. W. Oral amoxicillin and amoxicillin–clavulanic acid: properties, indications and usage. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 26, n. 7, p. 871-879, 2020.

JACOBY, George A. β -Lactamase nomenclature. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 50, n. 4, p. 1123-1129, 2006.

JIA, C. Y.; LI, J. Y.; HAO, G. F.; YANG, G. F. A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery. *Drug discovery today*, v. 25, n. 1, p. 248-258, 2020.

JIMENEZ, D. E.; ZANIN, L. L.; DINIZ, L. F.; ELLENA, J.; PORTO, A. L. M. Green synthetic methodology of (E)-2-cyano-3-aryl selective knoevenagel adducts under microwave irradiation. *Current Microwave Chemistry*, v. 6, n. 1, p. 54-60, 2019.

JOSHI, Harshit; SINGH, Vinod K. Cinchona Derivatives as Bifunctional H-bonding Organocatalysts in Asymmetric Vinylogous Conjugate Addition Reactions. *Asian Journal of Organic Chemistry*, v. 11, n. 2, p. e202100053, 2022.

JUSTIN THOMAS, K. R. et al. 2, 3-Disubstituted thiophene-based organic dyes for solar cells. *Chemistry of Materials*, v. 20, n. 5, p. 1830-1840, 2008.

KNOEVENAGEL, E. Ueber eine darstellungsweise der glutarsäure. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, v. 27, n. 2, p. 2345-2346, 1894.

KOBEISSI, E.; MENASSA, M.; MOUSSALLY, K.; REPETTO, E.; SOBOH, I.; HAJJAR, M.; SALEH, S.; ABU-SITTAH, G. The socioeconomic burden of antibiotic resistance in conflict-affected settings and refugee hosting countries: a systematic scoping review. Conflict and health, v. 15, p. 1-9, 2021.

LAI, H.; ZHANG, J.; XING, F.; XIAO, P. Recent advances in light-regulated non-radical polymerisations. Chemical Society Reviews, v. 49, n. 6, p. 1867-1886, 2020.

LAI, YURONG et al. Recent advances in the translation of drug metabolism and pharmacokinetics science for drug discovery and development. Acta Pharmaceutica Sinica B, v. 12, n. 6, p. 2751-2777, 2022.

LEE, Yuman; KIM, Juliette; TRINH, Saralinh. Meropenem–vaborbactam (Vabomere™): another option for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Pharmacy and Therapeutics, v. 44, n. 3, p. 110, 2019.

LEPORE, C.; SILVER, L.; THEURETZBACHER, U.; THOMAS, J.; VISI, D. The small-molecule antibiotics pipeline: 2014-2018. Nature Reviews Drug Discovery, v. 18, n. 10, p. 739-740, 2019.

LI, T.; WANG, Z.; GUO, J.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C.; WANG, J.; HAN, B.; HUI, T.; LIU J.; WANG, X. Bacterial resistance to antibacterial agents: Mechanisms, control strategies, and implications for global health. Science of The Total Environment, v. 860, p. 160461, 2023.

LIMA, L. M.; DA SILVA, B. N. M.; BARBOSA, G.; BARREIRO, E. J. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. European journal of medicinal chemistry, v. 208, p. 112829, 2020.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Advanced drug delivery reviews, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

LIU, Bin et al. Discovery of taniborbactam (VNRX-5133): a broad-spectrum serine-and metallo- β -lactamase inhibitor for carbapenem-resistant bacterial infections. 2019.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, O.; DOMÍNGUEZ, R.; PATEIRO, M.; MUNEKATA, P. E.; ROCCHETTI, G.; LORENZO, J. M. Determination of polyphenols using liquid

chromatography–tandem mass spectrometry technique (LC–MS/MS): A review. *Antioxidants*, v. 9, n. 6, p. 479, 2020.

LUCAS, A. J.; SPROSTON, J. L.; BARTON, P.; RILEY, R. J. Estimating human ADME properties, pharmacokinetic parameters and likely clinical dose in drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, v. 14, n. 12, p. 1313-1327, 2019.

MAISONNEUVE, Etienne; GERDES, Kenn. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell*, v. 157, n. 3, p. 539-548, 2014.

MAJUMDAR, Nilanjana. Carboxylic acids as building blocks in catalytic asymmetric reactions. *ACS Catalysis*, v. 12, n. 14, p. 8291-8324, 2022.

MAMATHA JYOTHI, Rekala Shalini; SRIPATHI, Mydhili P.; THIRUPATHI, Ponnaboina. Recent Advances in Base-assisted Michael Addition Reactions. *Current Organic Chemistry*, v. 26, n. 13, p. 1264-1293, 2022.

MARKHAM, Anthony. Mobocertinib: first approval. *Drugs*, v. 81, n. 17, p. 2069-2074, 2021.

MAWAL, Y.; CRITCHLEY, I. A.; RICCOBENE, T. A.; TALLEY, A. K. Ceftazidime–avibactam for the treatment of complicated urinary tract infections and complicated intra-abdominal infections. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 8, n. 6, p. 691-707, 2015.

MAO, J. L.; RAN, X. K.; TIAN, J. Z.; JIAO, B.; ZHOU, H. L.; CHEN, L.; WANG, Z. G. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-hydroxybenzene acrylic acid derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 21, n. 5, p. 1549-1553, 2011.

MARSHALL, James A.; CARROLL, Ronnie D. Reduction of alkylidenecyanoacetates with sodium borohydride. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 30, n. 8, p. 2748-2754, 1965.

MEINI, María-Rocío; LLARRULL, Leticia I.; VILA, Alejandro J. Overcoming differences: The catalytic mechanism of metallo- β -lactamases. *FEBS letters*, v. 589, n. 22, p. 3419-3432, 2015.

MO, W. Y.; CHEN, Z.; LEUNG, H. M.; LEUNG, A. O. W. Application of veterinary antibiotics in China's aquaculture industry and their potential human health risks. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, p. 8978-8989, 2017.

NAGHAVI, Mohsen et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, 2024.

NARENDRAKUMAR, L.; CHAKRABORTY, M.; KUMARI, S.; PAUL, D.; DAS, B. β -Lactam potentiators to re-sensitize resistant pathogens: Discovery, development, clinical use and the way forward. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 1092556, 2023.

NIKOLAEV, Evgeny N. et al. Mass-spectrometric detection of SARS-CoV-2 virus in scrapings of the epithelium of the nasopharynx of infected patients via nucleocapsid N protein. *Journal of proteome research*, v. 19, n. 11, p. 4393-4397, 2020.

NODWELL, M. B.; MENZ, H.; KIRSCH, S. F.; SIEBER, S. A. Rugulactone and its analogues exert antibacterial effects through multiple mechanisms including inhibition of thiamine biosynthesis. *ChemBioChem*, v. 13, n. 10, p. 1439-1446, 2012.

NOE, Mark C.; GILBERT, Adam M. Targeted covalent enzyme inhibitors. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, v. 47, p. 413-439, 2012.

O'NEILL, J. I. M. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev. Antimicrob. Resist.*, 2014.

O'NEILL, Jim. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.

OWEN, Dafydd R. et al. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science*, v. 374, n. 6575, p. 1586-1593, 2021.

PAN, X.; WANG, H.; LI, C.; ZHANG, J. Z.; JI, C. MolGpka: A web server for small molecule p K a prediction using a graph-convolutional neural network. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 61, n. 7, p. 3159-3165, 2021.

PAPP-WALLACE, Krisztina M. The latest advances in β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations for the treatment of Gram-negative bacterial infections. *Expert opinion on pharmacotherapy*, v. 20, n. 17, p. 2169-2184, 2019.

PATRICK, G. L.; SPENCER, J. An introduction to medicinal chemistry. Oxford university press, 2023.

PAUL, N. P.; GALVÁN, A. E.; YOSHINAGA-SAKURAI, K.; ROSEN, B. P.; YOSHINAGA, M. Arsenic in medicine: past, present and future. *Biometals*, v. 36, n. 2, p. 283-301, 2023.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia: Tradução da 4ª edição norteamericana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PAWAR, Hitesh S.; WAGH, Adhirath S.; LALI, Arvind M. Triethylamine: a potential N-base surrogate for pyridine in Knoevenagel condensation of aromatic aldehydes and malonic acid. *New Journal of Chemistry*, v. 40, n. 6, p. 4962-4968, 2016.

PEARSON, Ralph G. Hard and soft acids and bases. *Journal of the American Chemical society*, v. 85, n. 22, p. 3533-3539, 1963.

PERLMUTTER, P. Conjugate addition reactions in organic synthesis. Elsevier, 2013.

PODOLSKY, Scott H. The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). *Palgrave Communications*, v. 4, n. 1, 2018.

POOLE, Keith. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v. 61, p. 2200-2223, 2004.

POURSHOJAEI, Y.; ABIRI, A.; ESKANDARI, K.; HAGHIGHIJOO, Z.; EDRAKI, N.; ASADIPOUR, A. Phenoxyethyl piperidine/morpholine derivatives as PAS and CAS inhibitors of cholinesterases: insights for future drug design. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 19855, 2019.

PRESTINACI, Francesca; PEZZOTTI, Patrizio; PANTOSTI, Annalisa. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and global health*, v. 109, n. 7, p. 309-318, 2015.

PRINCIOTTO, S.; MAZZINI, S.; MUSSO, L.; ARENA, F.; DALLAVALLE, S.; PISANO, C. New antimicrobials based on the adarotene scaffold with activity against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Antibiotics*, v. 10, n. 2, p. 126, 2021.

RAMMELKAMP, Charles H.; MAXON, Thelma. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 51, n. 3, p. 386-389, 1942.

RANDICH, Amelia M.; BRUN, Yves V. Molecular mechanisms for the evolution of bacterial morphologies and growth modes. *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 580, 2015.

RANG, R.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. Rang & dale farmacologia. Elsevier Brasil, 2015.

RADKOV, A. D.; HSU, Y. P.; BOOHER, G.; VANNIEUWENHZE, M. S. Imaging bacterial cell wall biosynthesis. *Annual review of biochemistry*, v. 87, n. 1, p. 991-1014, 2018.

RAY, Sneha; MURKIN, Andrew S. New electrophiles and strategies for mechanism-based and targeted covalent inhibitor design. *Biochemistry*, v. 58, n. 52, p. 5234-5244, 2019.

READING, Chr; COLE, M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 11, n. 5, p. 852-857, 1977.

REMYA, T. M.; ASHA, T. M.; DEEPTI, A.; PRAKASH, P.; CHAKRAPANI, P. B.; PA, U.; AL-SEHEMI, A. G. Biological and Sensing Applications of a Few 1, 3, 4-Oxadiazole Based Donor-Acceptor Systems. *Journal of Fluorescence*, v. 33, n. 5, p. 2023-2039, 2023.

RICHARDSON, Paul G.; HIDESHIMA, Teru; ANDERSON, Kenneth C. Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer control*, v. 10, n. 5, p. 361-369, 2003.

ROTH, G. J. et al. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *The Journal of clinical investigation*, v. 56, n. 3, p. 624-632, 1975.

ROTONDO, Caitlyn M.; WRIGHT, Gerard D. Inhibitors of metallo- β -lactamases. *Current opinion in microbiology*, v. 39, p. 96-105, 2017.

SAUDAGAR, Parag S.; SURVASE, Shrikant A.; SINGHAL, Rekha S. Clavulanic acid: a review. *Biotechnology advances*, v. 26, n. 4, p. 335-351, 2008.

SHAIKH, S.; FATIMA, J.; SHAKIL, S.; RIZVI, S. M. D.; KAMAL, M. A. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi journal of biological sciences*, v. 22, n. 1, p. 90-101, 2015.

SHIRLEY, Matt. Dacomitinib: first global approval. *Drugs*, v. 78, p. 1947-1953, 2018.

SHLAES, David M. *Antibiotics: The perfect storm*. Springer Netherlands, 2010.

SILBERSTEIN, S. Zur frage der salvarsanresistenten lues. *Archiv für Dermatologie und Syphilis*, v. 147, n. 1, p. 116-130, 1924.

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X; KIEMLE, David J.; BRYCE, David L. *Spectrometric identification of organic compounds* (8^a ed). Rio de Janeiro: gen|LTC, 2019.

SKÖLD, Ola. *Antibiotics and antibiotic resistance*. John Wiley & Sons, 2011.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. *Principios de Análisis Instrumental* (sexta edición ed.). Cengage Learning, 2008.

SKOULIDIS, Ferdinandos et al. Sotorasib for lung cancers with KRAS p. G12C mutation. *New England Journal of Medicine*, v. 384, n. 25, p. 2371-2381, 2021.

SMITH, J. T.; HAMILTON-MILLER, J. M. T.; KNOX, R. Bacterial resistance to penicillins and cephalo-sporins. 1969.

STACHYRA, T.; LEVASSEUR, P.; PÉCHEREAU, M. C.; GIRARD, A. M.; CLAUDON, M.; MIOSSEC, C.; BLACK, M. T. In vitro activity of the β -lactamase inhibitor NXL104 against KPC-2 carbapenemase and Enterobacteriaceae expressing KPC carbapenemases. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 64, n. 2, p. 326-329, 2009.

STRELOW, John M. A perspective on the kinetics of covalent and irreversible inhibition. *SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D*, v. 22, n. 1, p. 3-20, 2017.

SYED, Yahiya Y. Zanubrutinib: first approval. *Drugs*, v. 80, n. 1, p. 91-97, 2020.

TAJIK, Mohammad; BAHARFAR, Mahroo; DONALD, William A. Single-cell mass spectrometry. *Trends in Biotechnology*, v. 40, n. 11, p. 1374-1392, 2022.

TAMARA, Sem; DEN BOER, Maurits A.; HECK, Albert JR. High-resolution native mass spectrometry. *Chemical Reviews*, v. 122, n. 8, p. 7269-7326, 2021.

THINIUS, M.; POLACZEK, C.; LANGNER, M.; BRÄKLING, S.; HAACK, A.; KERSTEN, H.; BENTER, T. Charge retention/charge depletion in ESI-MS: experimental evidence. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 31, n. 4, p. 773-784, 2020.

THOMAS, D. M.; ZALCBERG, J. R. 5-Fluorouracil: A pharmacological paradigm in the use of cytotoxics. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, v. 25, n. 11, p. 887-895, 1998.

THOMAS, K. J.; LIN, J. T.; HSU, Y. C.; HO, K. C. Organic dyes containing thienylfluorene conjugation for solar cells. *Chemical Communications*, n. 32, p. 4098-4100, 2005.

TOOKE, C. L.; HINCHLIFFE, P.; BRAGGINTON, E. C.; COLENSO, C. K.; HIRVONEN, V. H.; TAKEBAYASHI, Y.; SPENCER, J. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of molecular biology*, v. 431, n. 18, p. 3472-3500, 2019.

TOKOROYAMA, Takashi. Discovery of the Michael reaction. 2010.

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. *Microbiologia*. 12^a Edição. Artmed Editora: Porto Alegre, 2017.

TREFFERS, Henry P. Studies on Resistance to Antibiotics: I. The Action of Penicillin on Some Gram-positive and Gram-negative Organisms and its Potentiation by Various Inhibitors. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 18, n. 6, p. 609, 1946.

TRUONG, T. P.; BAILEY, S. J.; GOLLIHER, A. E.; MONROY, E. Y.; SHRESTHA, U. K.; MAIO, W. A. Exploiting Carvone To Demonstrate Both Stereocontrol and Regiocontrol: 1, 2- vs 1, 4-Addition of Grignard Reagents and Organocuprates. *Journal of Chemical Education*, v. 95, n. 3, p. 438-444, 2018.

TSUCHIDA, Sachio; UMEMURA, Hiroshi; NAKAYAMA, Tomohiro. Current status of matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. *Molecules*, v. 25, n. 20, p. 4775, 2020.

VAN BEURDEN, K.; DE KONING, S.; MOLENDIJK, D.; VAN SCHIJNDEL, J. The Knoevenagel reaction: a review of the unfinished treasure map to forming carbon–carbon bonds. *Green chemistry letters and reviews*, v. 13, n. 4, p. 349-364, 2020.

VARELA, M. F.; STEPHEN, J.; LEKSHMI, M.; OJHA, M.; WENZEL, N.; SANFORD, L. M.; HERNANDEZ, A. J.; PARVATHI, A.; KUMAR, S. H. Bacterial resistance to antimicrobial agents. *Antibiotics*, v. 10, n. 5, p. 593, 2021.

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

VELUSAMY, M.; JUSTIN THOMAS, K. R.; LIN, J. T.; HSU, Y. C.; HO, K. C. Organic dyes incorporating low-band-gap chromophores for dye-sensitized solar cells. *Organic Letters*, v. 7, n. 10, p. 1899-1902, 2005.

VENKATRAMAN, Srikanth. Discovery of boceprevir, a direct-acting NS3/4A protease inhibitor for treatment of chronic hepatitis C infections. *Trends in pharmacological sciences*, v. 33, n. 5, p. 289-294, 2012.

VRBANAC, Jim; SLAUTER, Richard. ADME in drug discovery. In: *A comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development*. Academic Press, 2017. p. 39-67.

WALLMARK, Björn; BRÄNDSTRÖM, Arne; LARSSON, Håkan. Evidence for acid-induced transformation of omeprazole into an active inhibitor of (H⁺⁺ K⁺)-ATPase within the parietal cell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 778, n. 3, p. 549-558, 1984.

WANG, J., DONG, X., SHAO, Y., GUO, H., PAN, L., HUI, W., KWOK, L.; ZHANG, H.; ZHANG, W. WANG, Jicheng et al. Genome adaptive evolution of *Lactobacillus casei* under long-term antibiotic selection pressures. *BMC genomics*, v. 18, p. 1-8, 2017.

WANG, Z.; FAST, W.; VALENTINE, A. M.; BENKOVIC, S. J. Metallo- β -lactamase: structure and mechanism. *Current opinion in chemical biology*, v. 3, n. 5, p. 614-622, 1999.

WANNER, Klaus T.; HÖFNER, Georg (Ed.). *Mass spectrometry in medicinal chemistry*. New York: Wiley-VCH, 2007.

WATSON, J. Throc; SPARKMAN, O. David. *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation*. John Wiley & Sons, 2007.

WHO (World Health Organization). Antimicrobial resistance, 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>, a. Acesso em: 13 de julho de 2024.

WHO (World Health Organization). WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance, 2024. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>>, b. Acesso em: 13 de julho de 2024.

WU, Jingjing; ZHANG, Mingzhi; LIU, Delong. Acalabrutinib (ACP-196): a selective secondgeneration BTK inhibitor. *Journal of hematology & oncology*, v. 9, n. 1, p. 1-4, 2016.

YANG, G.; MI, X.; WANG, Y.; LI, S.; YU, L.; TAN, S.; YU, H. Fusion of Michael-acceptors enhances the anti-inflammatory activity of ginsenosides as potential modulators of the NLRP3 signaling pathway. *Bioorganic Chemistry*, v. 134, p. 106467, 2023.

YENDURI, Suvarna; SULTHANA, Huma; KOPPURAVURI, Naga Prashant. Sustainability evaluation of existed HPLC based analytical methods for quantification of amlodipine besylate and telmisartan using rgb model: A whiteness approach. *Green Analytical Chemistry*, p. 100074, 2023.

YU, W.; ZHAO, Y.; YE, H.; WU, N.; LIAO, Y.; CHEN, N.; LI, Z.; WAN, N.; HAO, H.; YAN, H.; XIAO, Y.; LAI, M. Structure-based design of a dual-targeted covalent inhibitor against papain-like and main proteases of SARS-CoV-2. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 65, n. 24, p. 16252-16267, 2022.

ZENG, Ximin; LIN, Jun. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Frontiers in microbiology*, v. 4, p. 128, 2013.

ZHANG, Wei. Intramolecular free radical conjugate additions. *Tetrahedron*, v. 57, n. 34, p. 7237-7262, 2001.

ZHANG, ZHOUPENG; TANG, WEI. Drug metabolism in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 8, n. 5, p. 721-732, 2018.

ZHAO, Hongping; YUAN, Weiming. Three-component reductive conjugate addition/aldol tandem reaction enabled by nickel/photoredox dual catalysis. *Chemical Science*, v. 14, n. 6, p. 1485-1490, 2023.

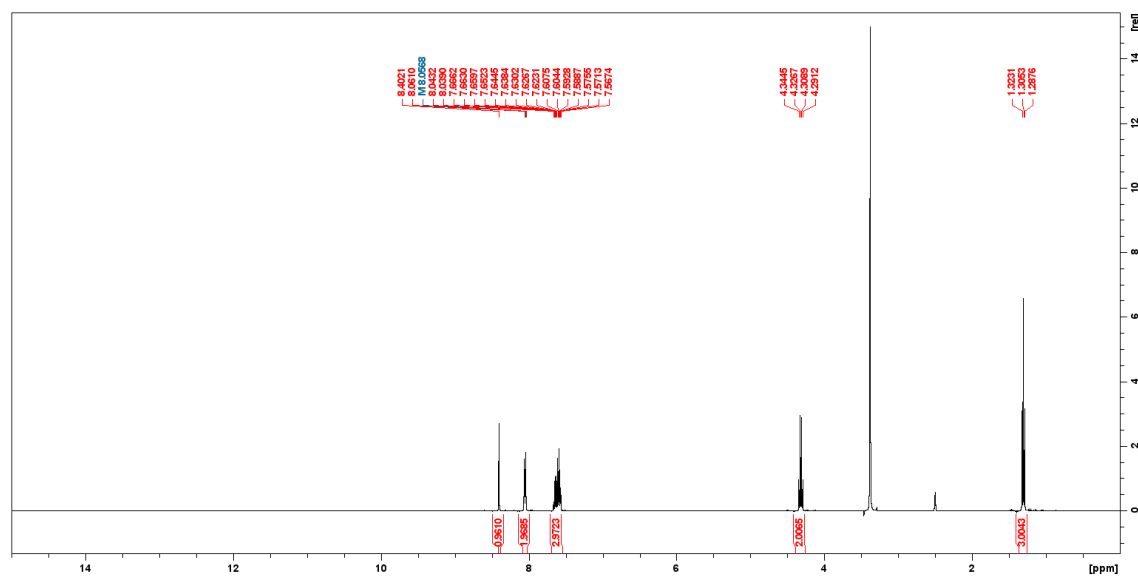
ZHEN, X.; LUNDBORG, C. S.; SUN, X.; HU, X.; DONG, H. Economic burden of antibiotic resistance in ESKAPE organisms: a systematic review. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v. 8, p. 1-23, 2019.

ZHEN, X.; STÅLSBY LUNDBORG, C.; SUN, X.; ZHU, N.; GU, S.; DONG, H. Economic burden of antibiotic resistance in China: a national level estimate for inpatients. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v. 10, p. 1-9, 2021.

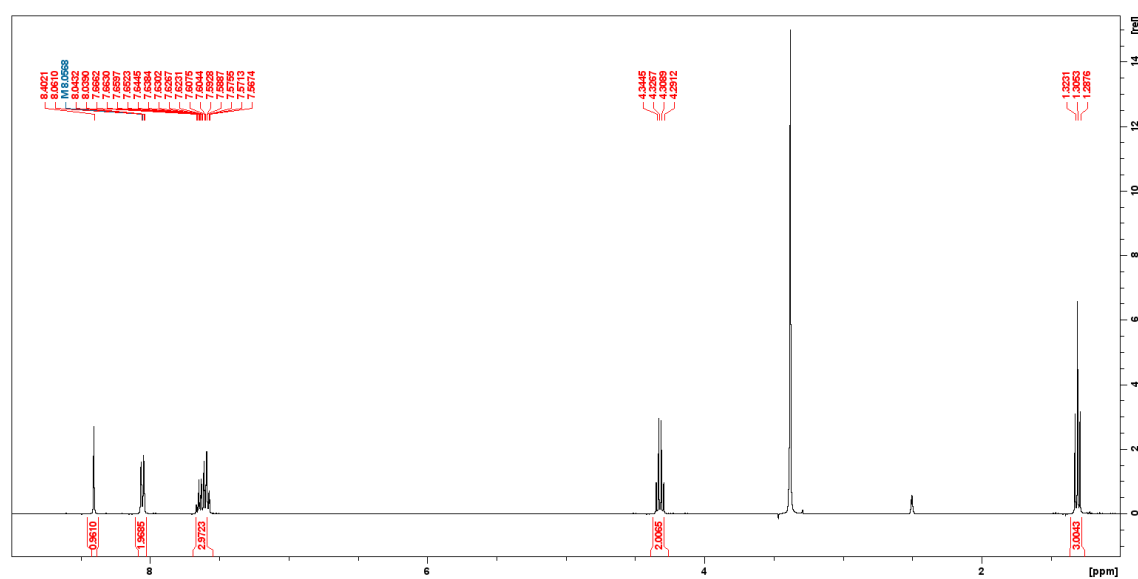
8 ANEXOS

8.1 Anexo A

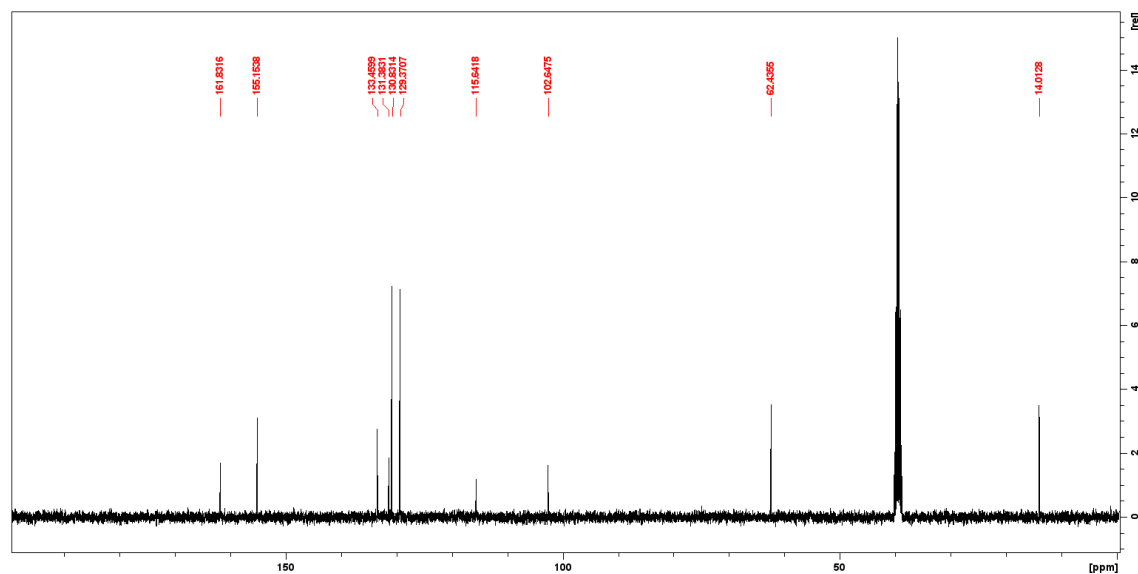
Espectro de RMN ^1H do composto (a1) (400MHz, DMSO- d_6)



