

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

IEDA VIEIRA DA CUNHA

**Revisão de estudos da combinação de fotossensibilizadores com
inibidores de bomba de efluxo NorA na Terapia Fotodinâmica
Antimicrobiana e planejamento de um híbrido de Azure A com
Capsaicina**

UBERLÂNDIA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

**Revisão de estudos da combinação de fotossensibilizadores com
inibidores de bomba de efluxo NorA na Terapia Fotodinâmica
Antimicrobiana e planejamento de um híbrido de Azure A com
Capsaicina**

Ieda Vieira da Cunha

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Química, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Bacharel em
Química pela Universidade Federal de
Uberlândia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tayana Mazin Tsubone

Co-orientador: Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende
Júnior

Uberlândia

2023

Revisão de estudos da combinação de fotossensibilizadores com inibidores de bomba de efluxo NorA na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e planejamento de um híbrido de Azure A com Capsaicina

Ieda Vieira da Cunha

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Química pela Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tayana Mazin Tsubone

Co-orientador: Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior

Uberlândia-MG, 01 de Fevereiro de 2023

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Tayana Mazin Tsubone

Prof^a. Dr^a. Raquel Maria Ferreira de Sousa

Prof^a. Dr^a. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Stela Maris e Aluísio por todo apoio e cuidado durante todos esses anos, à minha sobrinha Helena e meu bichinho de estimação Mel por toda leveza e alegria diária. Aos meus orientadores Prof^ª. Tayana e Prof. Celso, pela oportunidade e toda assistência prestada durante meu período de pesquisa e graduação; aos colegas do LiFeBio: Maynne, Tayná, Patrícia e do LaSFar, em especial Thibault e Douglas, que foram essenciais para a execução desse trabalho.

Aos meus melhores amigos, companheiros de graduação e de QuímEJ, Gabriel Terra, Monalysa e Ítalo, por me inspirarem a persistir e a crescer pessoalmente. A todos meus amigos que me acompanharam durante esses anos, Ana Luiza, Maria Gabriela, Gustavo, Amanda, Rafael, Brenda, Julia, Laura Jäger e Gabriel Damasceno.

À FAPEMIG (Projeto Universal APQ-00704-21), CNPq e CAPES pelos auxílios financeiros.

Resumo

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) tem como objetivo a inativação de microrganismos por meio da fotossensibilização a partir de um composto reativo na presença de luz, que por sua vez, libera espécies reativas de oxigênio (EROs), em especial o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que são danosas à célula. Existem várias classes de fotossensibilizadores (FSs), os quais podem ser aplicados em células eucarióticas e procarióticas, a depender de suas propriedades químicas. Os compostos fenotiazínicos foram inicialmente estudados para aplicação em células tumorais; porém, devido à sua natureza catiônica e atividade antibiótica mesmo sem a presença de luz, têm sido estudados em TFDA por apresentarem maior afinidade às paredes celulares de bactérias, em especial as Gram-positivas. Além disso, sabe-se que a fotoatividade destes compostos é reduzida em várias espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas devido à presença de bombas de efluxo na membrana das células que transportam ativamente substâncias tóxicas para o seu exterior, o que confere multirresistência aos fármacos nesses microrganismos. A bomba de efluxo NorA da *Staphylococcus aureus* é um exemplo de mecanismo de resistência, que tem como substrato compostos catiônicos tais como os FS de fenotiazina; assim, a atividade antibiótica se torna reduzida. A alternativa estudada para aplicação da TFDA nessas células se baseia na utilização, sinérgica ou por modificação de FSs, de inibidores das bombas de efluxo, que competem com os fotossensibilizadores e permitem sua incorporação na membrana. Nesse projeto revisou-se as propriedades já conhecidas dos compostos fenotiazínicos, além de propor uma nova estrutura a partir da ligação do Azure A (FS) a um inibidor da bomba de efluxo NorA, a Capsaicina, de origem natural. As rotas de síntese propostas para o composto alvo foram testadas em um composto modelo, onde a eterificação do fragmento fenólico do 2-metóxfenol para posterior amidação do FS apresentou maior quimiosseletividade em comparação à amidação seguida de substituição nucleofílica.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA), Bomba de efluxo NorA, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

Antimicrobial Photodynamic therapy (aPDT) is a method of inactivating microorganisms through photosensitization using a reactive compound in the presence of light (PS), that causes the release of reactive oxygen species (ROS), especially singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), which are known for damaging cells. There are several classes of photosensitizers that can be applied in eukaryotic and prokaryotic cells, and its application in each case depends upon their chemical properties. Phenothiazine compounds were initially designed for Photodynamic therapy to tumor cells; however, due to their cationic nature and antibiotic activity even in the dark, they are studied in TFDA due to their high affinity to the bacterial cell walls, especially in Gram-positive. In addition, it is known that the photoactivity of these compounds is reduced in species of Gram-positive and Gram-negative bacteria as a consequence of the presence of efflux pumps in the membrane, that actively transport toxic substances throughout the cell, which confers Multiresistance to drugs in several microorganisms. The NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus* is an example of a resistance mechanism, that has cationic compounds as substrates, such as phenothiazine PSs; therefore, the antibiotic activity becomes reduced. For the application of aPDT in these cells is necessary the use, through synergy or through modification of PSs, of efflux pump inhibitors, that are site competitors against photosensitizers and allow their incorporation into the membrane. In this project, known properties of phenothiazine compounds were revised, in addition to proposing a new structure based on the connection of Azure A (PS) to a NorA efflux pump inhibitor, Capsaicin. The synthesis routes for the target compound were tested in a model compound, where the etherification of the phenolic fragment of 2-methoxyphenol for subsequent amidation of the PS showed greater chemoselectivity when compared to amidation followed by nucleophilic substitution.

Keywords: Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT), efflux pump NorA, *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos 4 principais mecanismos de resistência a nível celular: (a) alteração na permeabilidade (b) modificação de sítios ativos por meio de mutações, THG ou resistência adaptativa (c) modificação ou degradação de fármacos a partir de ação enzimática (d) bombas de efluxo.	18
Figura 2. Classes de bombas de efluxo nas bactérias: ABC, MFS, MATE, SMR e RND.	21
Figura 3. Esquema das reações tipo I e tipo II presentes na TFD.	25
Figura 4. Representação das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	27
Figura 5. Estrutura geral do fulereno.	40
Figura 6. Representação do espectro de comprimentos de onda.	41
Figura 7. (A) Espectro de absorção de diferentes cromóforos endógenos, presentes nos tecidos biológicos. (B) Esquema da propagação de luz através do tecido.	42
Figura 8. Alguns inibidores de bombas de efluxo utilizadas no estudo de Tegos, 2008.	44
Figura 9. FSs utilizados no estudo de Tegos, 2008.	44
Figura 10. Esquema representativo da TFDA a partir da ação sinérgica entre FS (fotossensibilizador) e EPI (inibidor de bomba de efluxo, do inglês “ <i>efflux pump inhibitor</i> ”