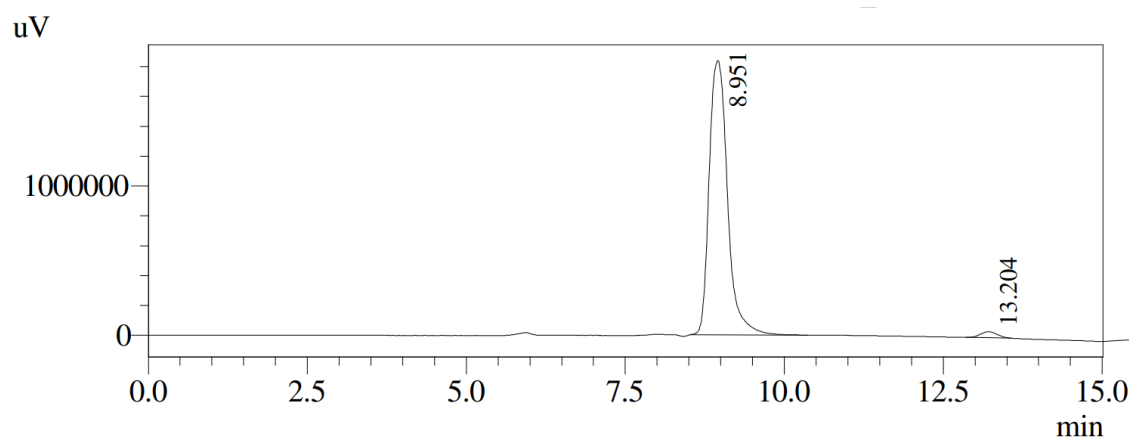
Ampliação de δ 1.0-9.0 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (a1) (400MHz, DMSO- d_6)



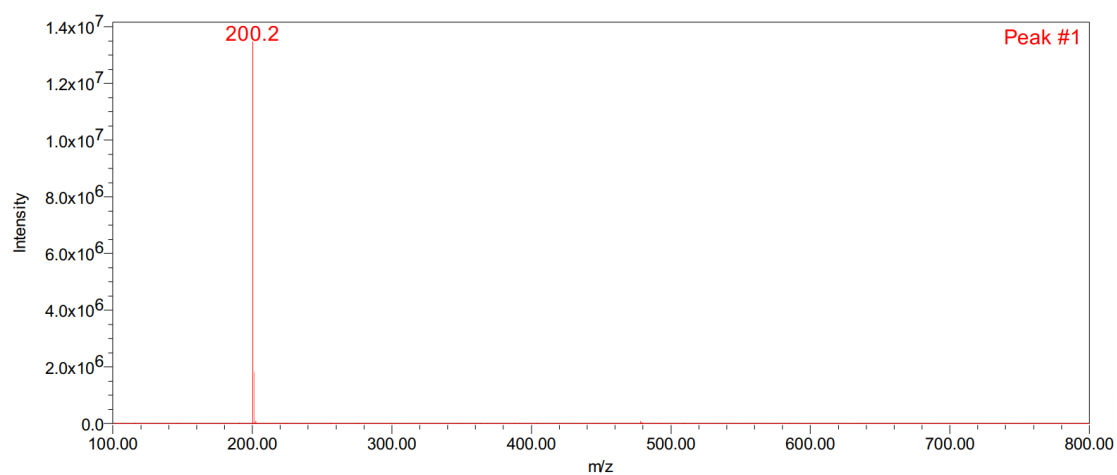
Espectro de RMN ^{13}C do composto (a1) (100 MHz, DMSO- d_6)



Cromatograma de HPLC do composto (a1)



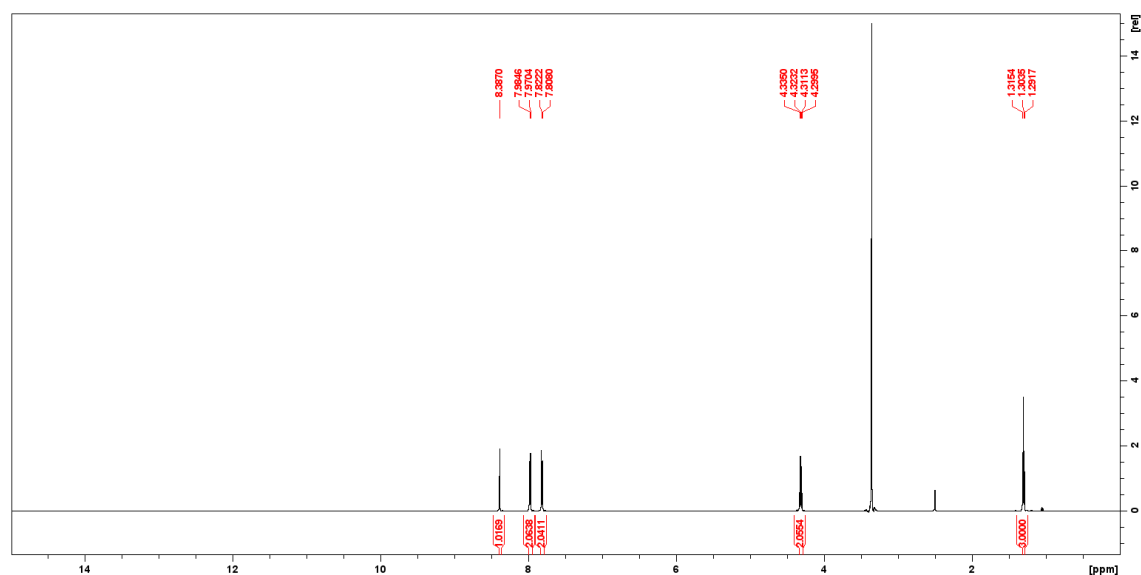
Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (a1)



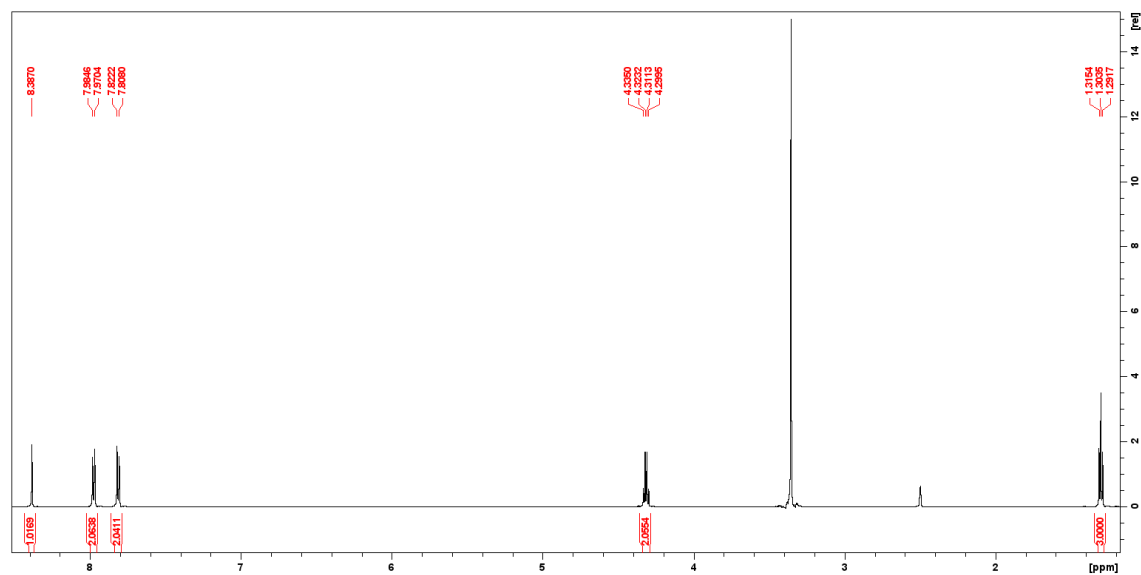
HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_2$): 201.23; encontrado ($[\text{M}-\text{H}]^-$): 200.20.

8.2 Anexo B

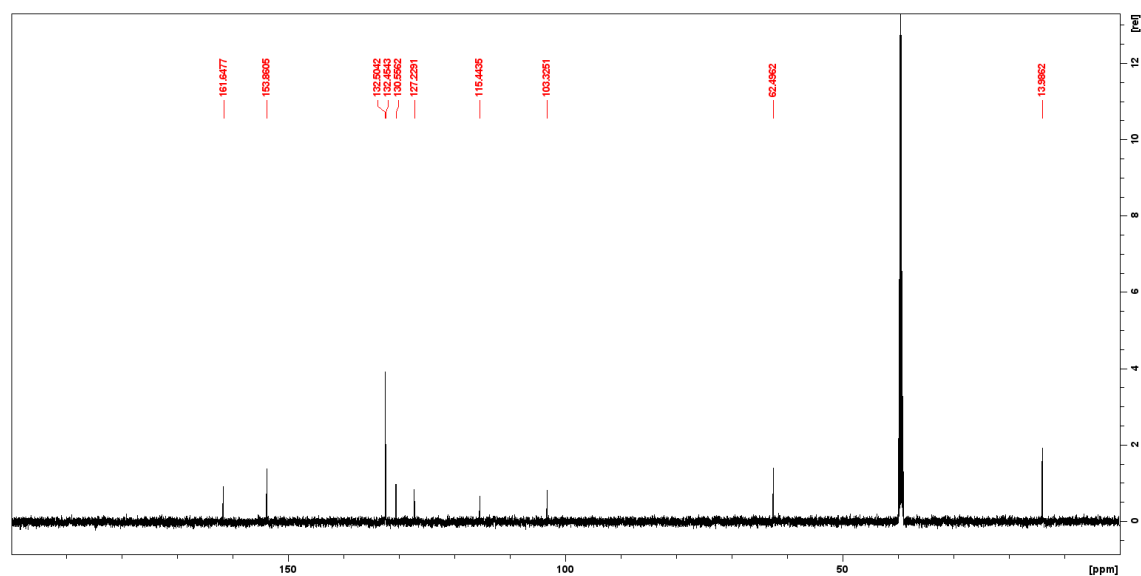
Espectro de RMN ^1H do composto (a2) (600MHz, DMSO- d_6)



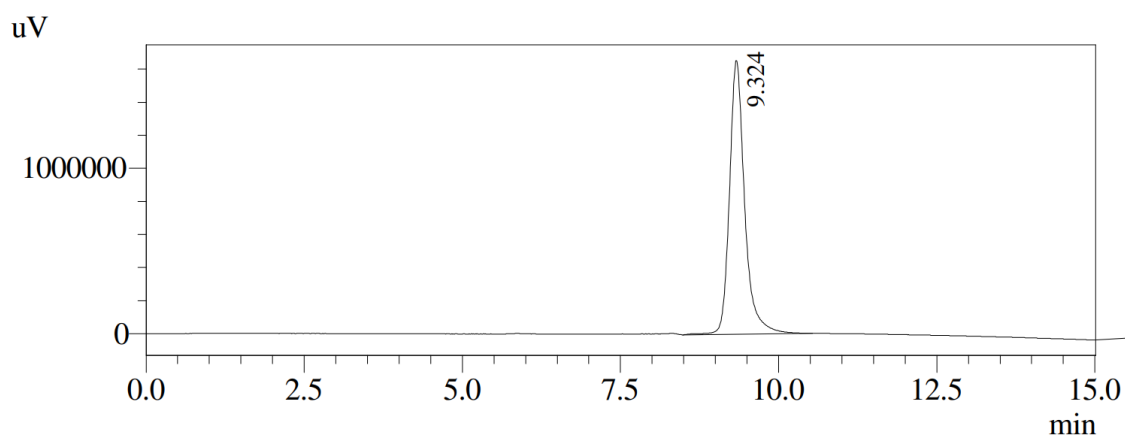
Ampliação de δ 1.0-8.50 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (a2) (600MHz, DMSO- d_6)



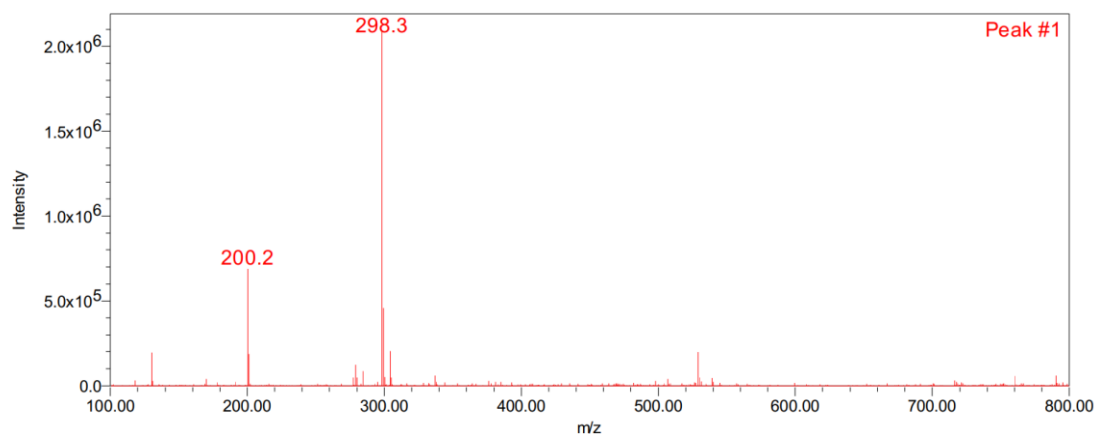
Espectro de RMN ^{13}C do composto (a2) (150 MHz, DMSO- d_6)



Cromatograma de HPLC do composto (a2)



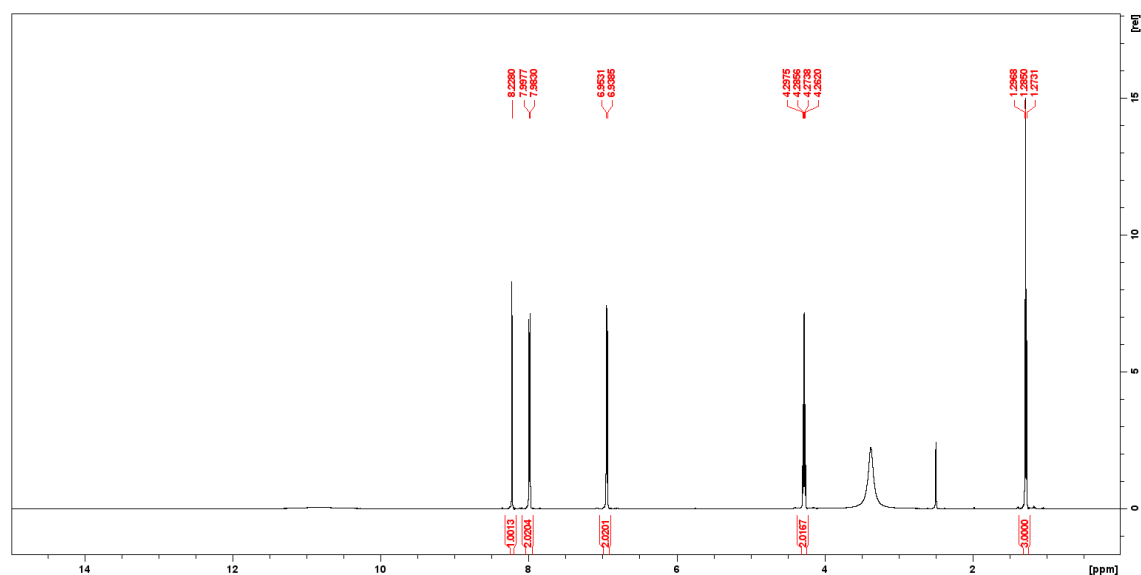
Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (a2)



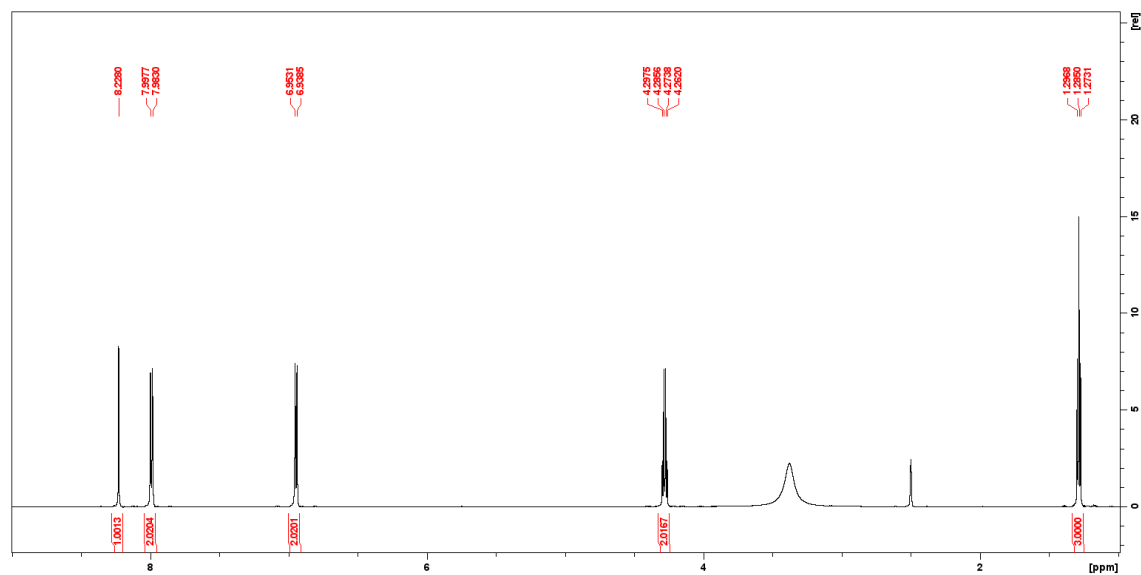
HMRS ESI⁺ (m/z): calculado para ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{BrNO}_3$): 299.12; encontrado ($[\text{M}+\text{H}+\text{H}_2\text{O}]^+$): 298.30.

8.3 Anexo C

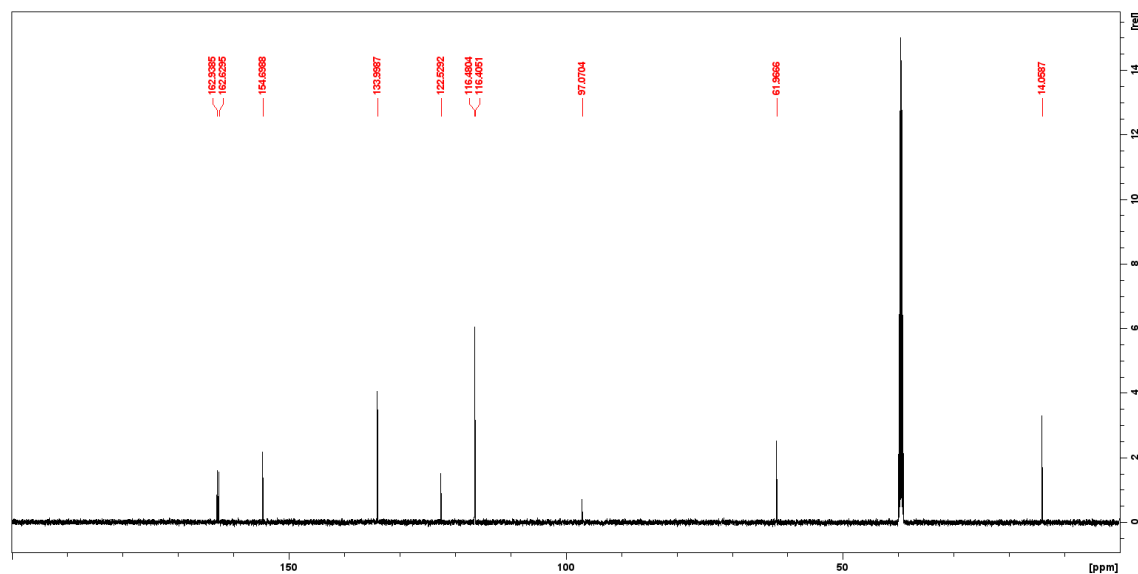
Espectro de RMN ^1H do composto (a3) (600MHz, DMSO- d_6)



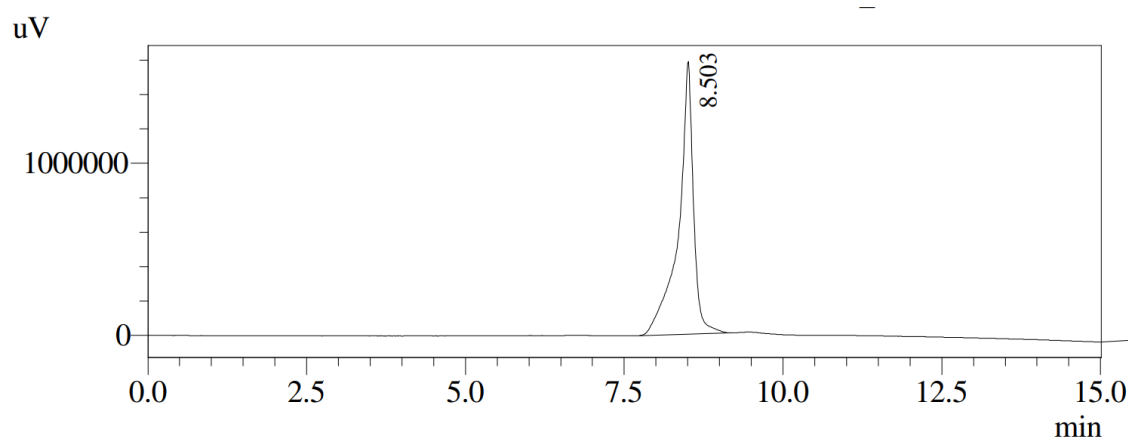
Ampliação de δ 1.0-9.0 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (a3) (600MHz, DMSO- d_6)



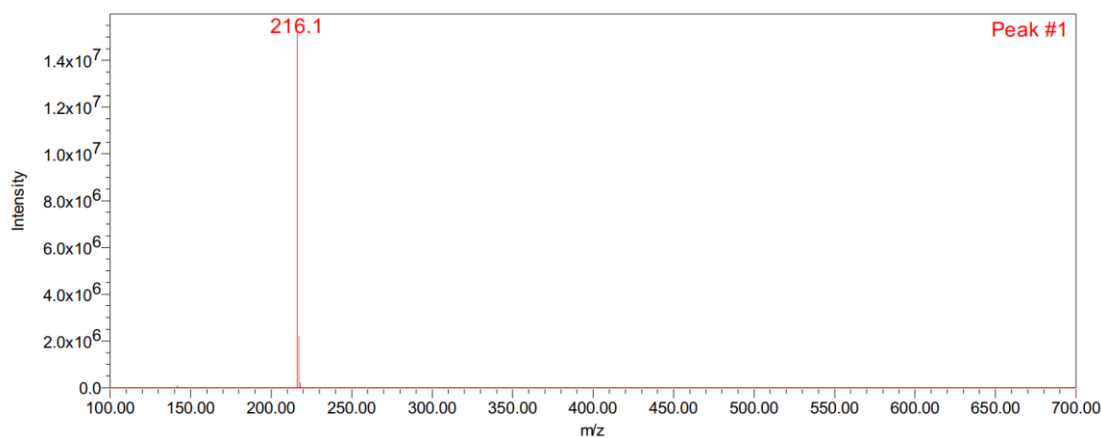
Espectro de RMN ^{13}C do composto (a3) (150 MHz, DMSO- d_6)



Cromatograma de HPLC do composto (a3)



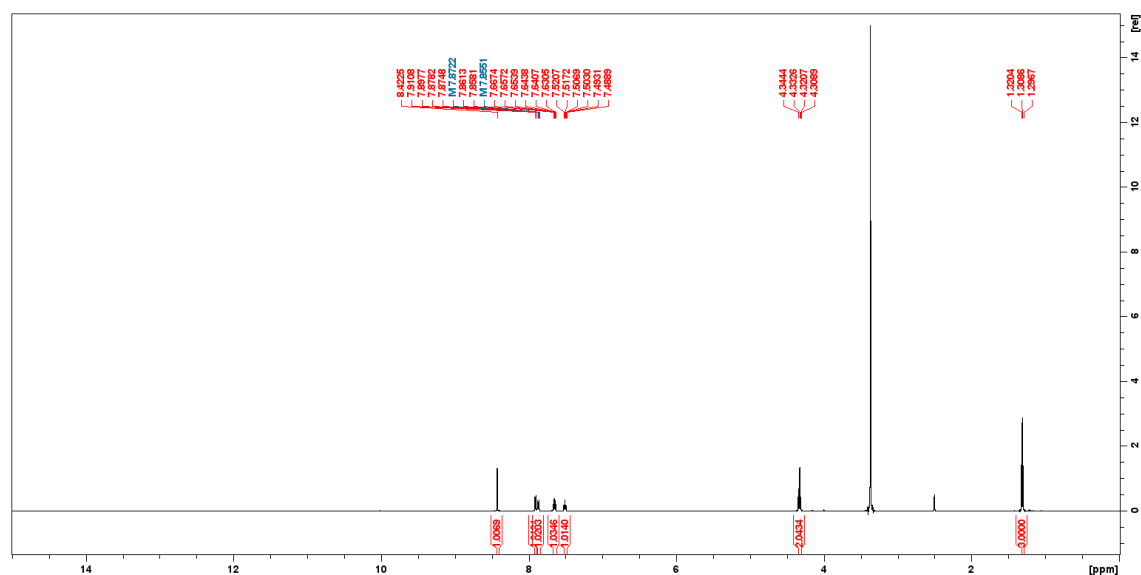
Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (a3)



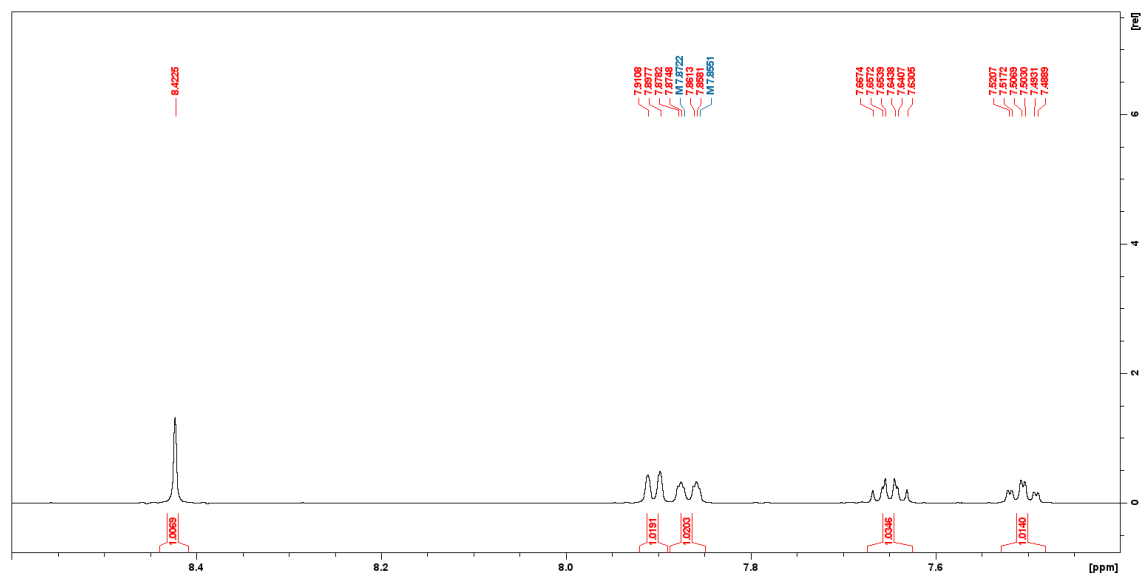
HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_3$): 217.22; encontrado ($[\text{M}-\text{H}]^-$): 216.10.

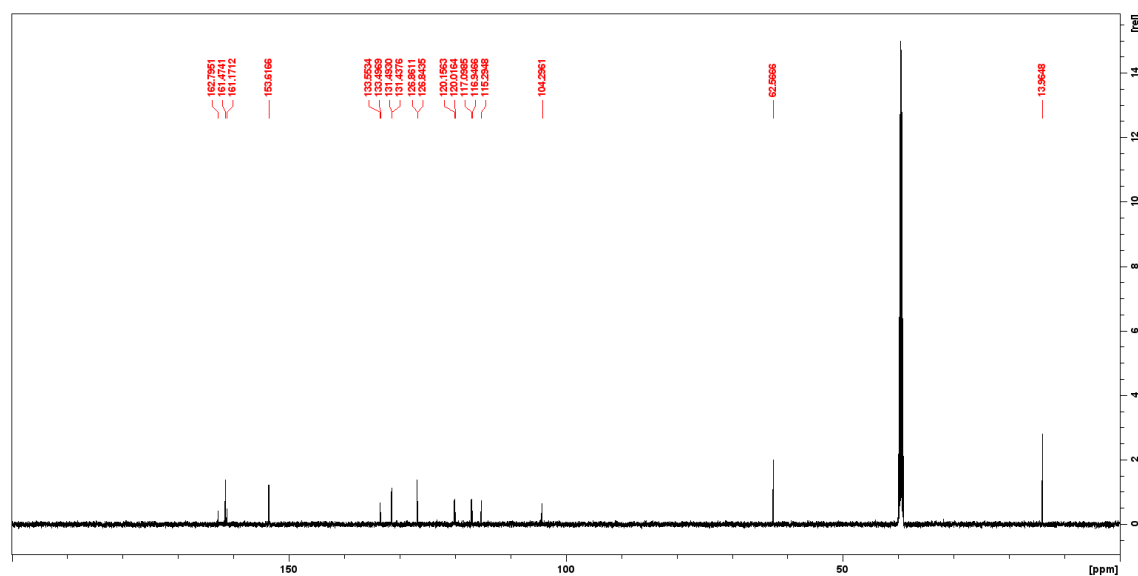
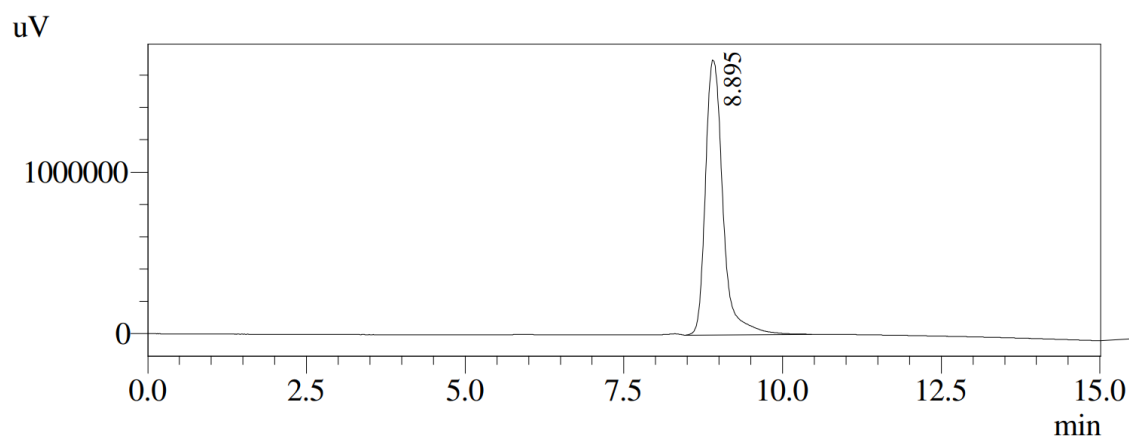
8.4 Anexo D

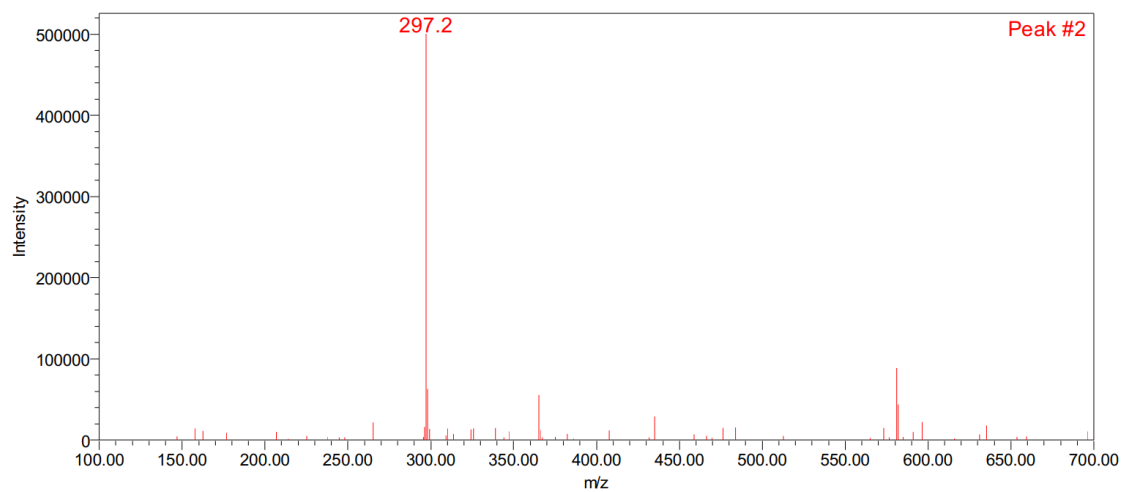
Espectro de RMN ^1H do composto (a4) (600MHz, DMSO- d_6)



Ampliação de δ 7.40-8.50 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (a4) (600MHz, DMSO- d_6)



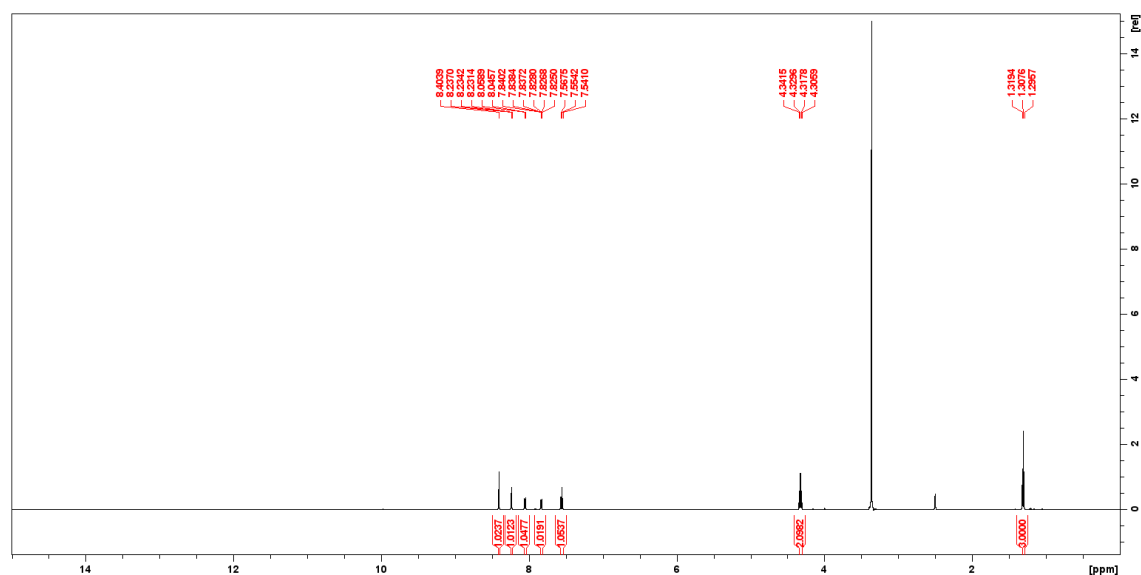
Espectro de RMN ^{13}C do composto (a4) (150 MHz, DMSO- d_6)**Cromatograma de HPLC do composto (a4)**

Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (a4)

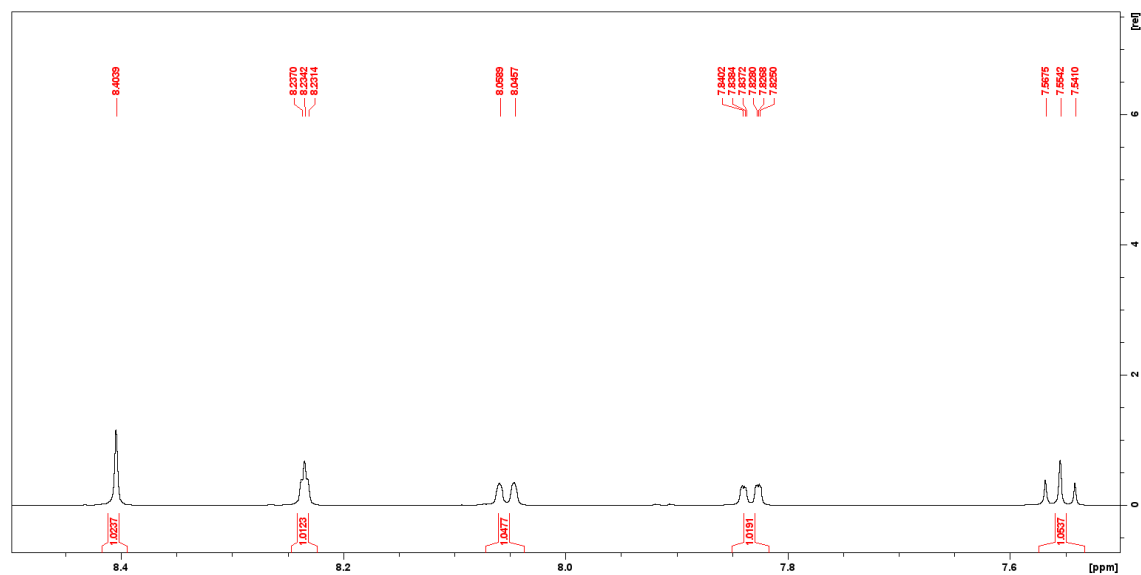
HMRS ESI+ (m/z): calculado para ($C_{12}H_{10}FNO_2K_2$): 298.22; encontrado ($[M+H+2K]^+$): 297.20.

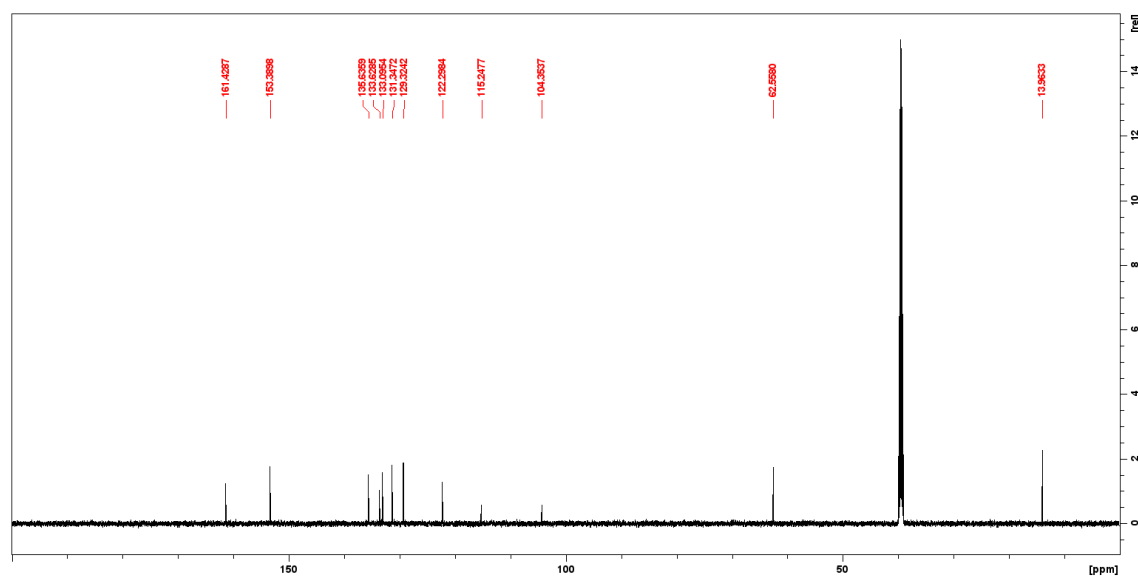
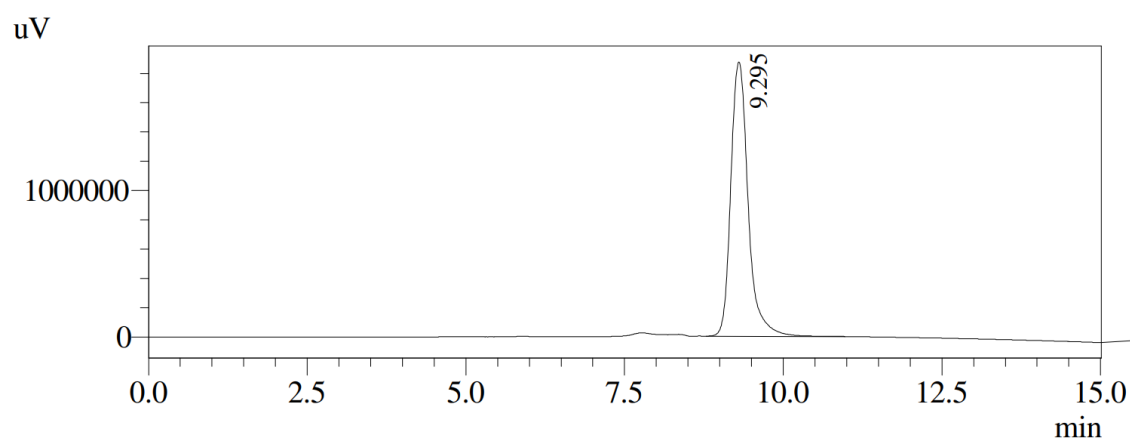
8.5 Anexo E

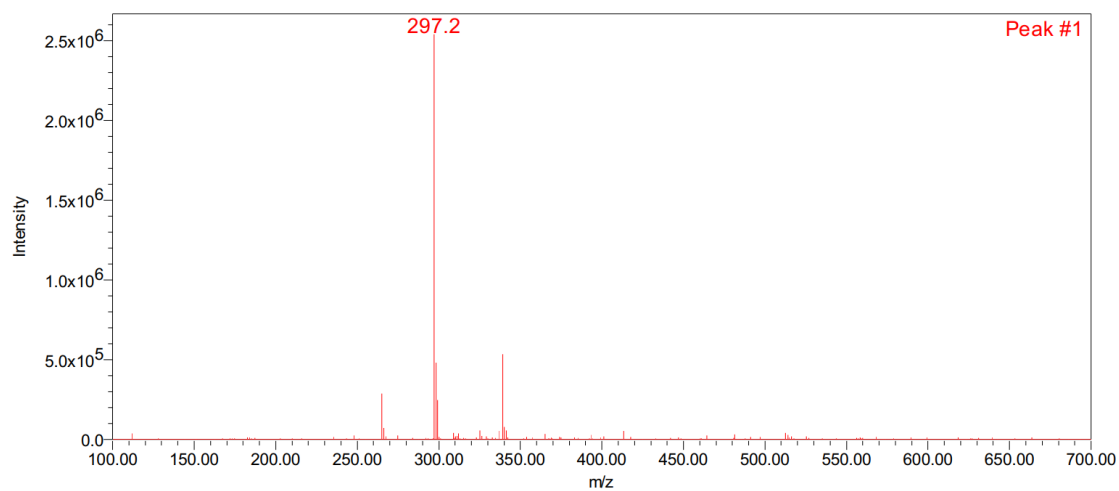
Espectro de RMN ^1H do composto (a5) (600MHz, DMSO- d_6)



Ampliação de δ 7.50-8.50 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (a5) (600MHz, DMSO- d_6)



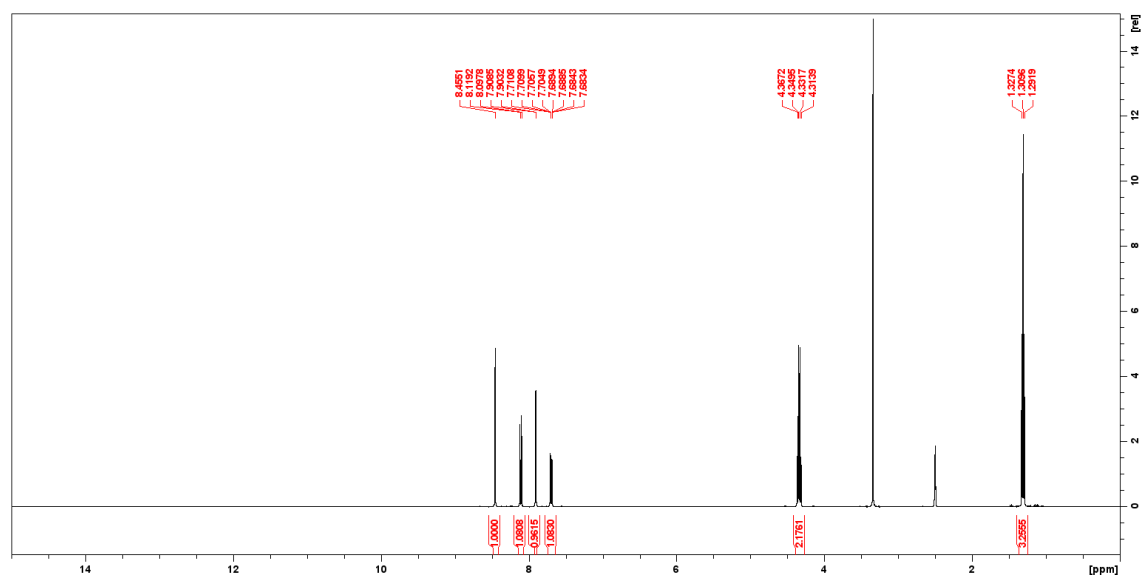
Espectro de RMN ^{13}C do composto (a5) (150 MHz, DMSO- d_6)**Cromatograma de HPLC do composto (a5)**

Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (a5)

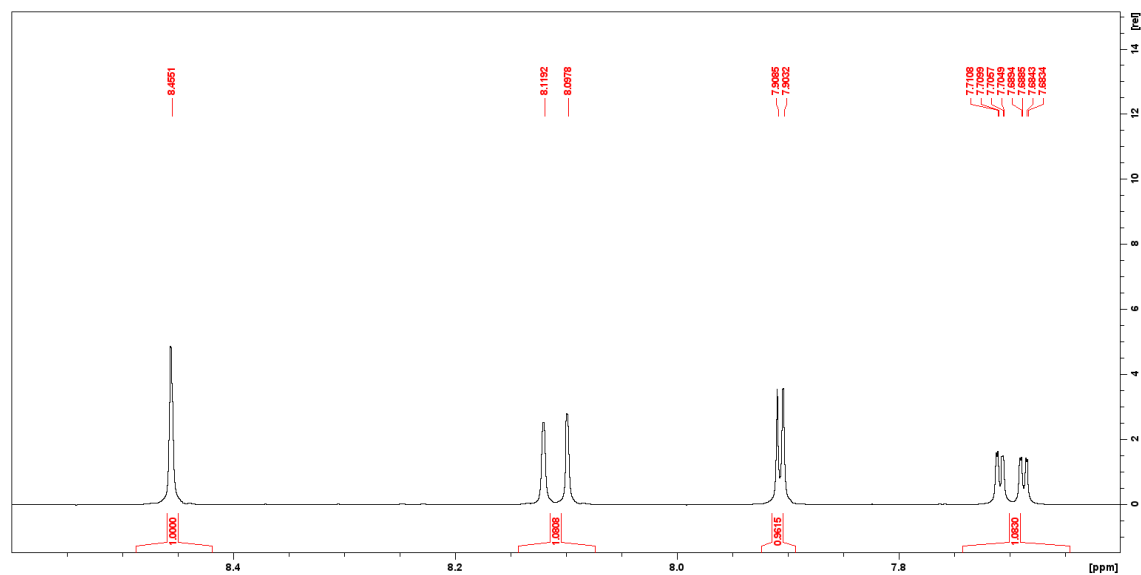
HMRS ESI+ (m/z): calculado para ($C_{12}H_{12}BrNO_3$): 299.12; encontrado ($[M+H+H_2O]^+$): 297.20.

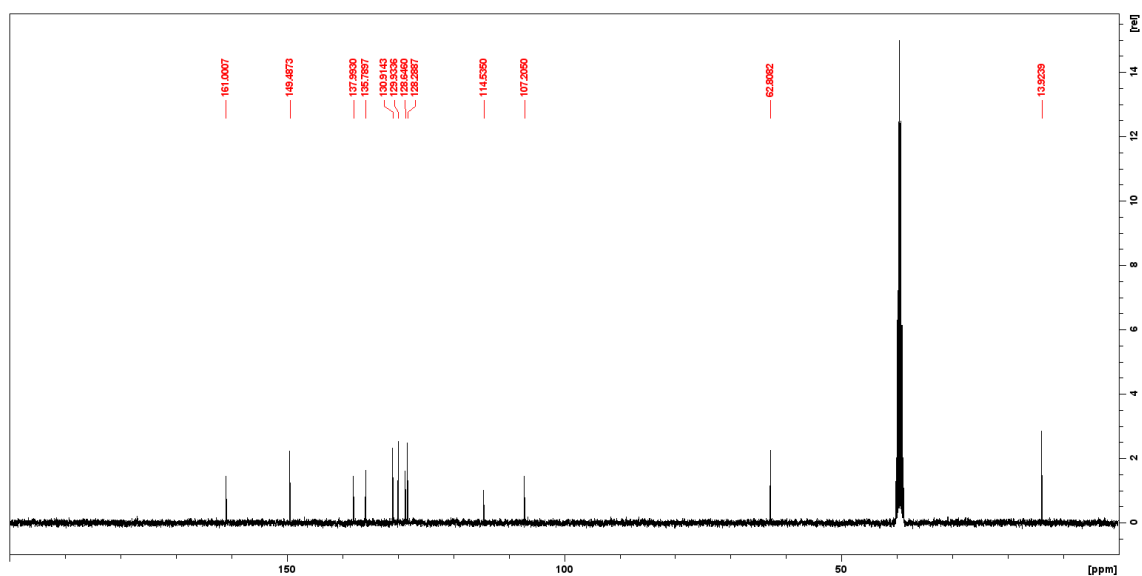
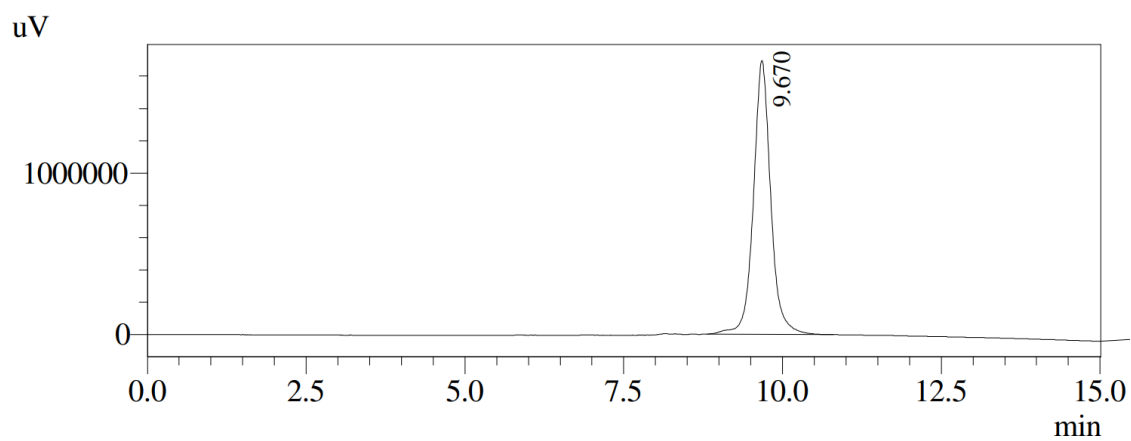
8.6 Anexo F

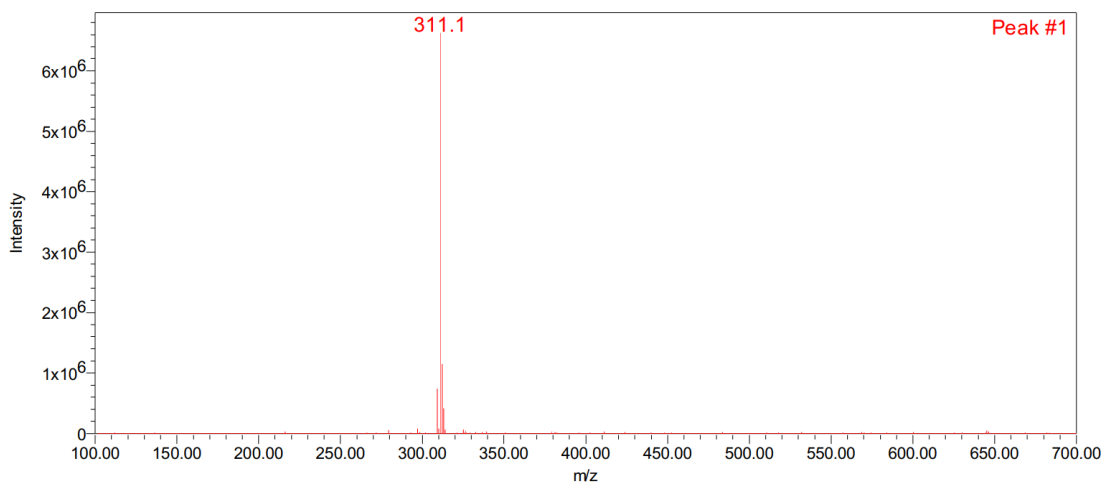
Espectro de RMN ^1H do composto (a6) (400MHz, DMSO- d_6)



Ampliação de δ 7.6-8.6 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (a6) (400MHz, DMSO- d_6)



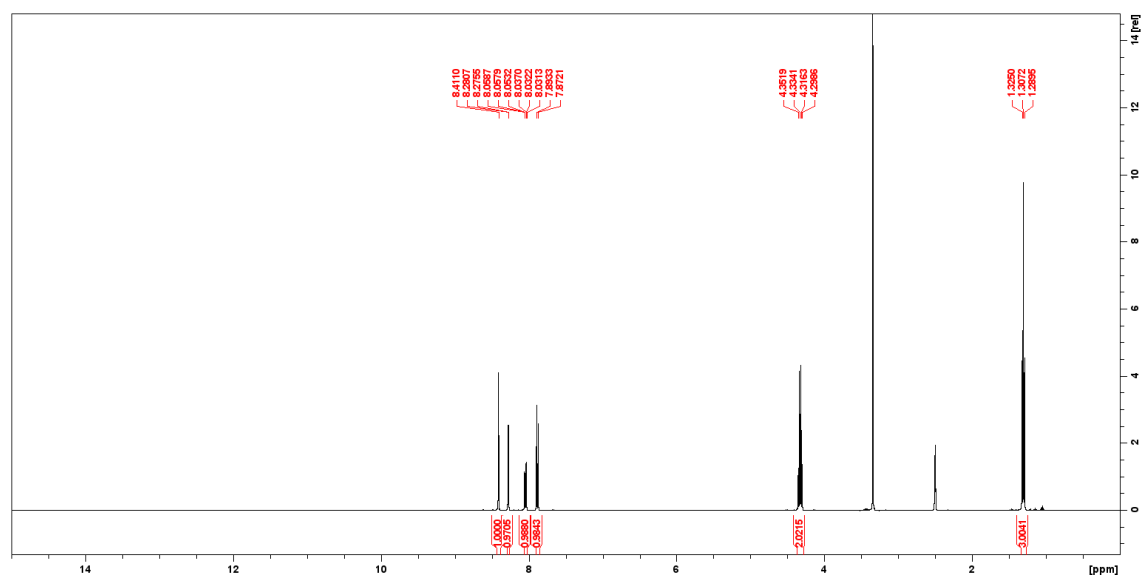
Espectro de RMN ^{13}C do composto (a6) (100 MHz, DMSO- d_6)**Cromatograma de HPLC do composto (a6)**

Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (a6)

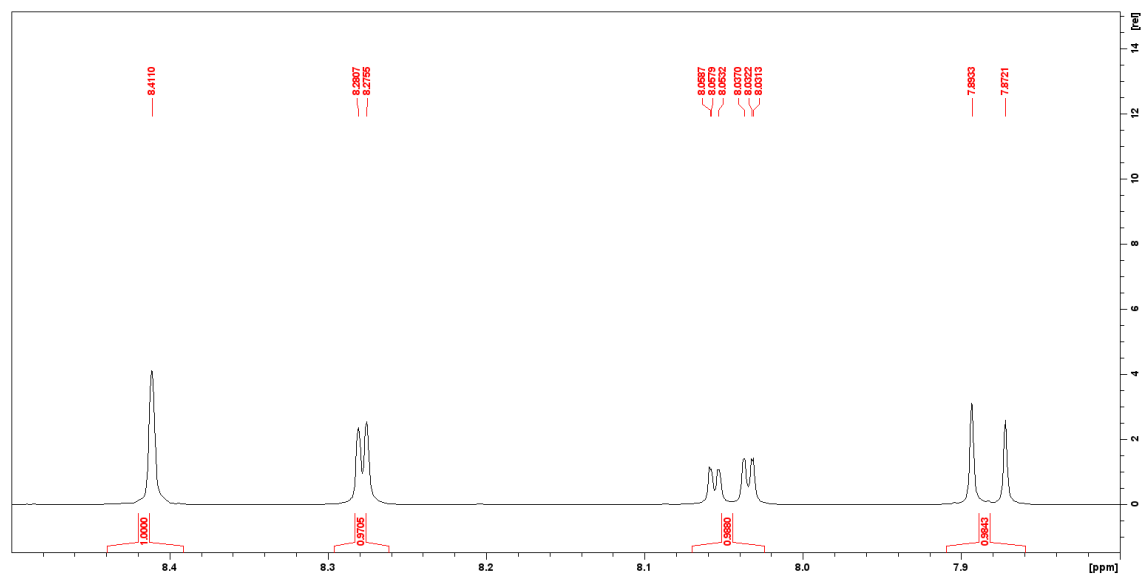
HMRS ESI⁺ (m/z): calculado para (C₁₄H₁₂Cl₂N₂O₂): 312.11; encontrado ([M+H+CH₃CN]⁺): 311.10.

8.7 Anexo G

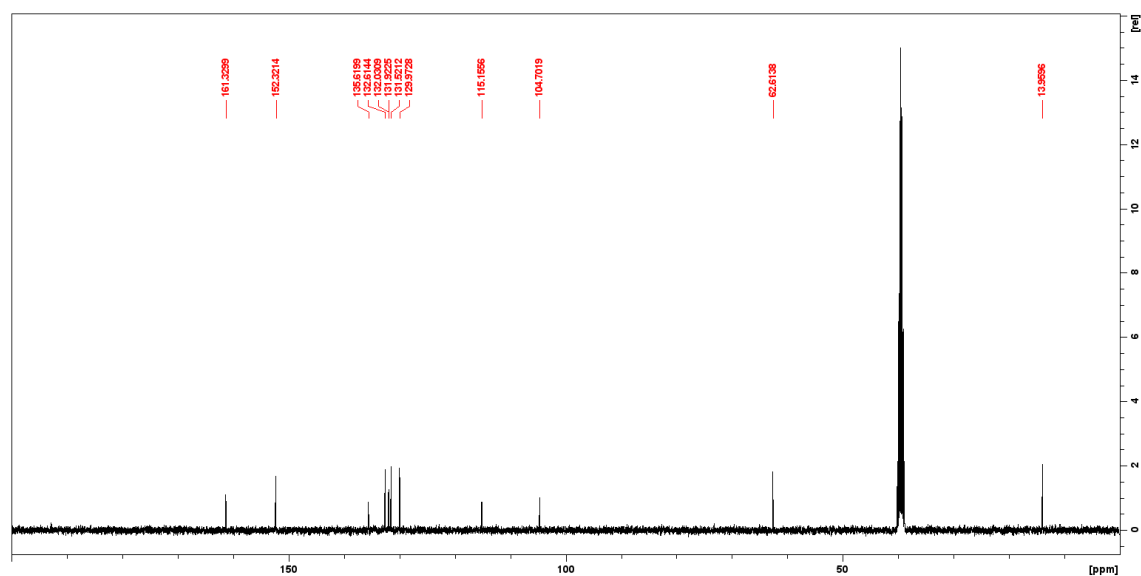
Espectro de RMN ^1H do composto (a7) (400MHz, DMSO- d_6)



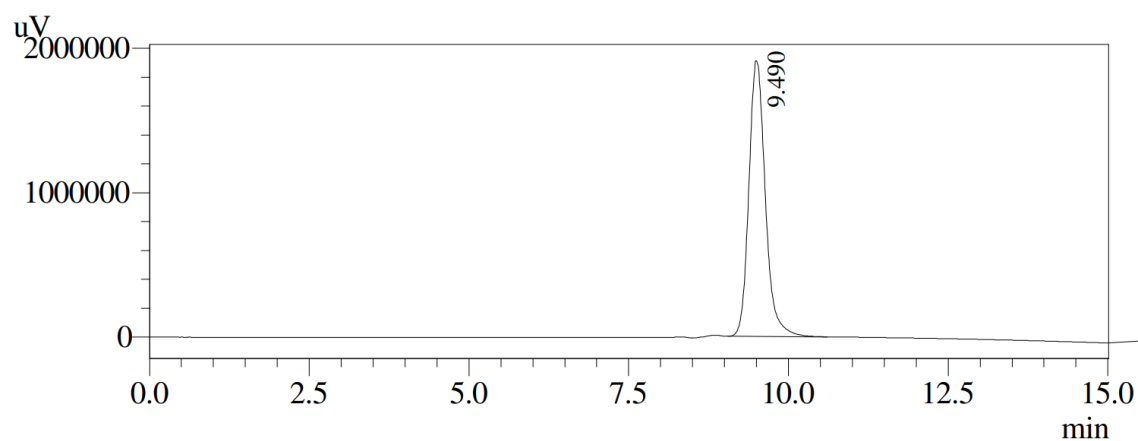
Ampliação de δ 7.8-8.5 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (a7) (400MHz, DMSO- d_6)



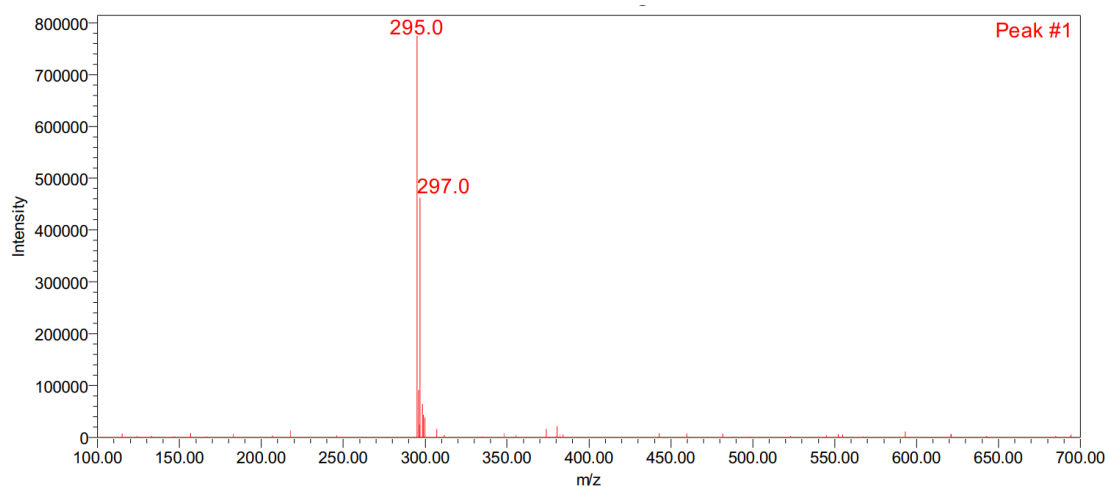
Espectro de RMN ^{13}C do composto (a7) (100 MHz, DMSO- d_6)



Cromatograma de HPLC do composto (a7)



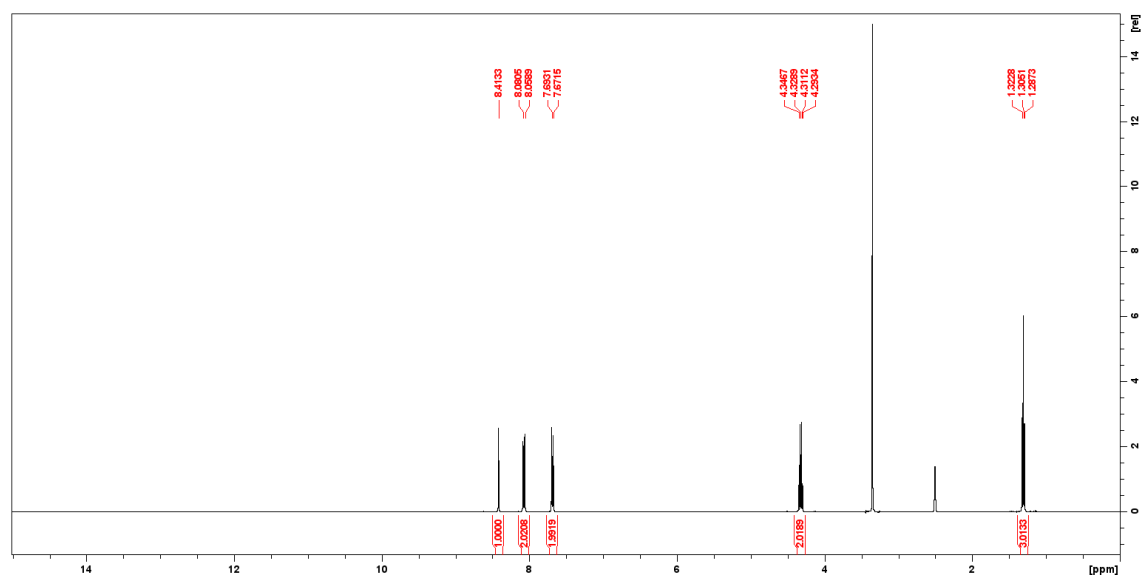
Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (a7)



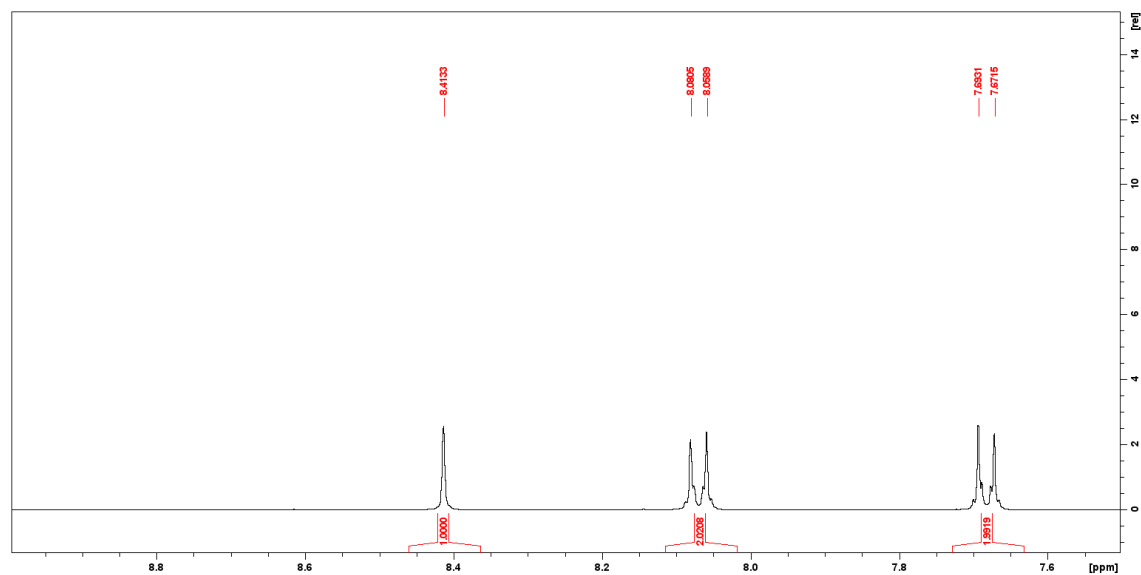
HMRS ESI+ (m/z): calculado para ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{Na}$): 294.11; encontrado ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^+$): 295.00.

8.8 Anexo H

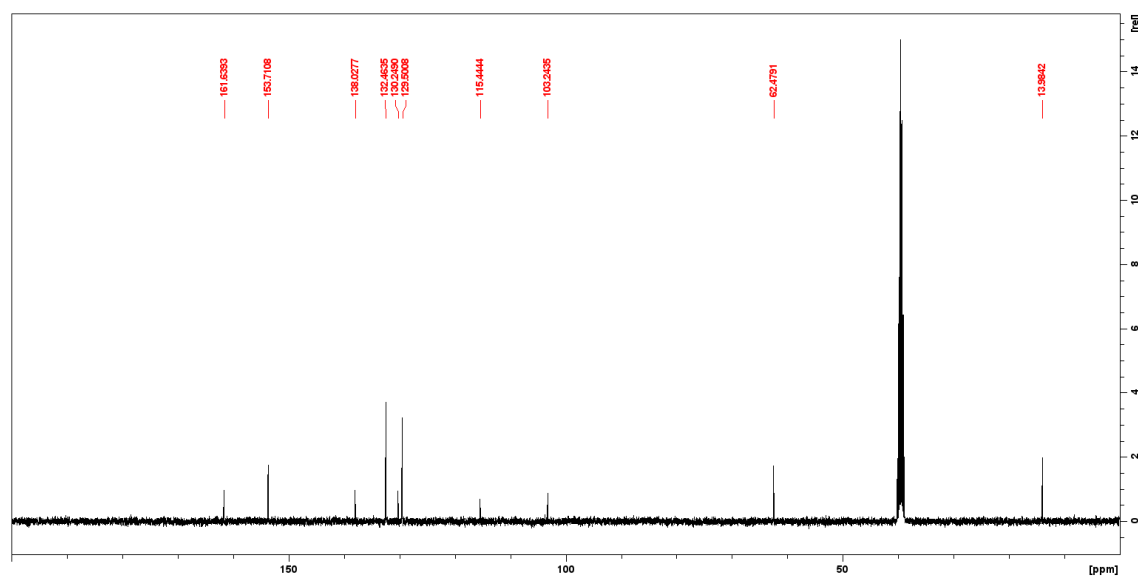
Espectro de RMN ^1H do composto (a8) (400MHz, DMSO- d_6)



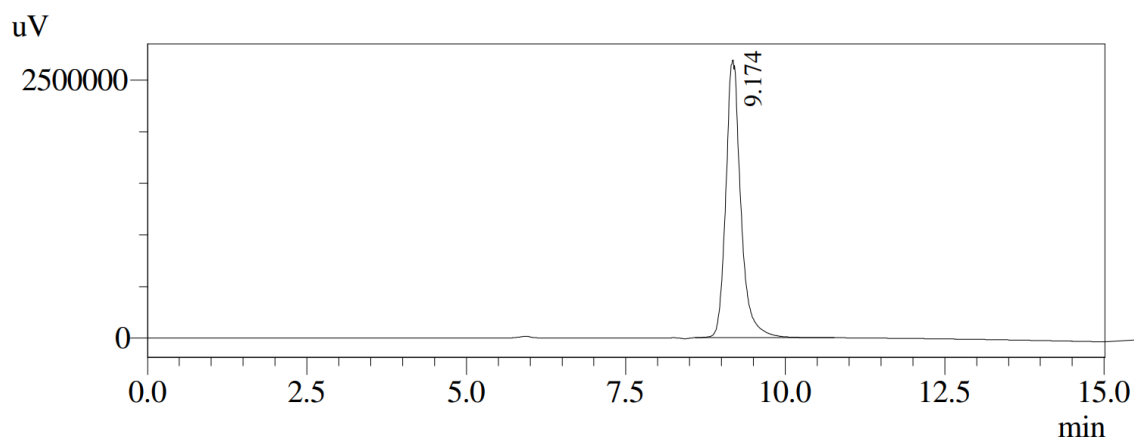
Ampliação de δ 7.50-9.0 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (a8) (400MHz, DMSO- d_6)



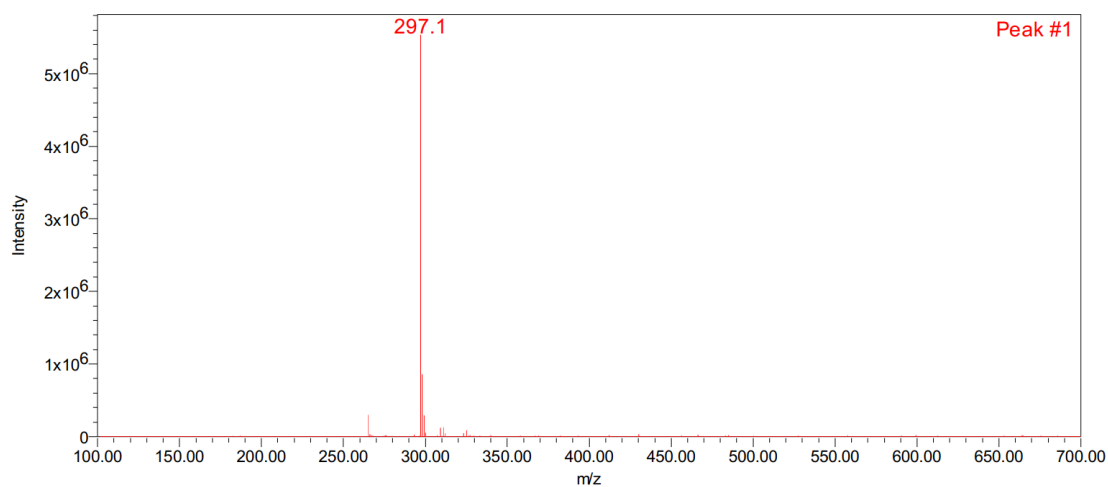
Espectro de RMN ^{13}C do composto (a8) (100 MHz, DMSO- d_6)



Cromatograma de HPLC do composto (a8)

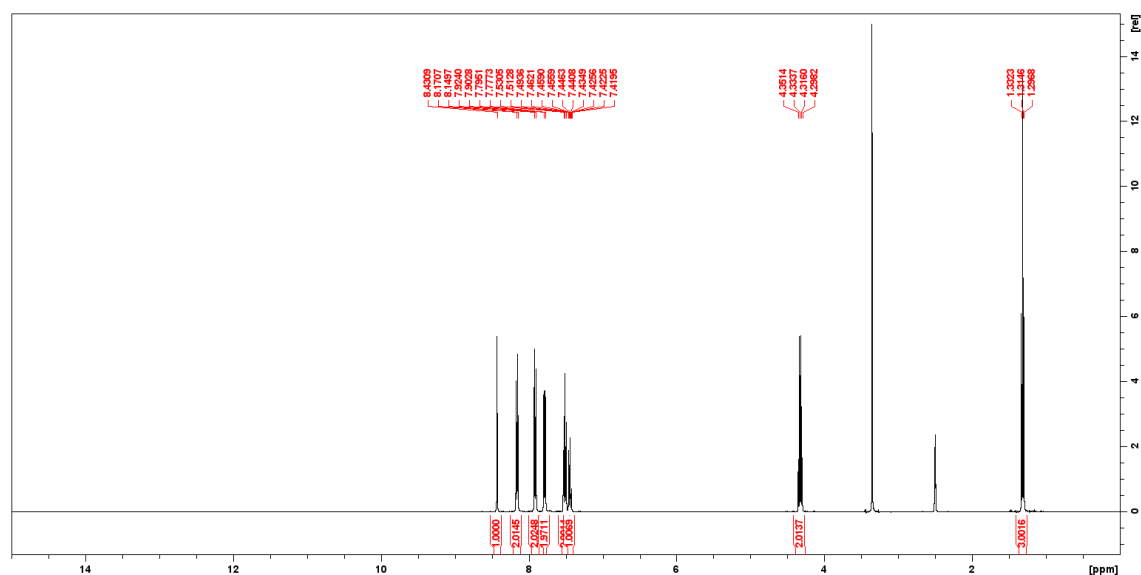
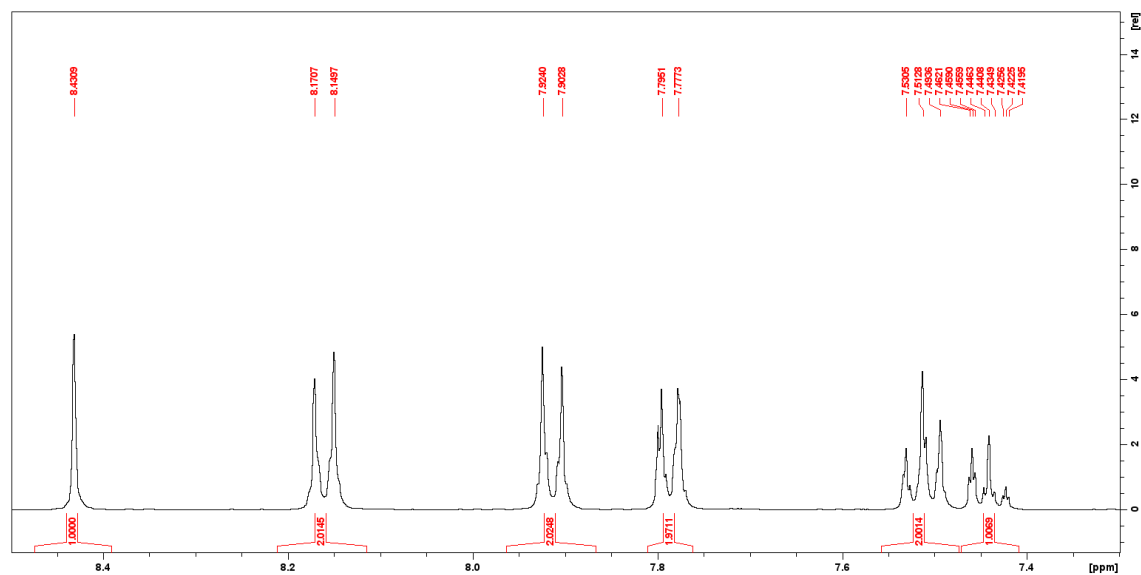


Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (a8)

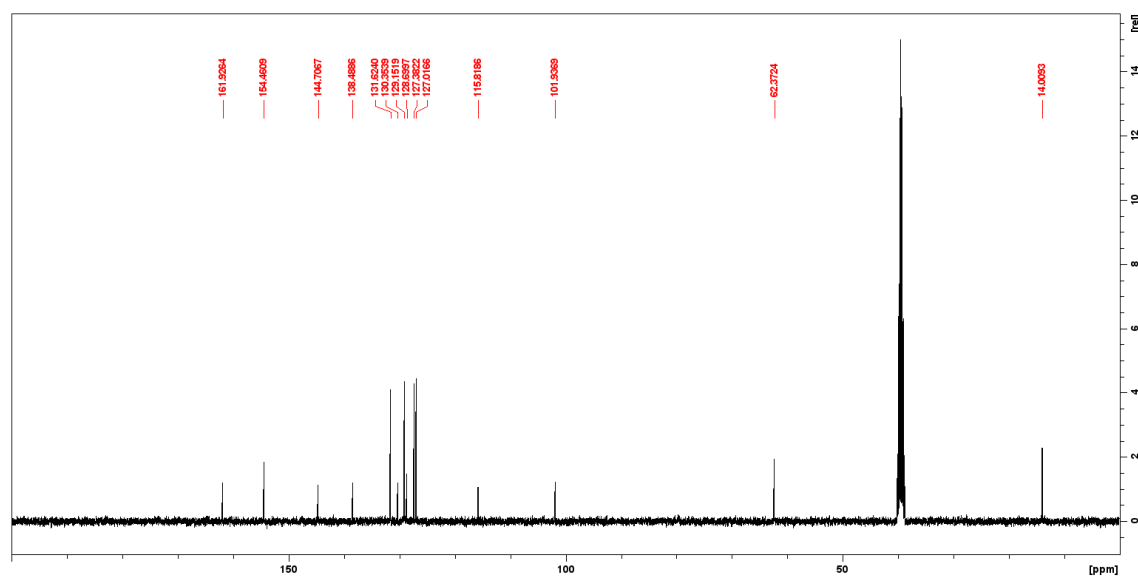


HMRS ESI+ (m/z): calculado para $(\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{Na})$: 300.67; encontrado $([\text{M}+\text{H}+\text{Na}+\text{CH}_3\text{CN}]^+)$: 297.10.

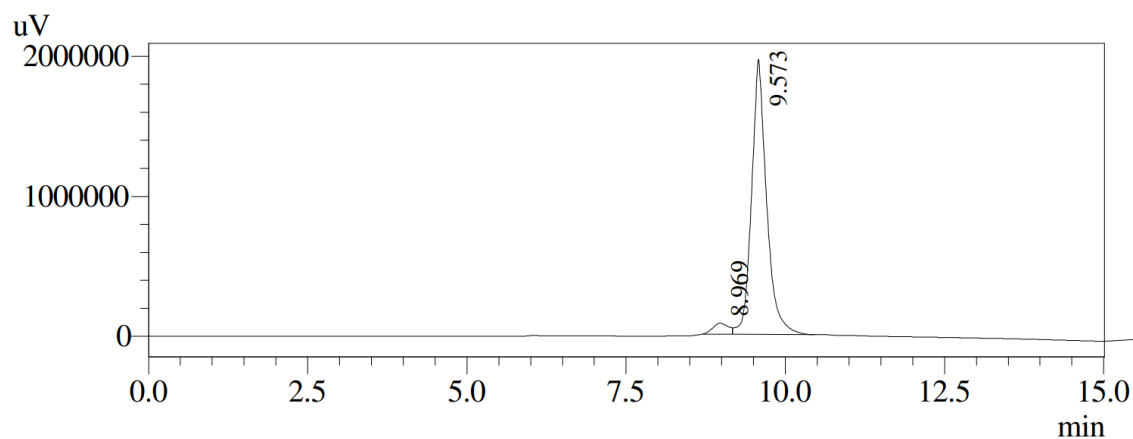
8.9 Anexo I

Espectro de RMN ^1H do composto (a9) (400MHz, DMSO- d_6)Ampliação de δ 7.30-8.50 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (a9) (400MHz, DMSO- d_6)

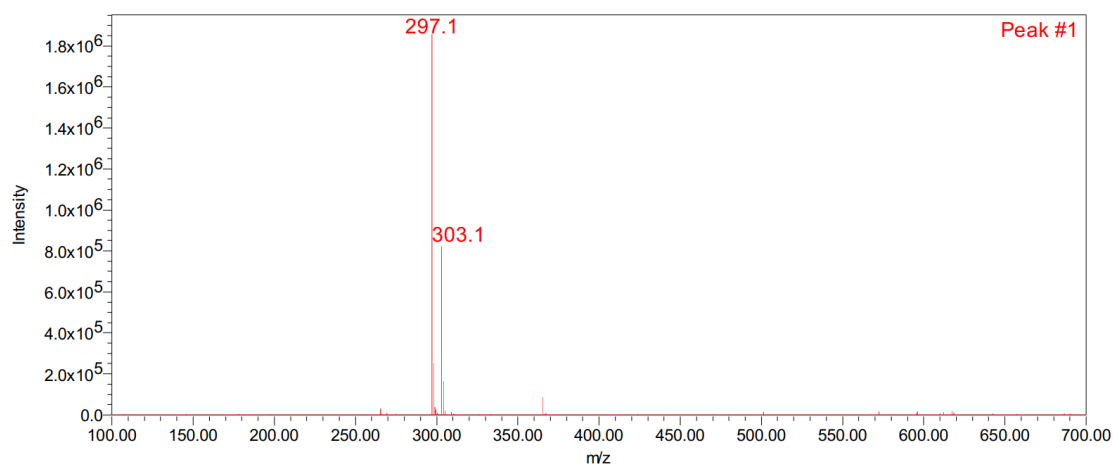
Espectro de RMN ^{13}C do composto (a9) (100 MHz, DMSO- d_6)



Cromatograma de HPLC do composto (a9)



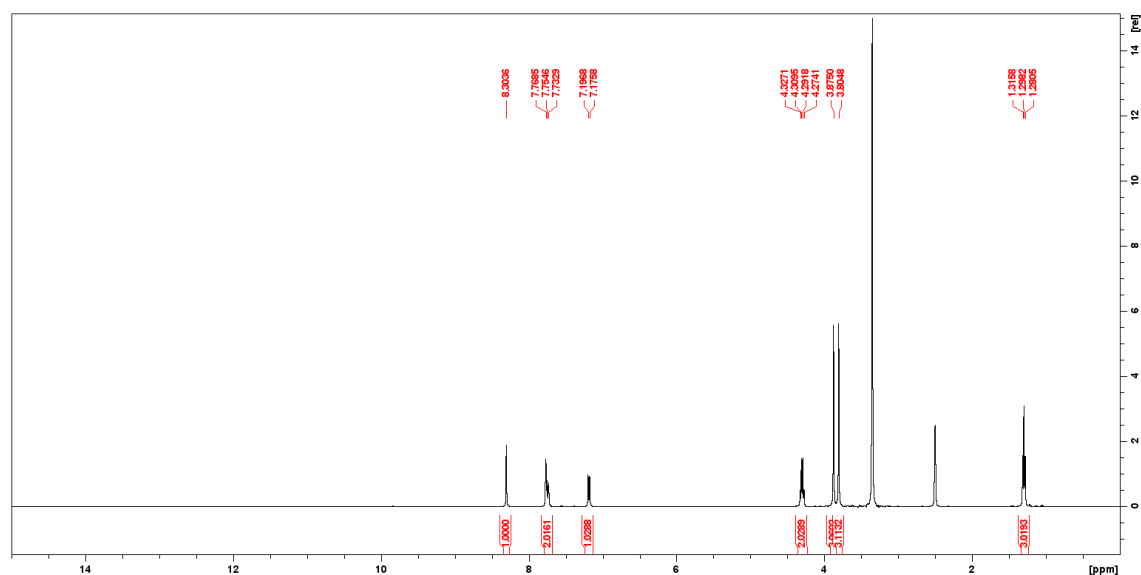
Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (a9)



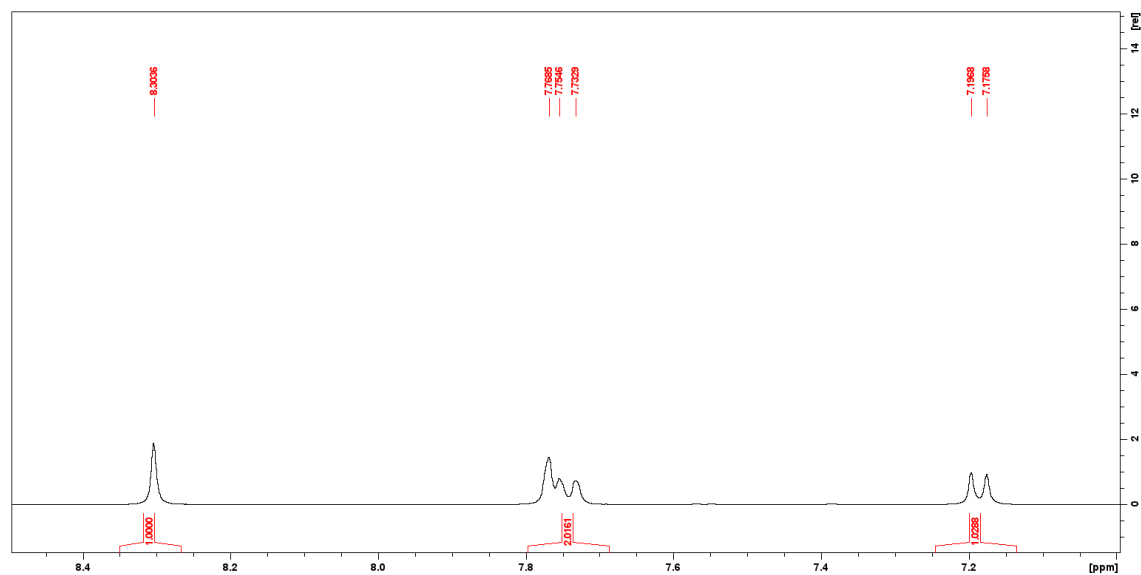
HMRS ESI+ (m/z): calculado para ($\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{NO}_3$): 295.32; encontrado ($[\text{M}+\text{H}+\text{H}_2\text{O}]^+$): 297.10.

8.10 Anexo J

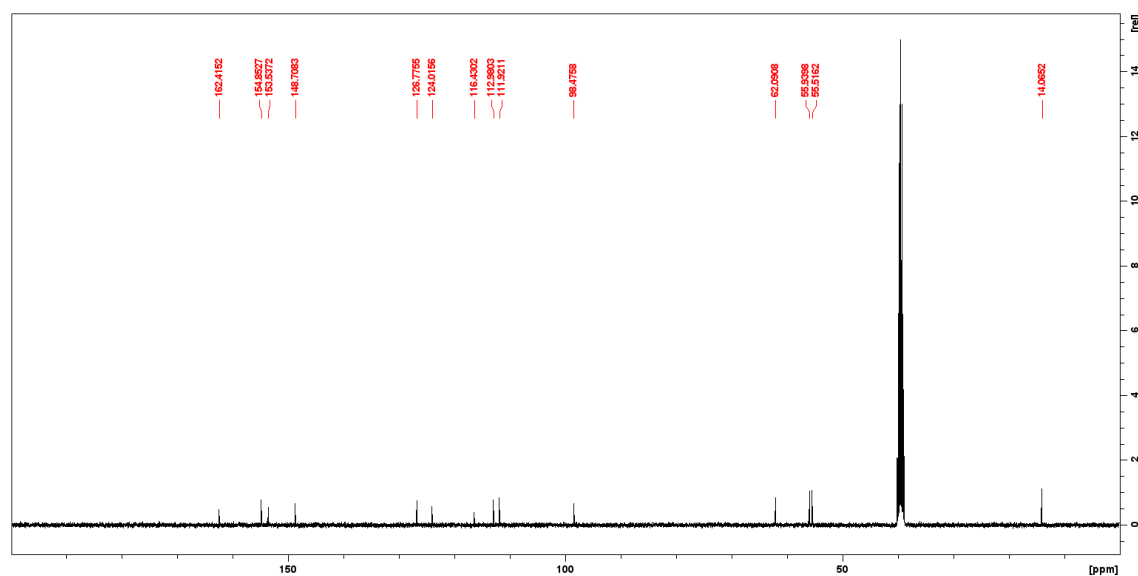
Espectro de RMN ^1H do composto (a10) (400MHz, DMSO- d_6)



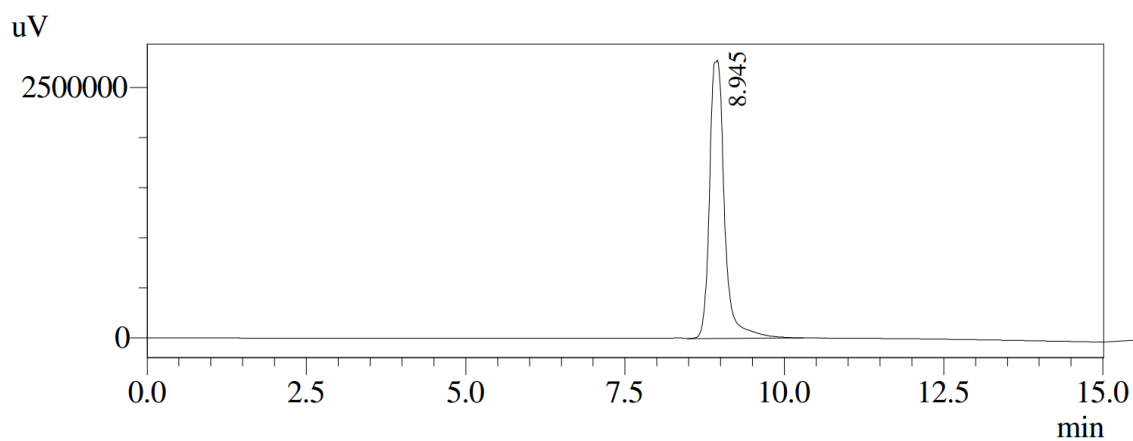
Ampliação de δ 7.0-8.50 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (a10) (400MHz, DMSO- d_6)



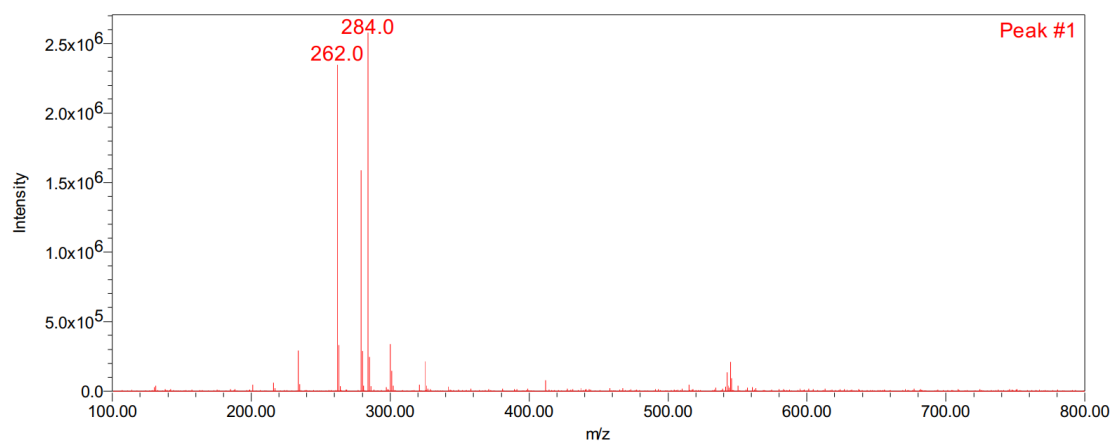
Espectro de RMN ^{13}C do composto (a10) (100 MHz, DMSO- d_6)



Cromatograma de HPLC do composto (a10)

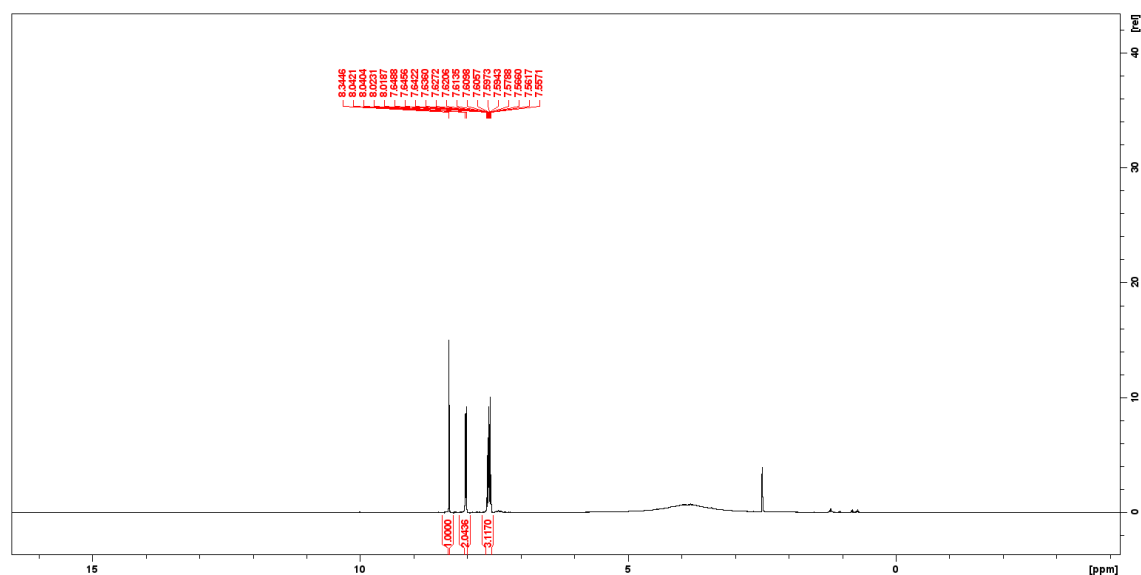
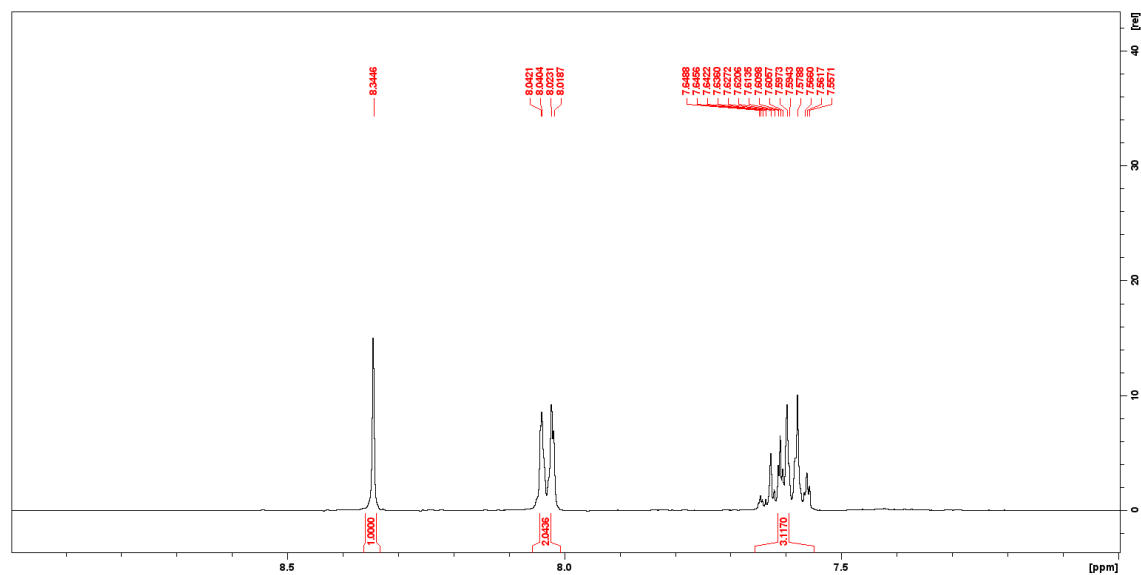


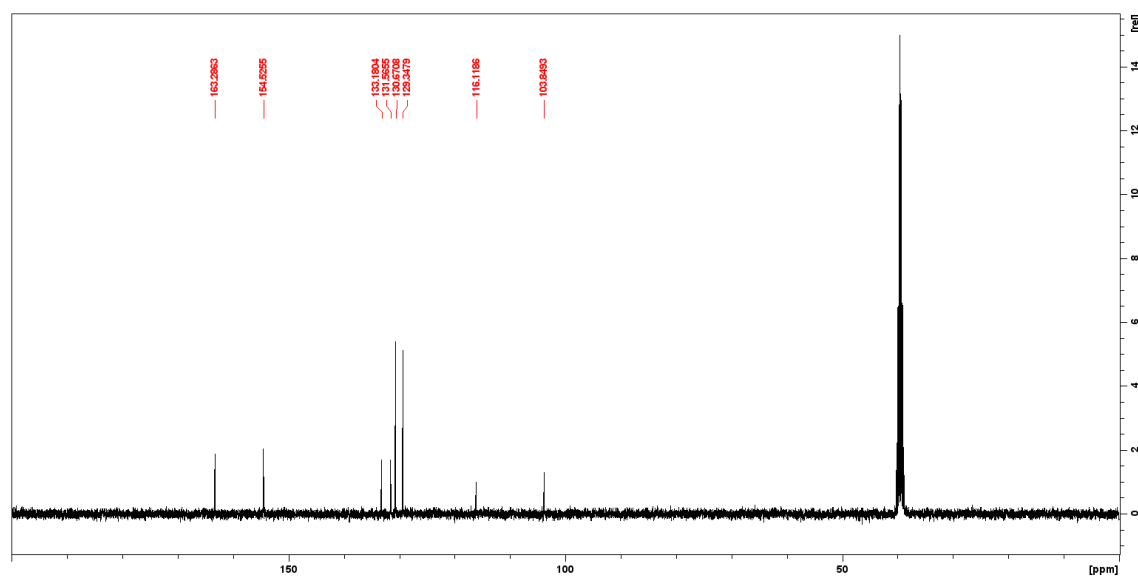
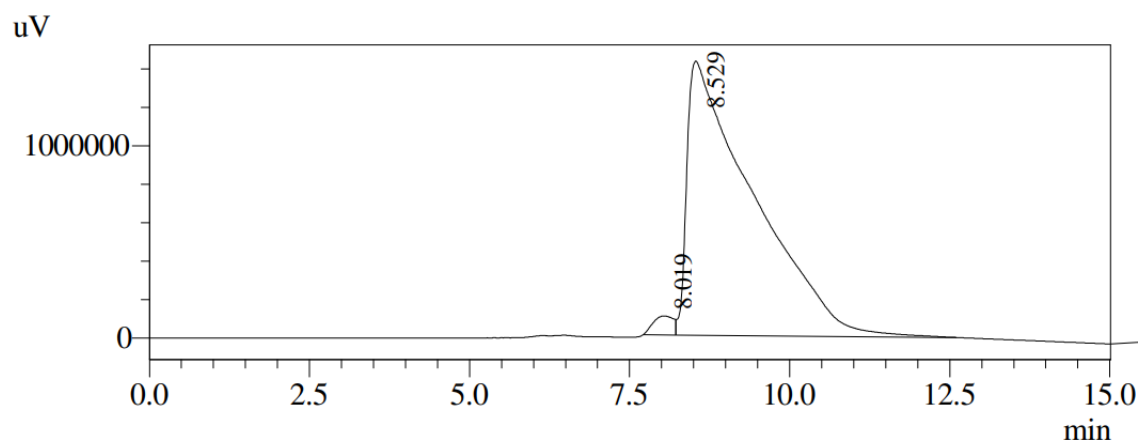
Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (a10)

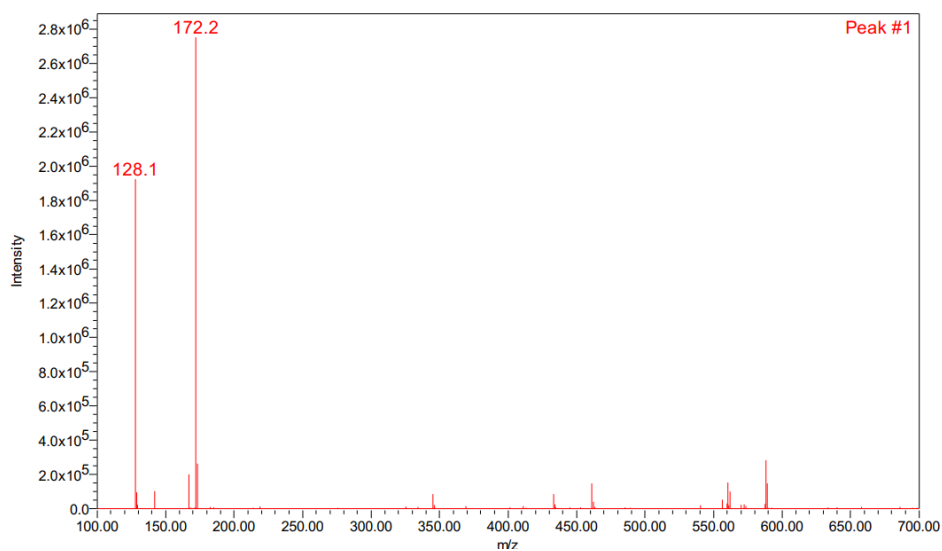


HMRS ESI+ (m/z): calculado para ($\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_4$): 261.28; encontrado ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 262.00.

8.11 Anexo K

Espectro de RMN ^1H do composto (b1) (400MHz, DMSO- d_6)Ampliação de δ 7.0-9.0 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (b1) (400MHz, DMSO- d_6)

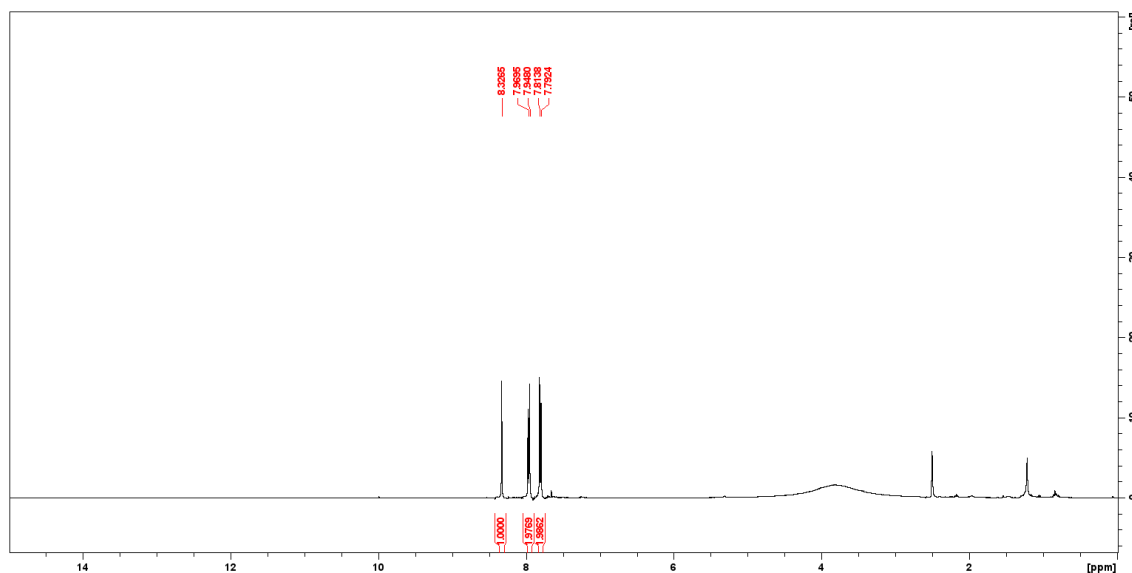
Espectro de RMN ^{13}C do composto (b1) (100 MHz, DMSO- d_6)**Cromatograma de HPLC do composto (b1)**

Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (b1)

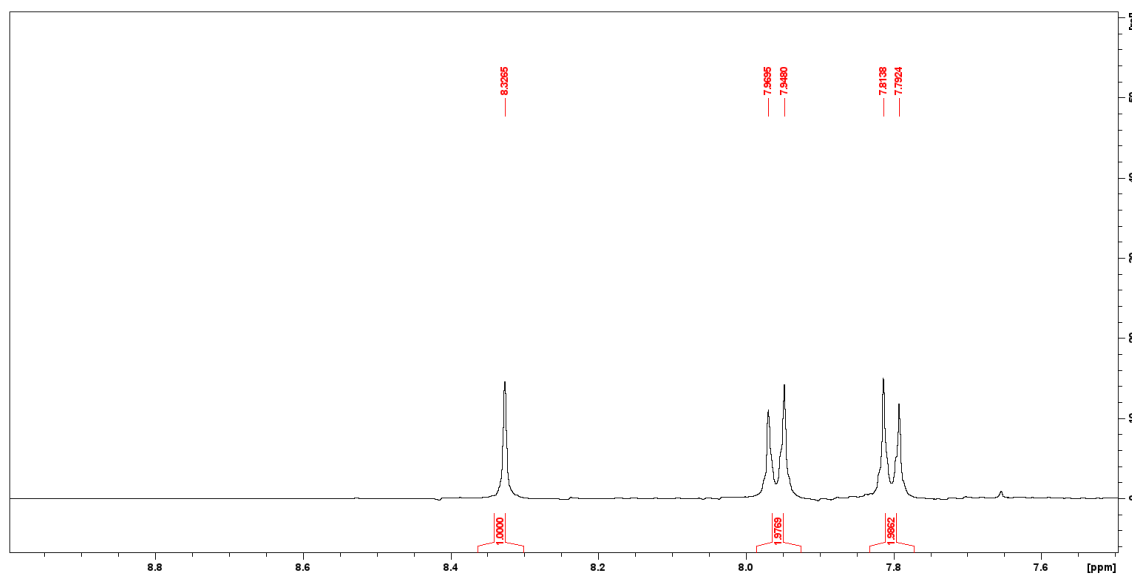
HMRS ESI- (m/z): calculado para $(C_7H_{10}NO_2)$: 173.17; encontrado $([M-H]^-)$: 172.20.

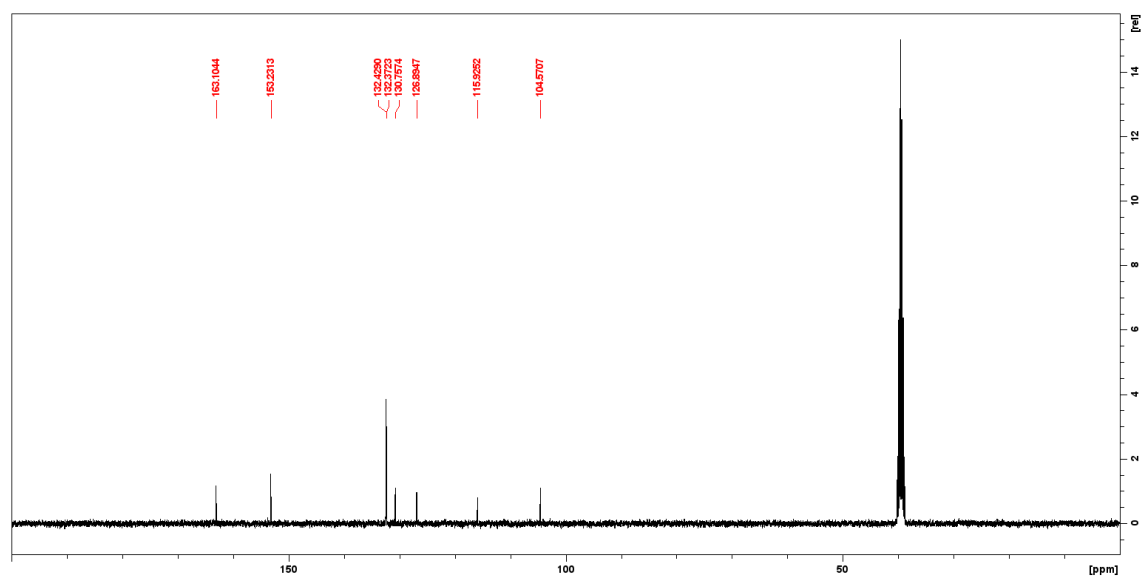
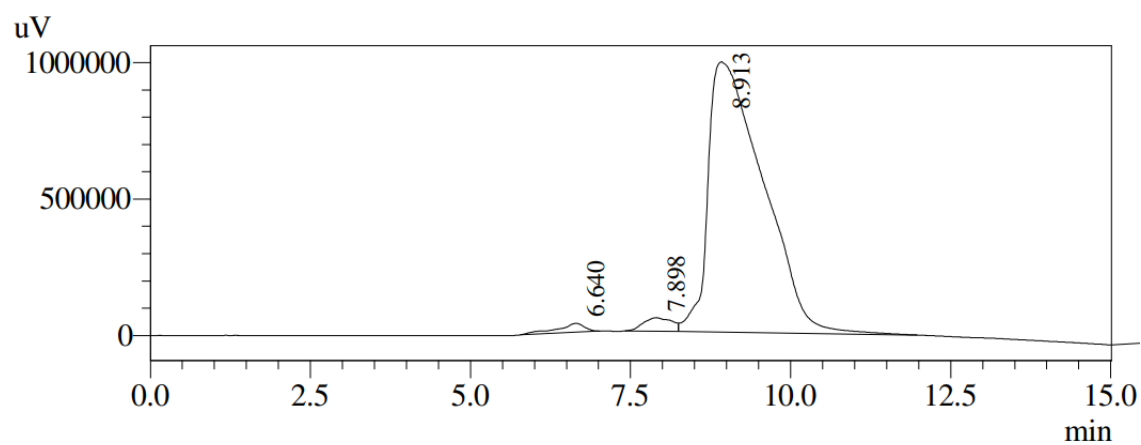
8.12 Anexo L

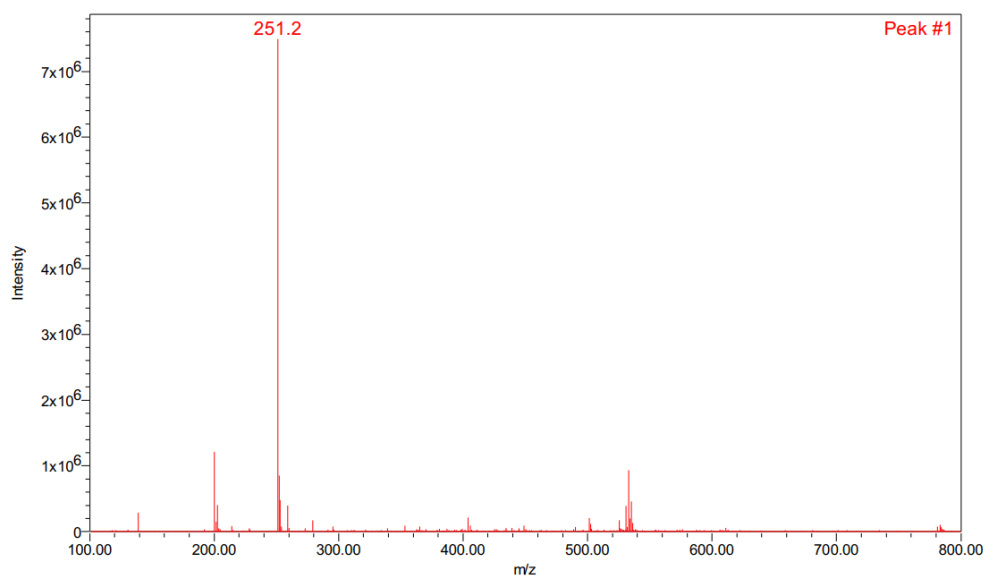
Espectro de RMN ^1H do composto (b2) (400MHz, DMSO- d_6)



Ampliação de δ 7.50-9.0 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (b2) (400MHz, DMSO- d_6)



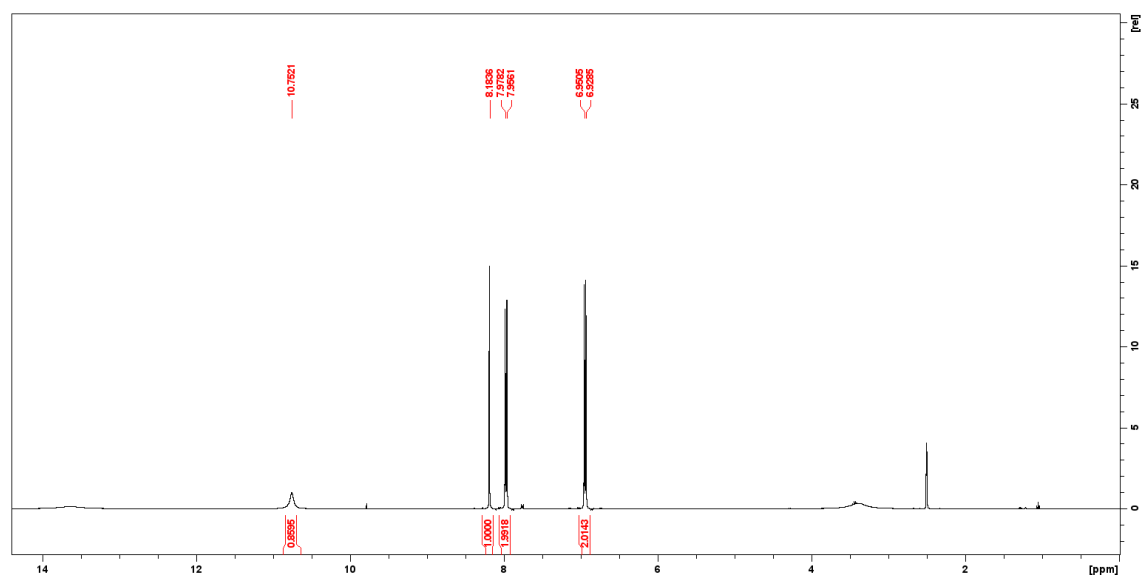
Espectro de RMN ^{13}C do composto (b2) (100 MHz, DMSO- d_6)**Cromatograma de HPLC do composto (b2)**

Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (b2)

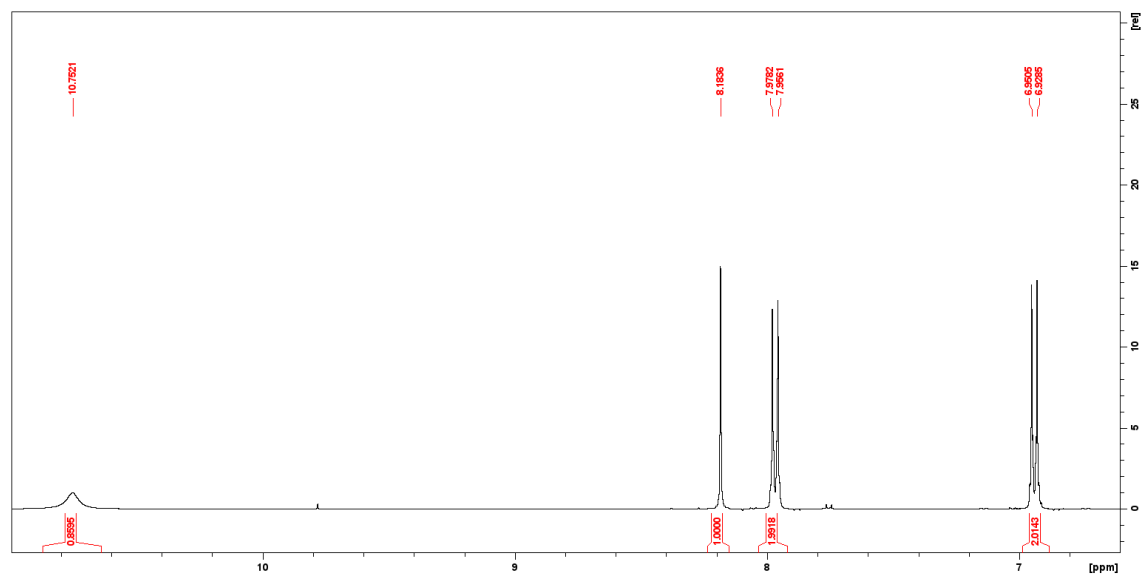
HMRS ESI- (m/z): calculado para ($C_{10}H_6BrNO_2$): 252.06; encontrado ($[M-H]^-$):251.20.

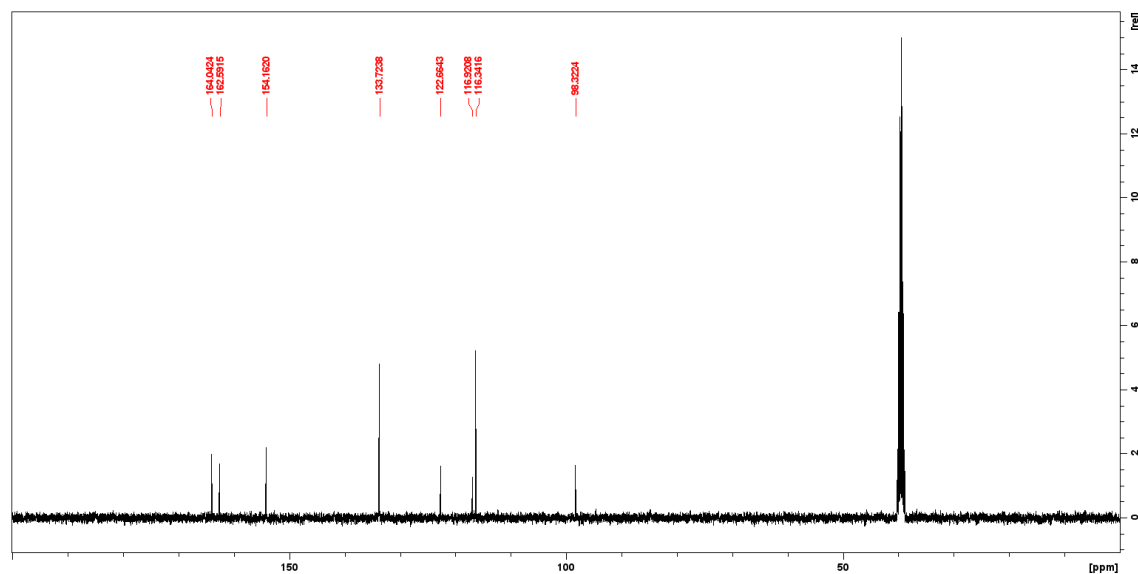
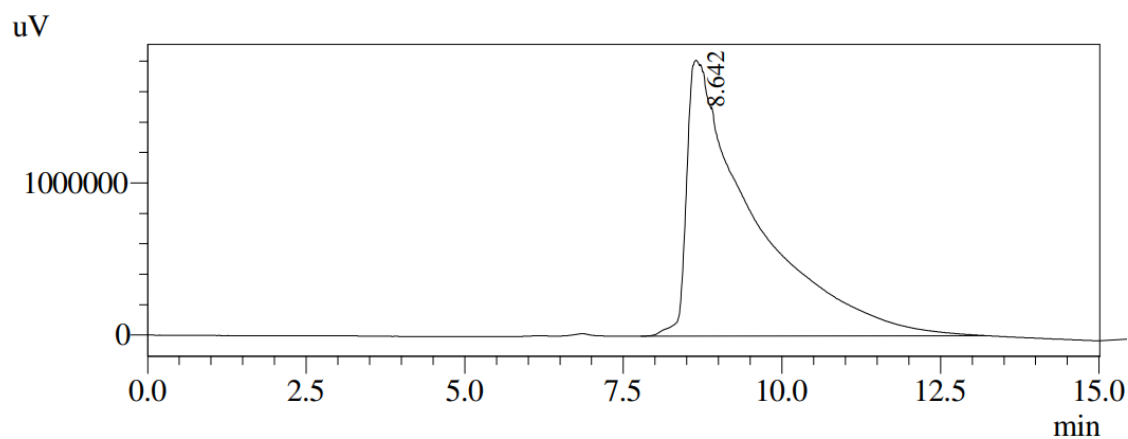
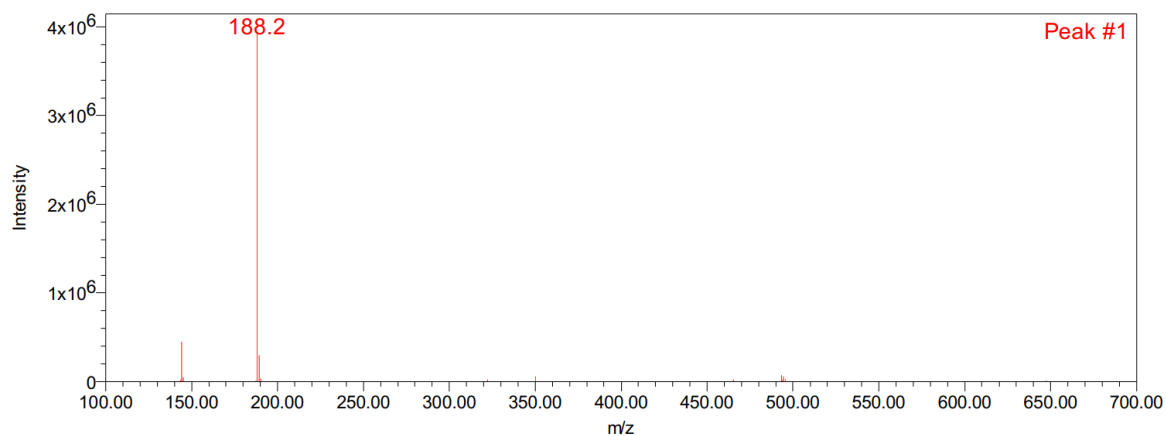
8.13 Anexo M

Espectro de RMN ^1H do composto (b3) (400MHz, DMSO- d_6)



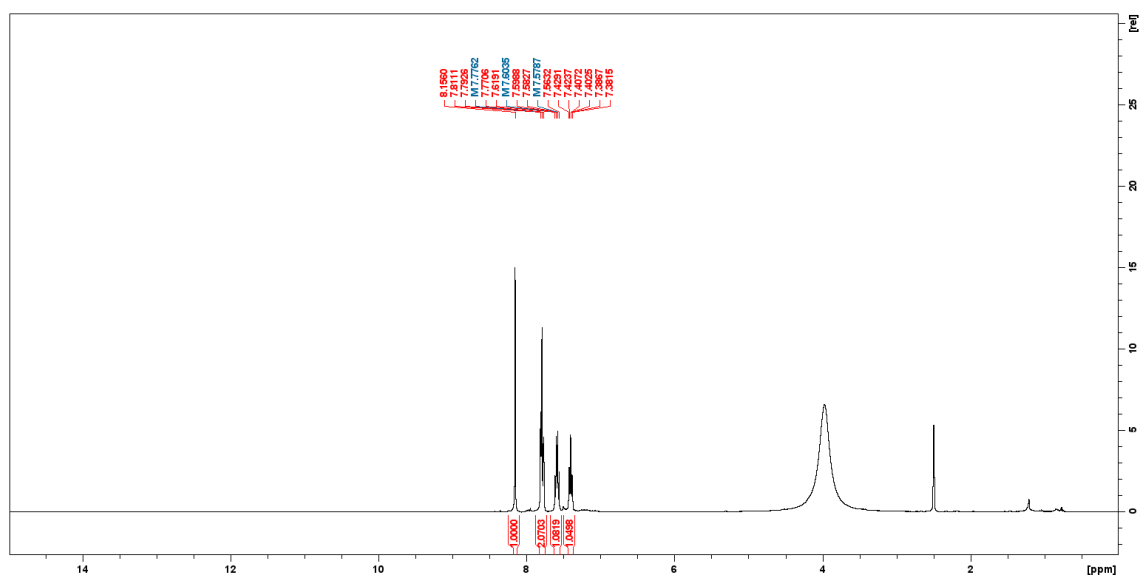
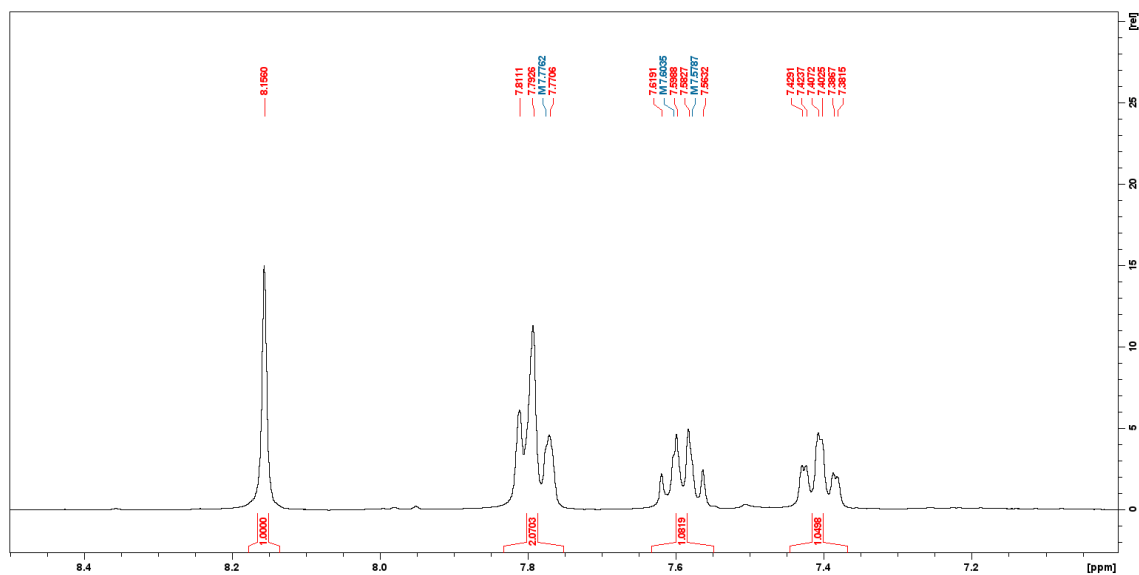
Ampliação de δ 6.60-11.0 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (b3) (400MHz, DMSO- d_6)



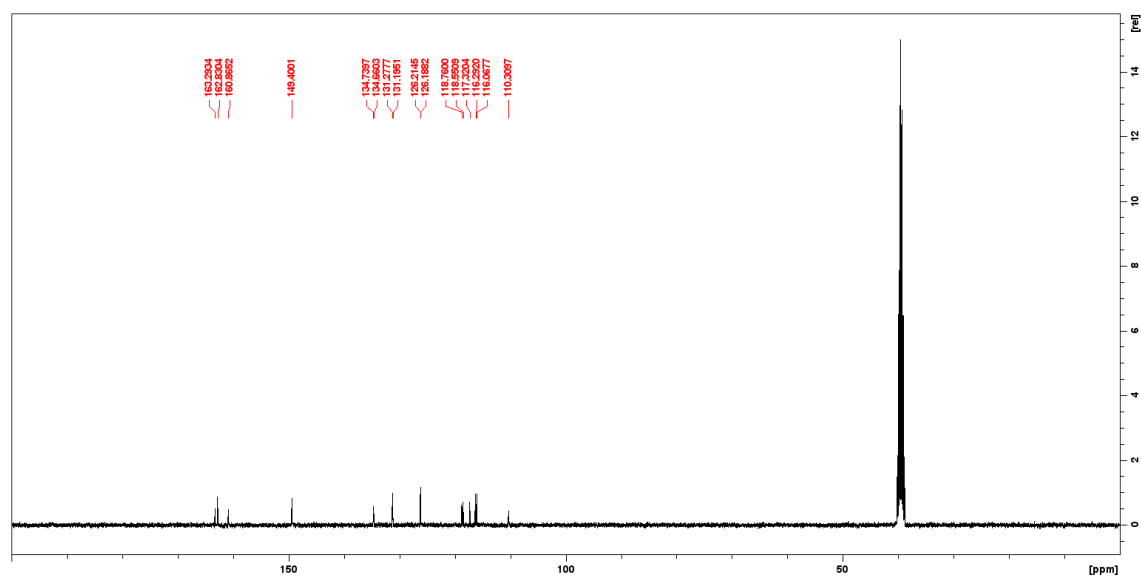
Espectro de RMN ^{13}C do composto (b3) (100 MHz, DMSO- d_6)**Cromatograma de HPLC do composto (b3)****Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (b3)**

HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3$): 189.17; encontrado ($[\text{M}-\text{H}]^-$): 188.20.

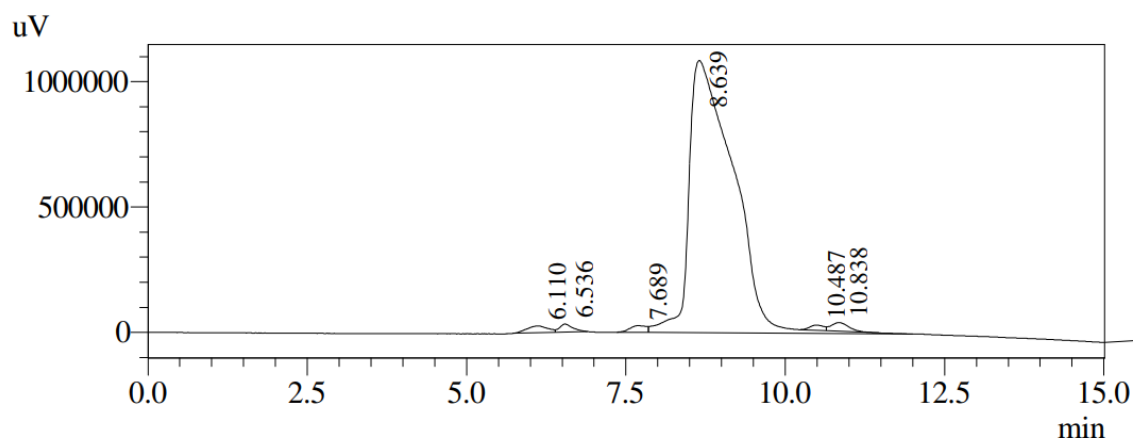
8.14 Anexo N

Espectro de RMN ^1H do composto (b4) (400MHz, DMSO- d_6)Ampliação de δ 7.0-8.50 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (b4) (400MHz, DMSO- d_6)

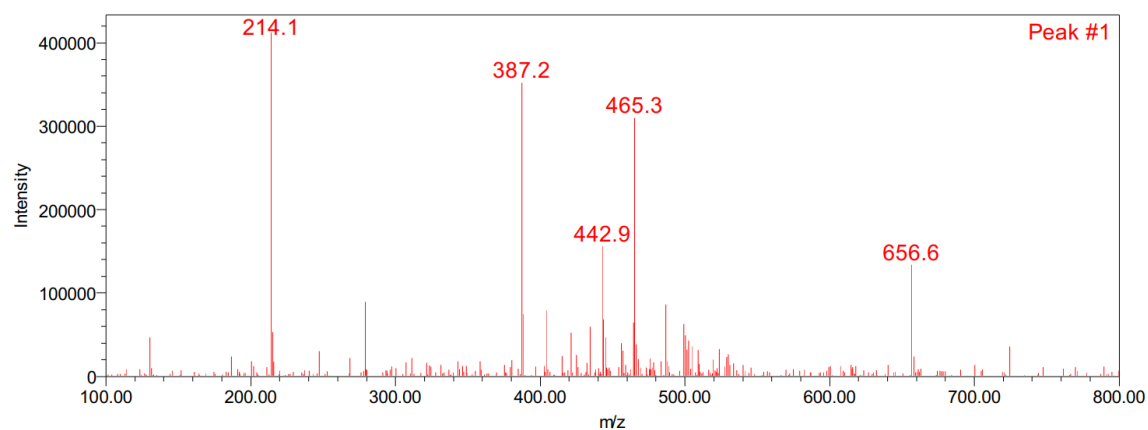
Espectro de RMN ^{13}C do composto (b4) (100 MHz, DMSO- d_6)



Cromatograma de HPLC do composto (b4)

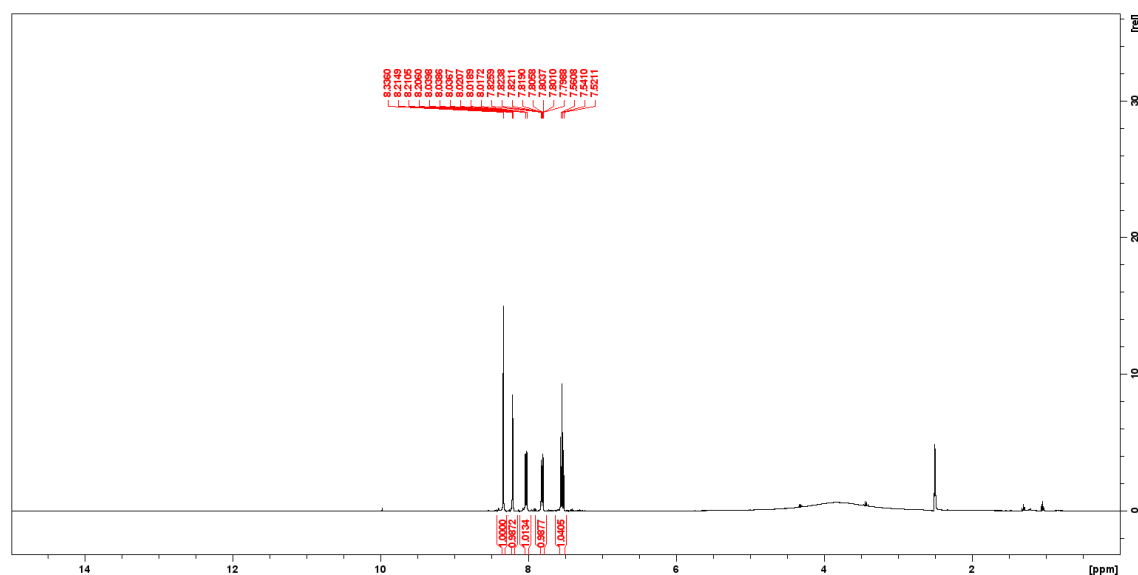
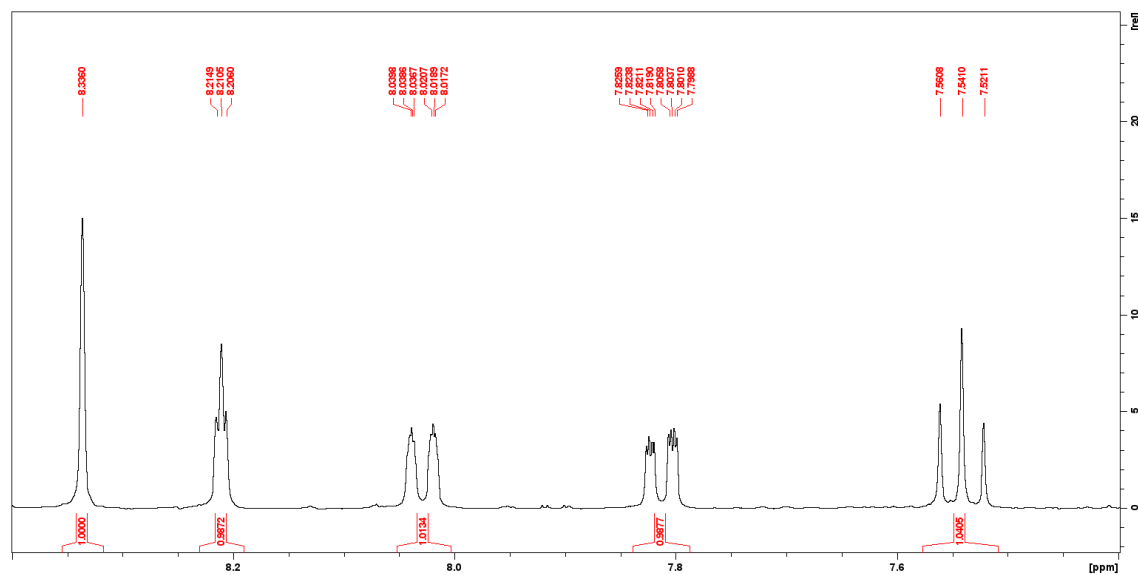


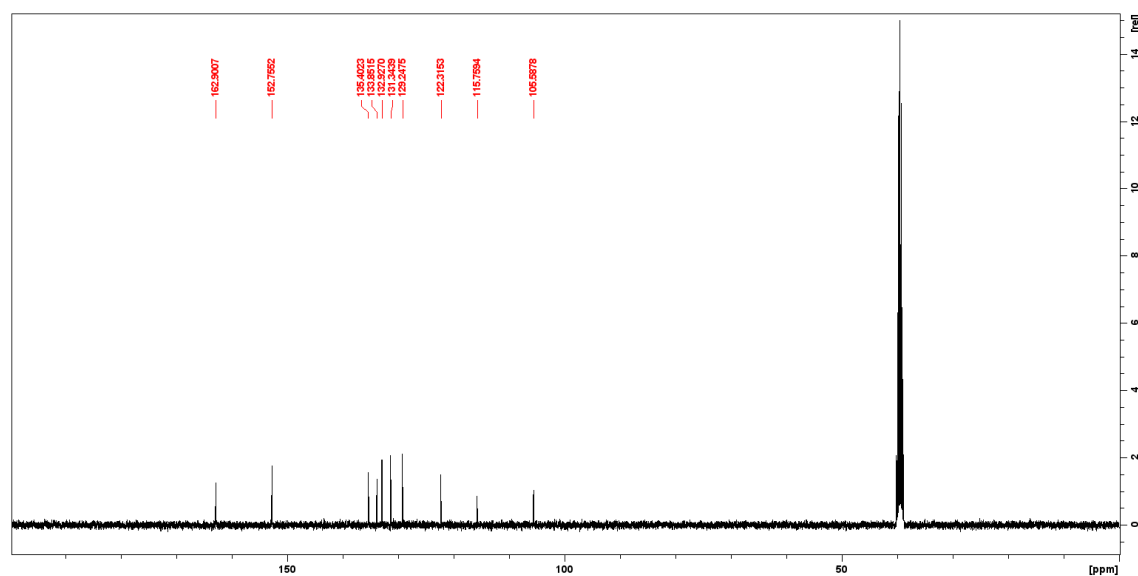
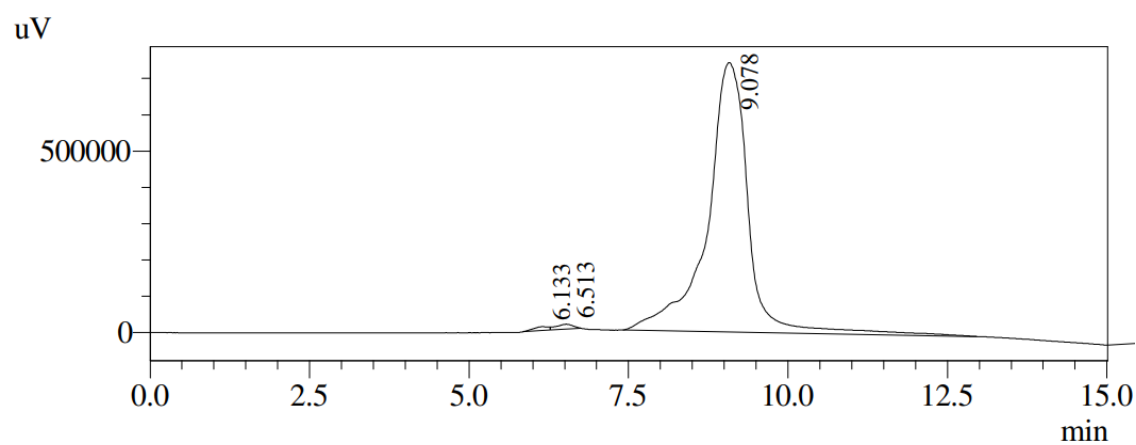
Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (b4)

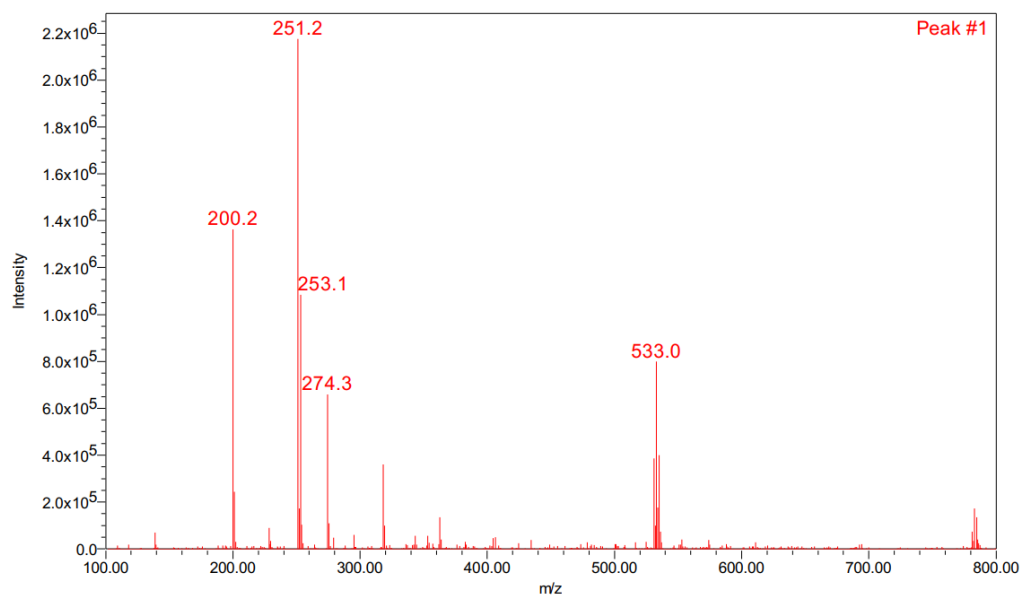


HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{10}\text{H}_6\text{FNO}_2\text{Na}$): 214.16; encontrado ($[\text{M}-\text{H}+\text{Na}]^+$): 214.10.

8.15 Anexo O

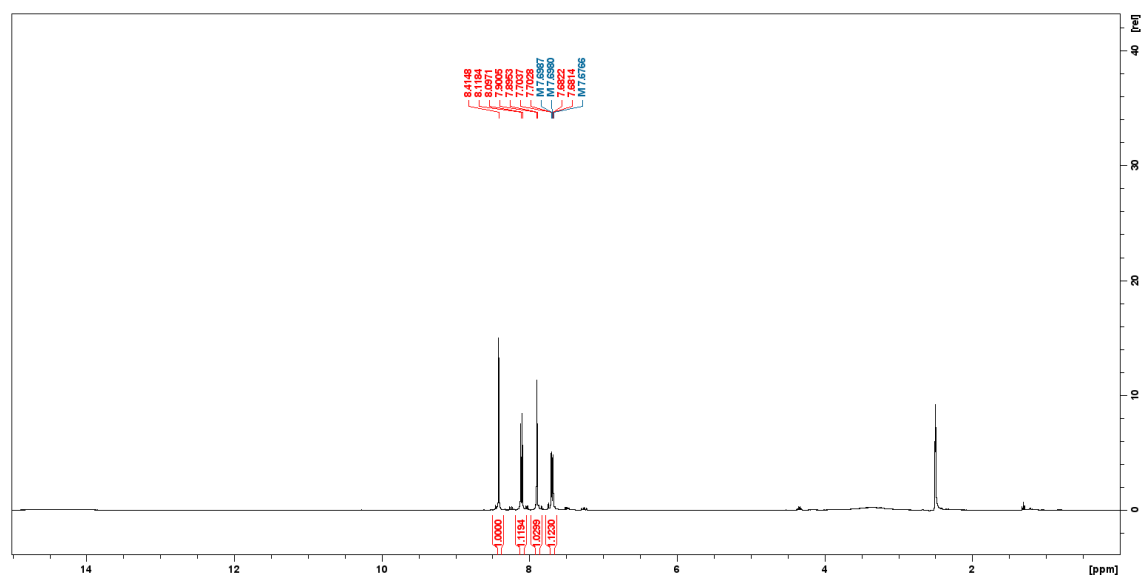
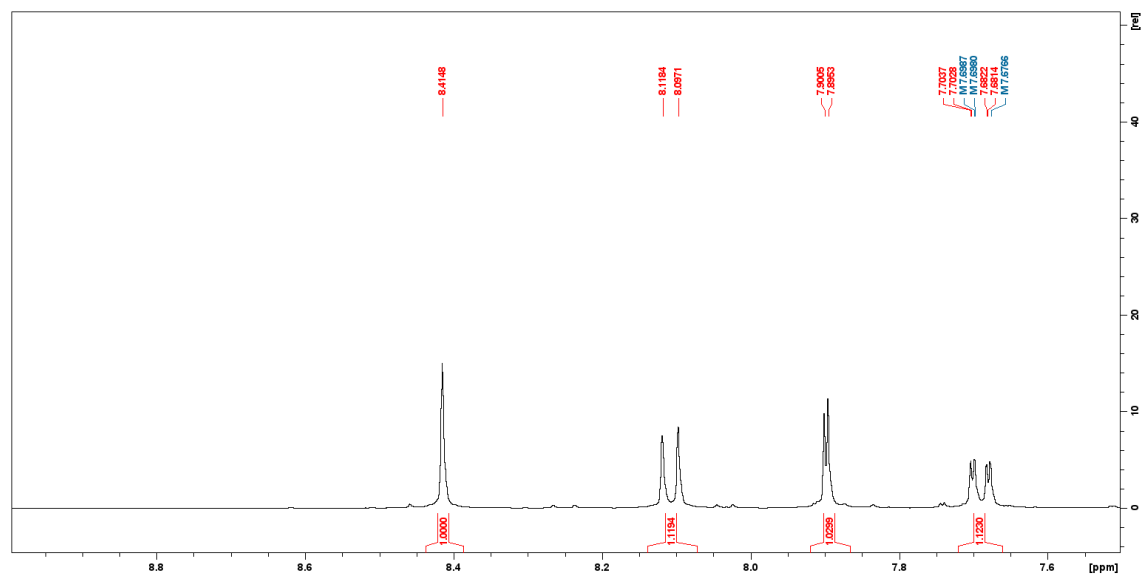
Espectro de RMN ^1H do composto (b5) (400MHz, DMSO- d_6)Ampliação de δ 7.40-8.40 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (b5) (400MHz, DMSO- d_6)

Espectro de RMN ^{13}C do composto (b5) (100 MHz, DMSO- d_6)**Cromatograma de HPLC do composto (b5)**

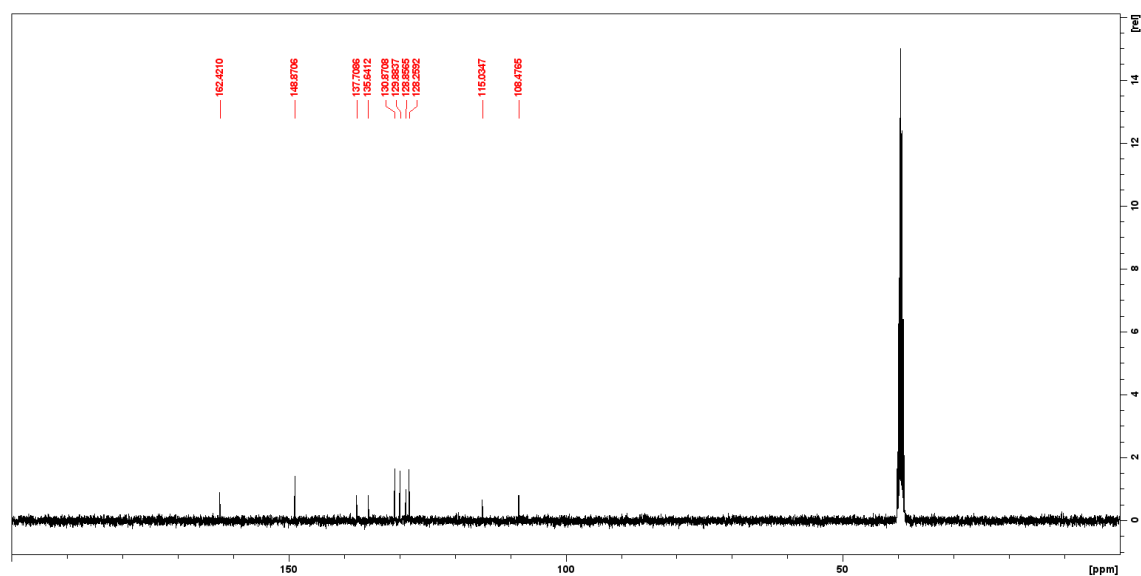
Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (b5)

HMRS ESI- (m/z): calculado para (C₁₀H₆BrNO₂): 252.06; encontrado ([M-H]⁻):251.20.

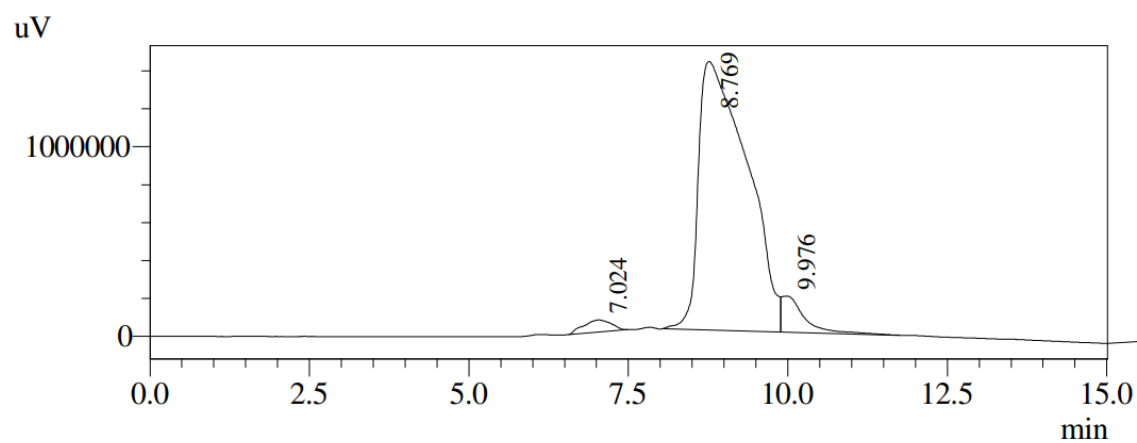
8.16 Anexo P

Espectro de RMN ^1H do composto (b6) (400MHz, DMSO- d_6)Ampliação de δ 7.50-9.0 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (b6) (400MHz, DMSO- d_6)

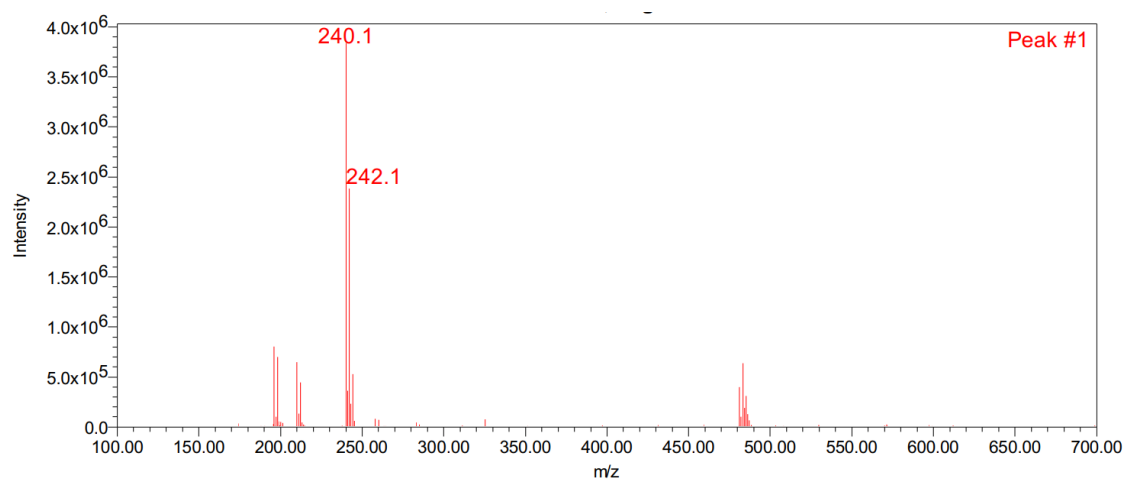
Espectro de RMN ^{13}C do composto (b6) (100 MHz, DMSO- d_6)



Cromatograma de HPLC do composto (b6)

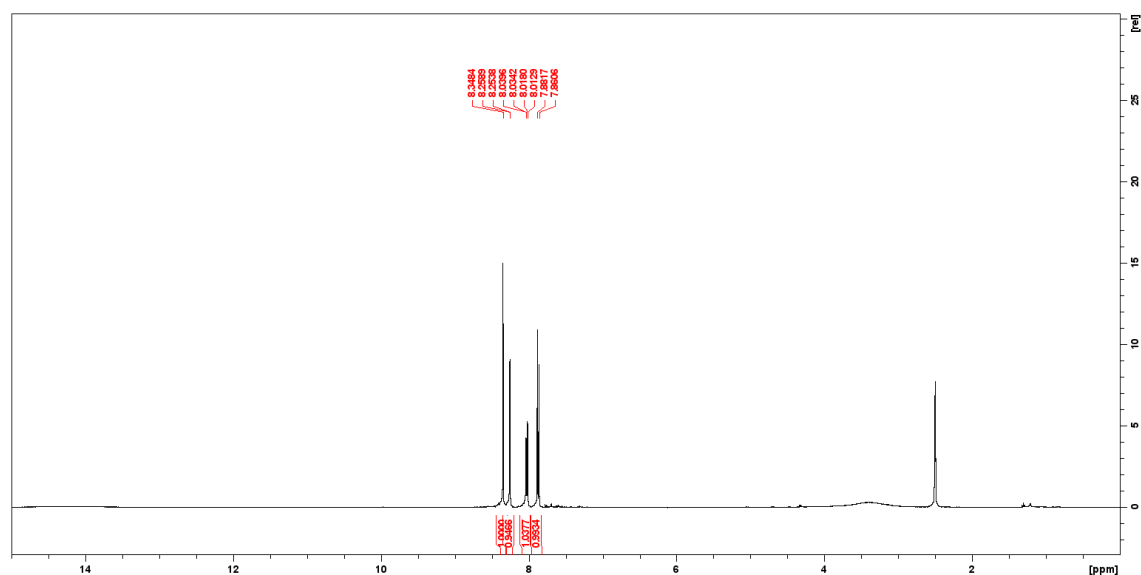
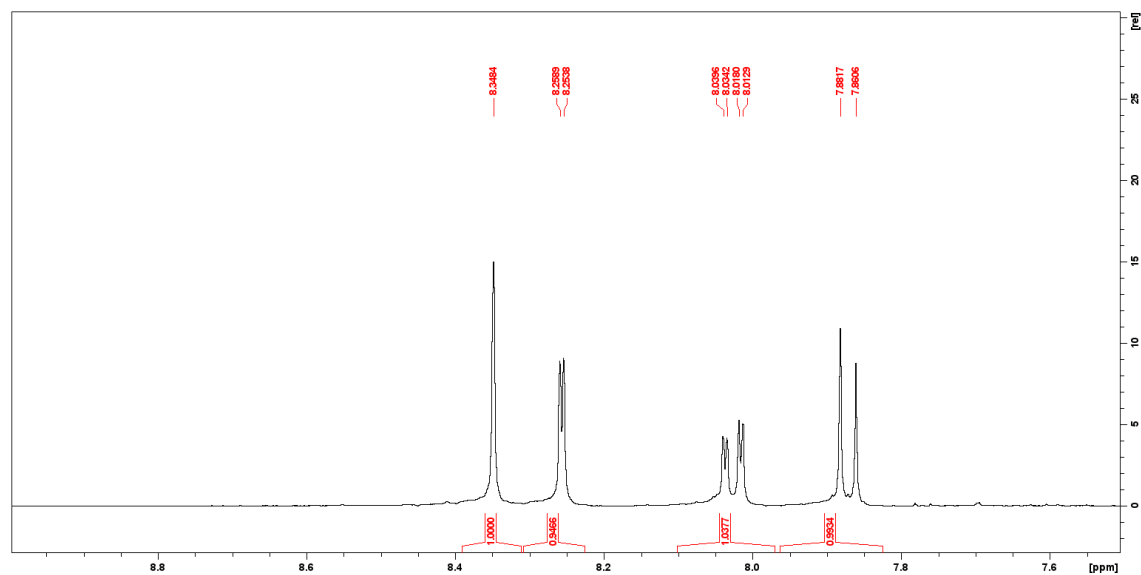


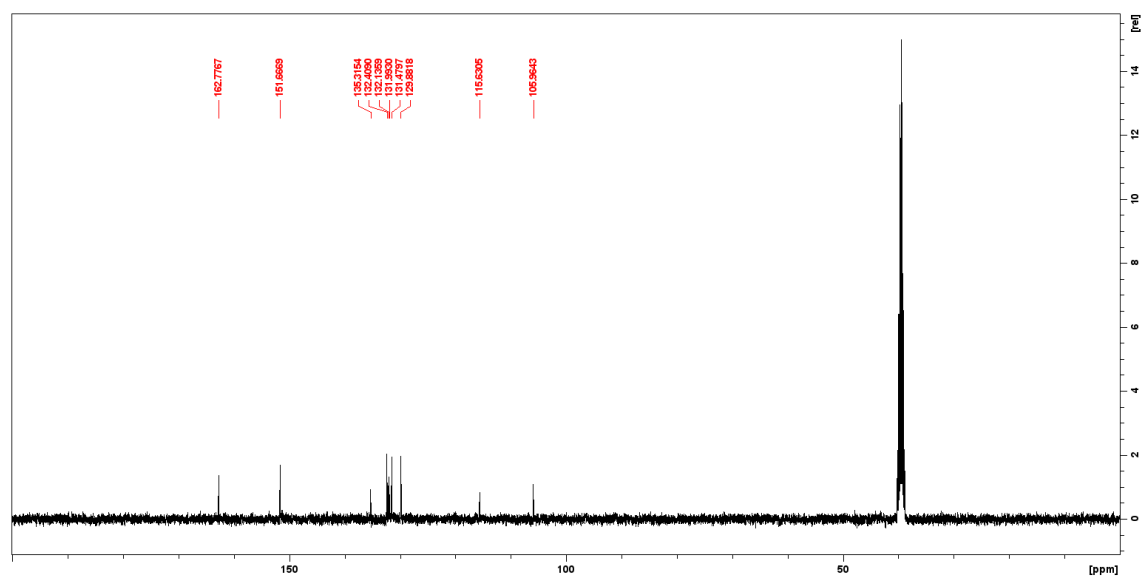
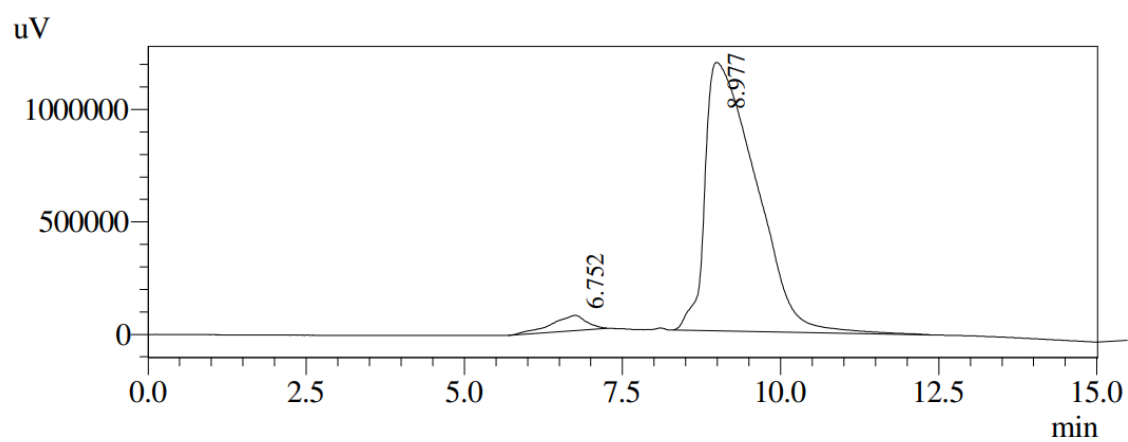
Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (b6)

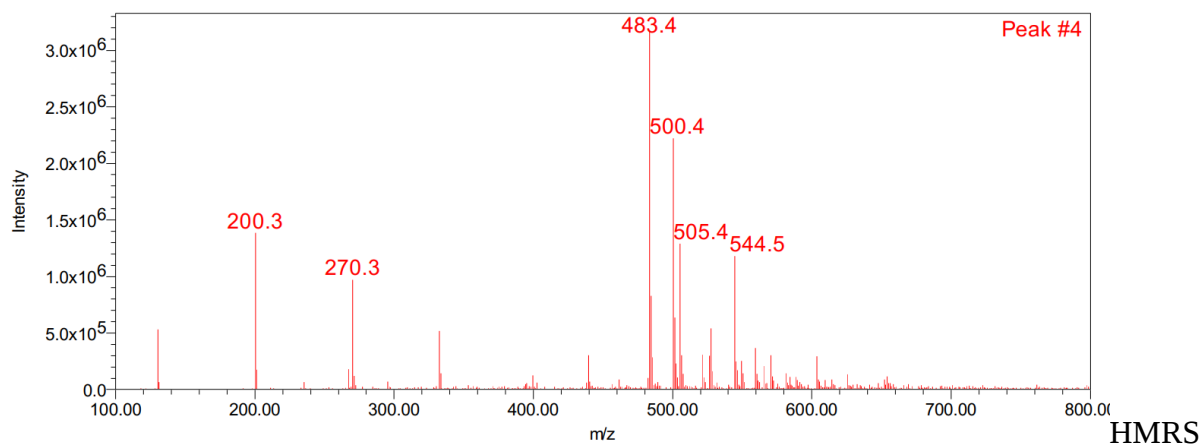


HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{10}\text{H}_5\text{Cl}_2\text{NO}_2$): 241.05; encontrado ($[\text{M}-\text{H}]^-$): 240.10.

8.17 Anexo Q

Espectro de RMN ^1H do composto (b7) (400MHz, DMSO- d_6)Ampliação de δ 7.50-9.0 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (b7) (400MHz, DMSO- d_6)

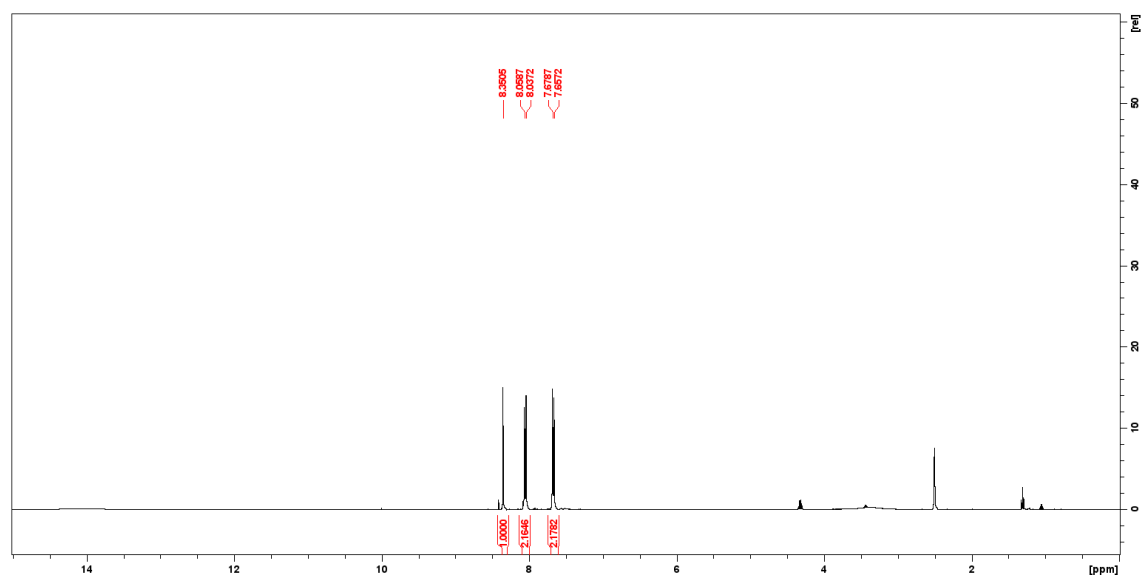
Espectro de RMN ^{13}C do composto (b7) (100 MHz, DMSO- d_6)**Cromatograma de HPLC do composto (b7)**

Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (b7)

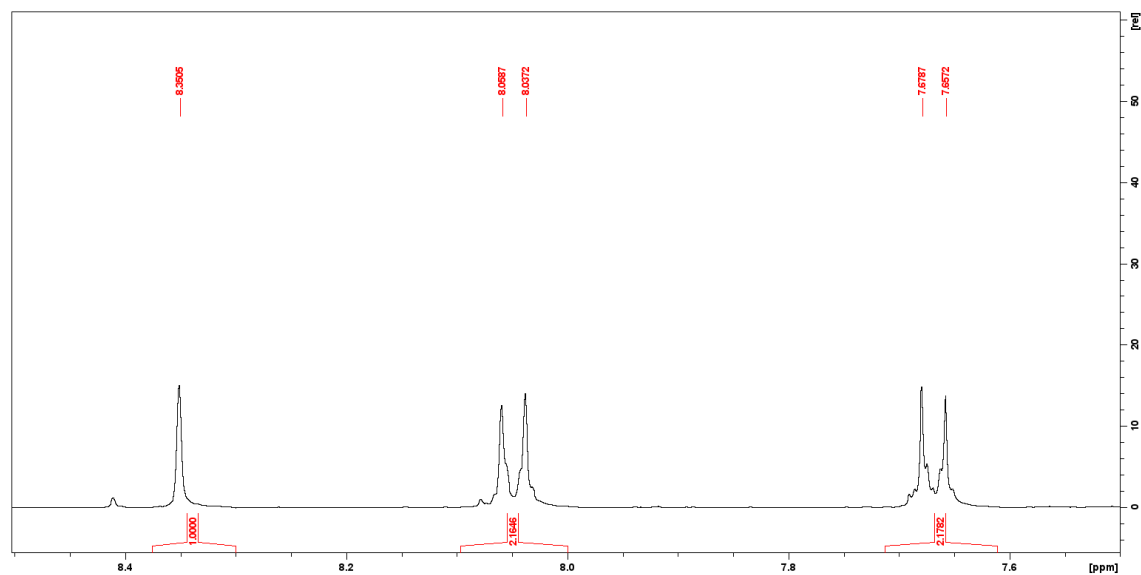
ESI- (m/z): calculado para $(C_{20}H_{10}Cl_4N_2O_4)$: 483.09; encontrado $([2M-H]^-)$: 483.40.

8.18 Anexo R

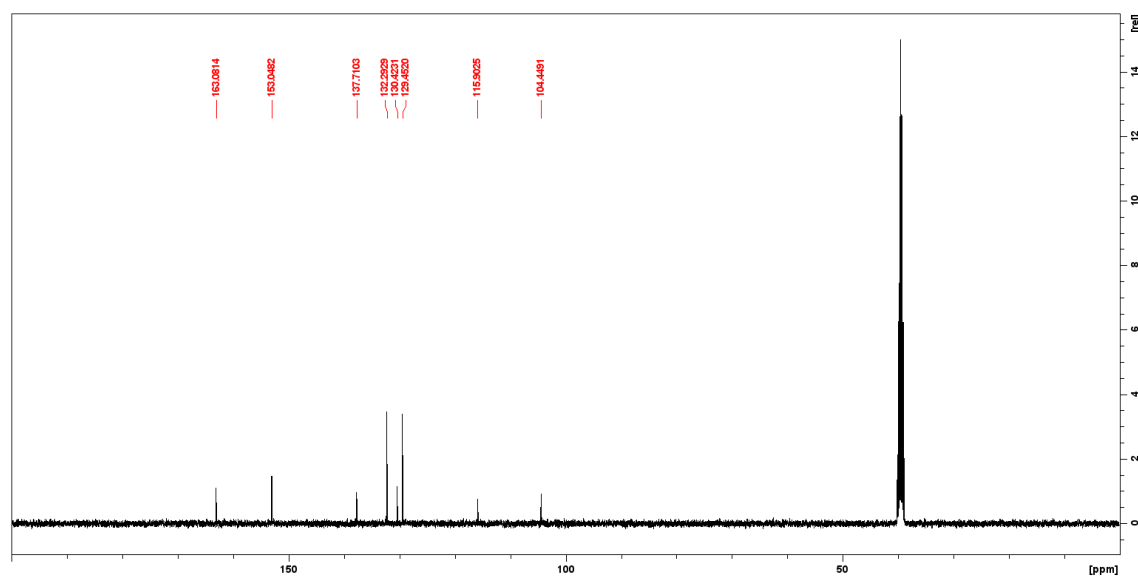
Espectro de RMN ^1H do composto (b8) (400MHz, DMSO- d_6)



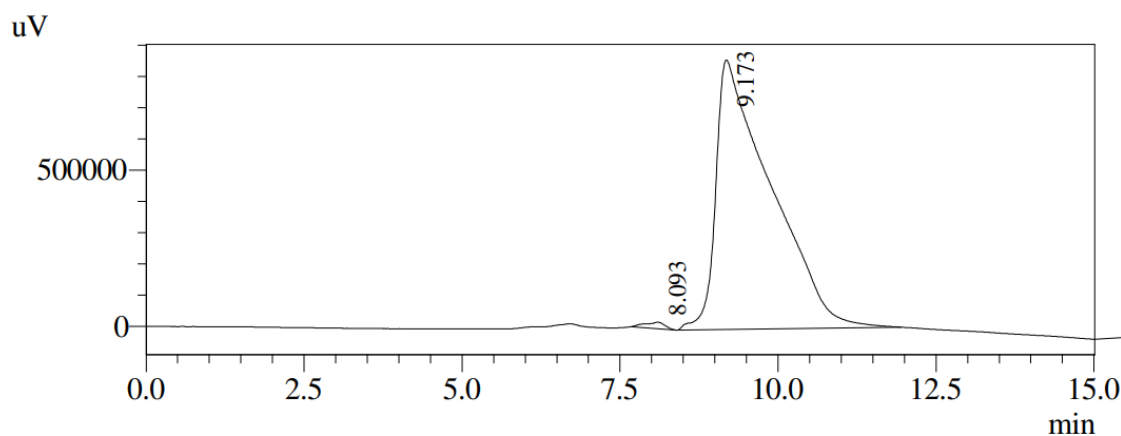
Ampliação de δ 7.50-8.50 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (b8) (400MHz, DMSO- d_6)



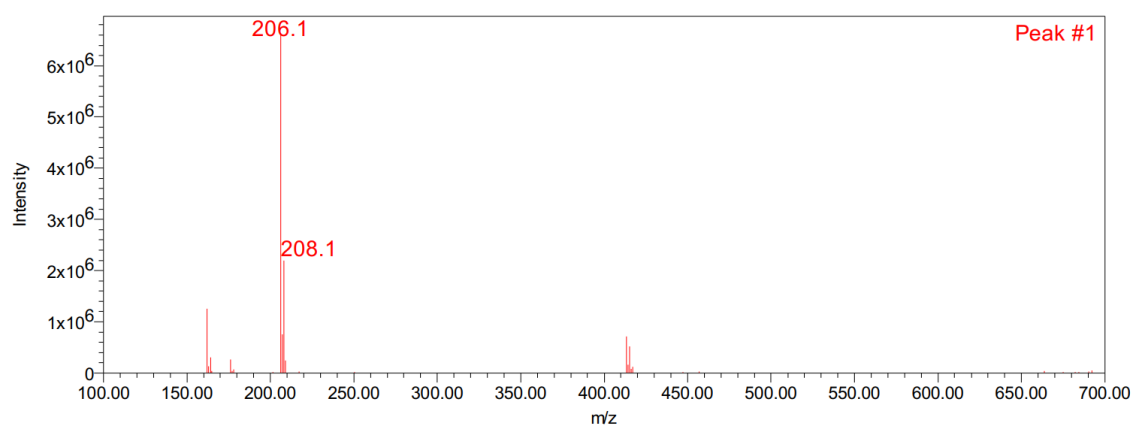
Espectro de RMN ^{13}C do composto (b8) (100 MHz, DMSO- d_6)



Cromatograma de HPLC do composto (b8)

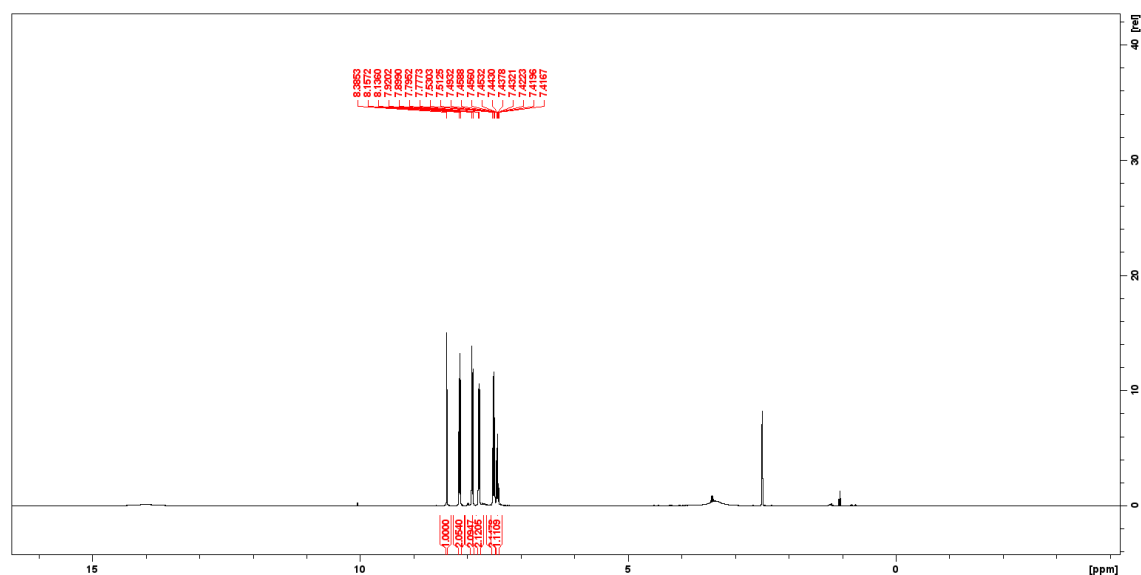
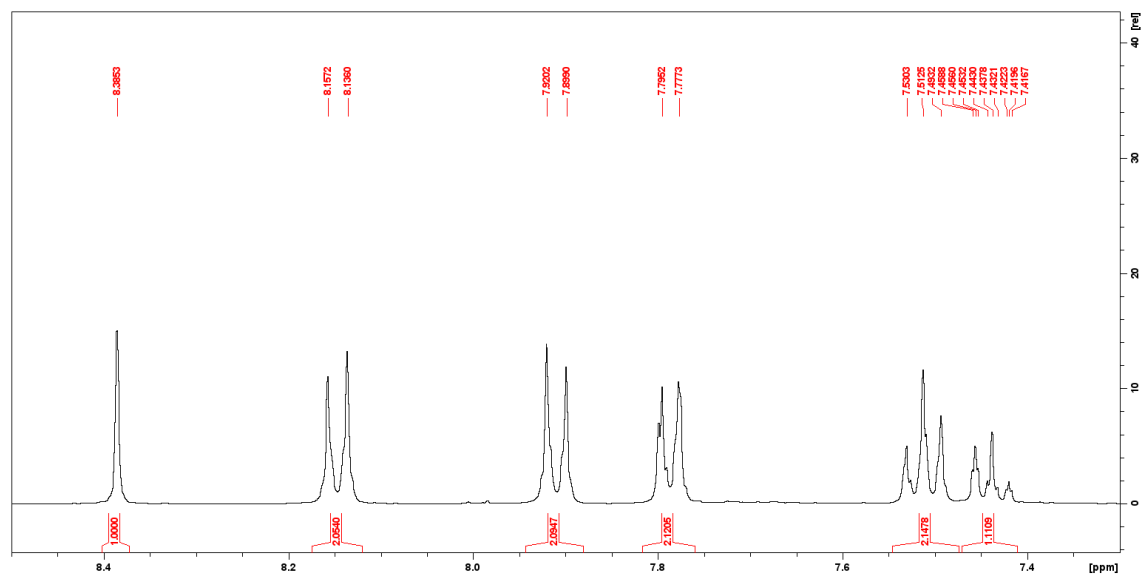


Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (b8)

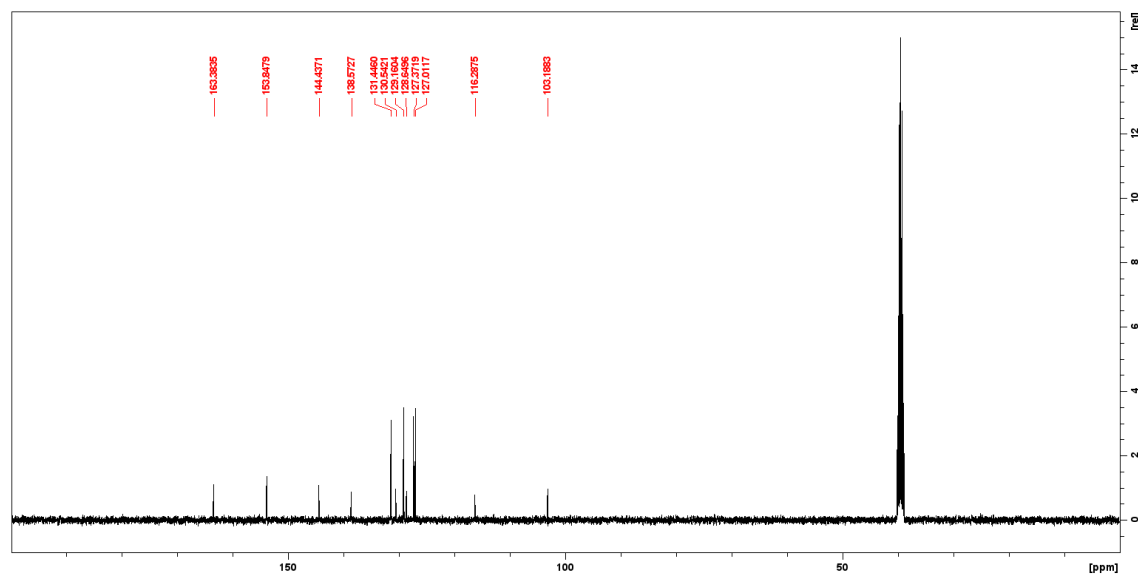


HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{10}\text{H}_6\text{ClNO}_2$): 207.61; encontrado ($[\text{M}-\text{H}]^-$): 206.10.

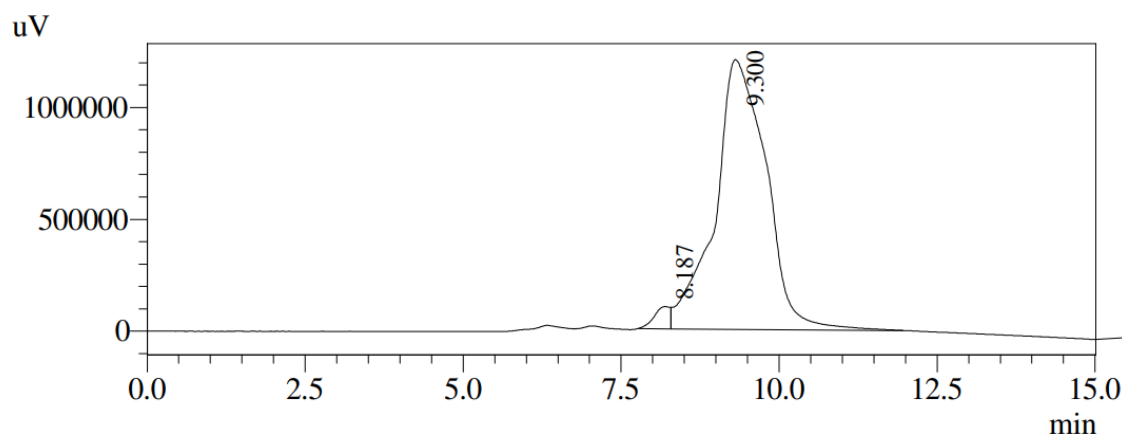
8.19 Anexo S

Espectro de RMN ^1H do composto (b9) (400MHz, DMSO- d_6)Ampliação de δ 7.30-8.50 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (b9) (400MHz, DMSO- d_6)

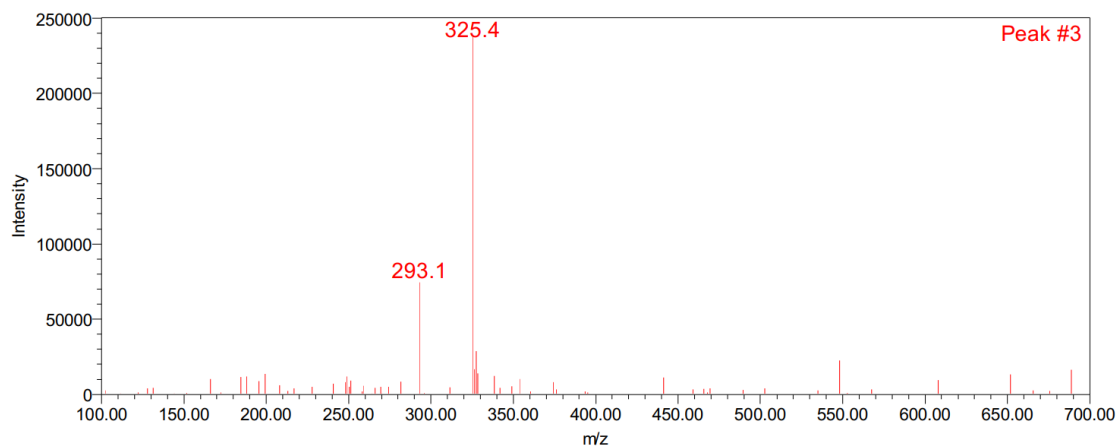
Espectro de RMN ^{13}C do composto (b9) (100 MHz, DMSO- d_6)



Cromatograma de HPLC do composto (b9)



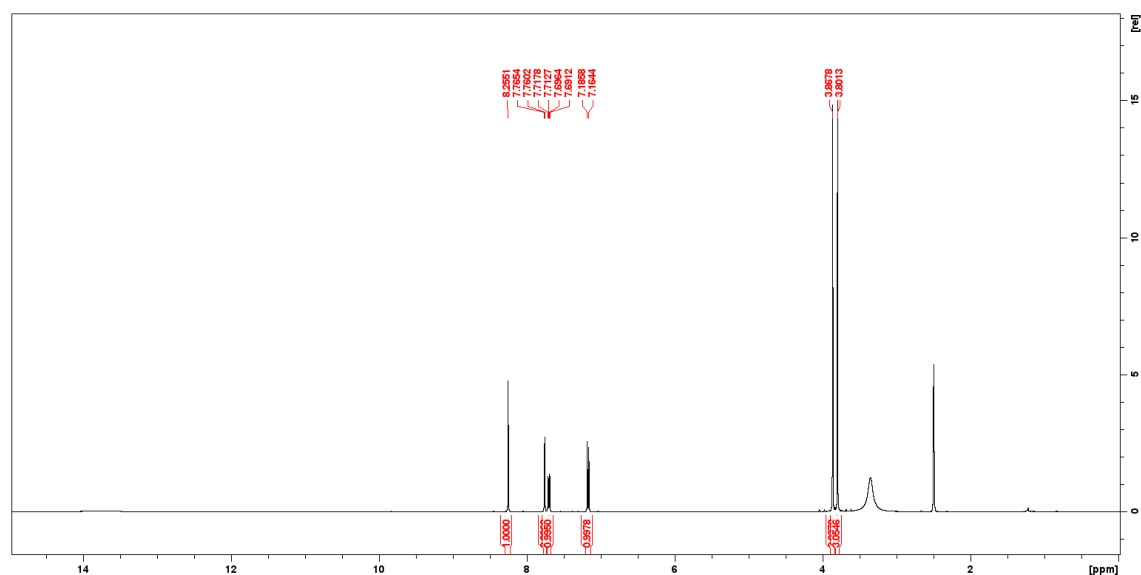
Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (b9)



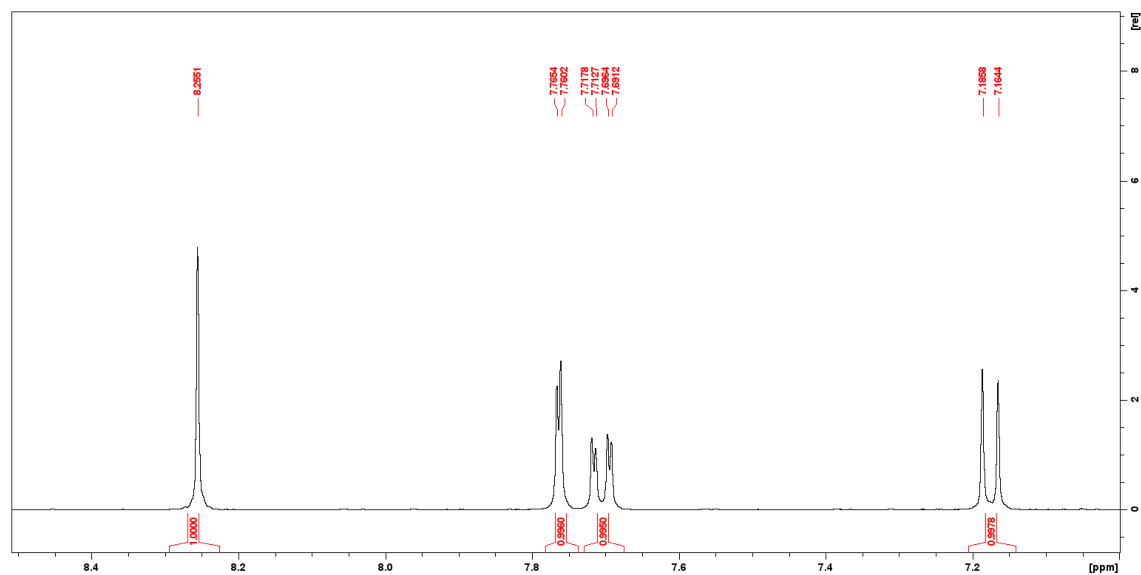
HMRS ESI- (m/z): calculado para ($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_4$): 294.26; encontrado ($[\text{M}-\text{H}+\text{CH}_2\text{O}_2]^-$): 293.10.

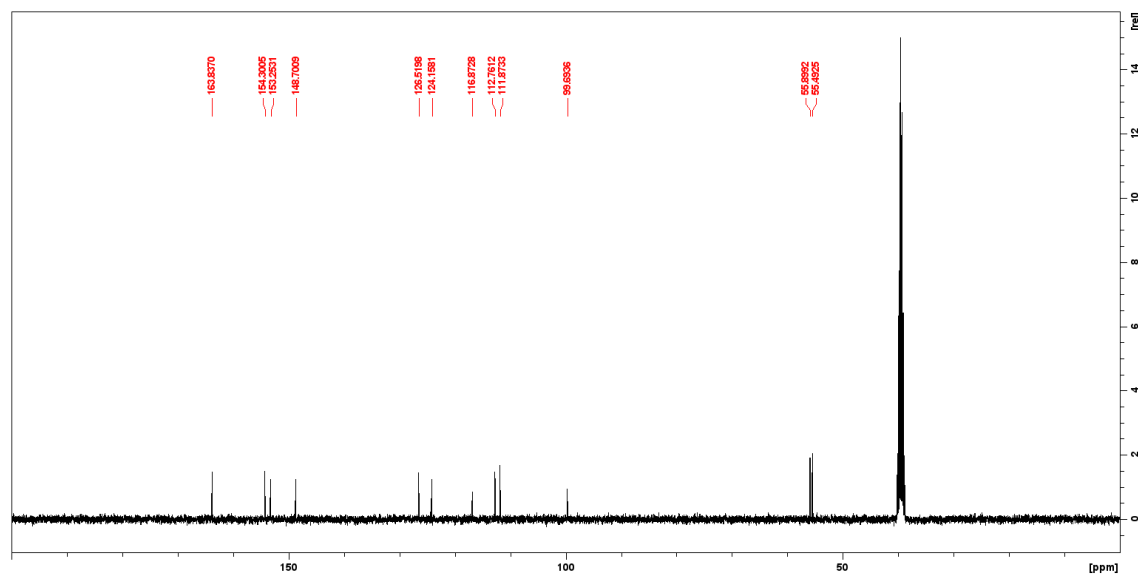
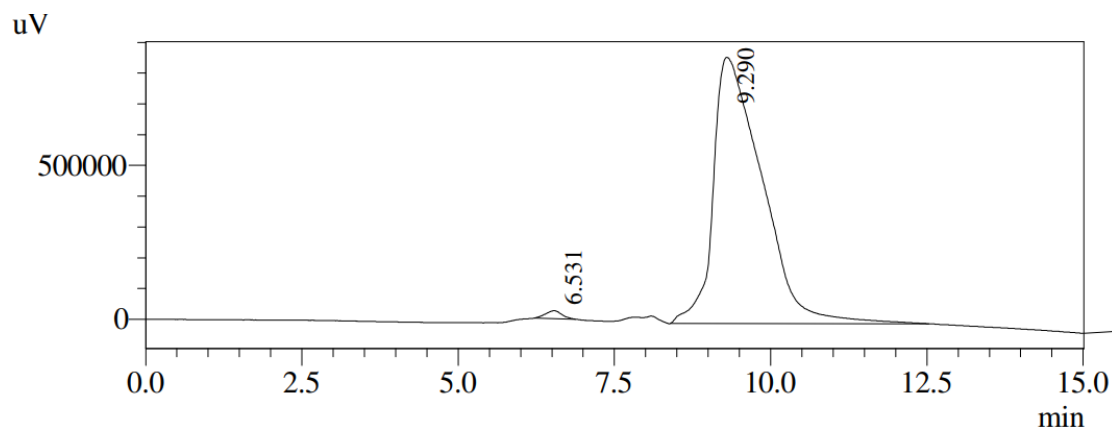
8.20 Anexo T

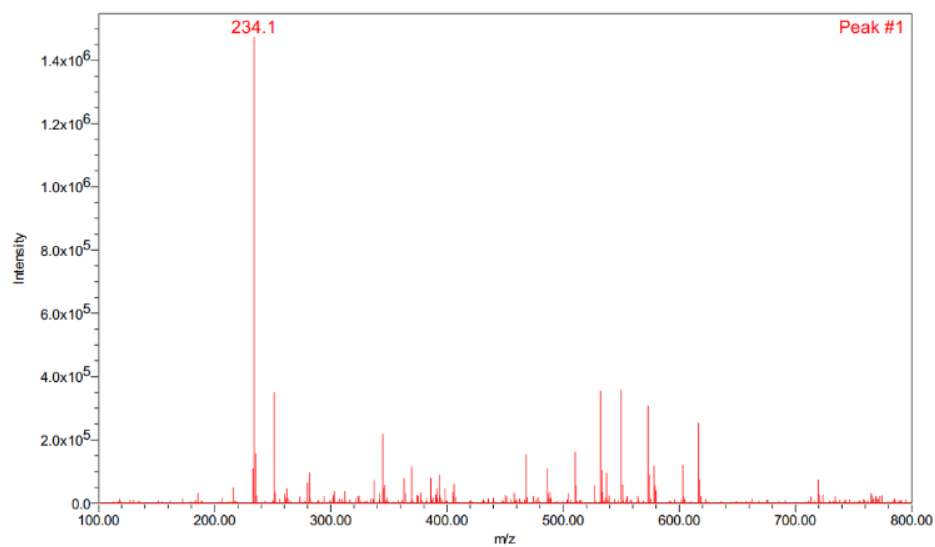
Espectro de RMN ^1H do composto (b10) (400MHz, DMSO- d_6)



Ampliação de δ 7.0-8.50 ppm do Espectro de RMN ^1H do composto (b10) (400MHz, DMSO- d_6)



Espectro de RMN ^{13}C do composto (b10) (100 MHz, DMSO- d_6)**Cromatograma de HPLC do composto (b10)**

Espectro de massas com ionização por electrospray do composto (b10)

HMRS ESI- (m/z): calculado para (C₁₂H₁₁NO₄): 233.22; encontrado ([M-H]⁻): 234.10.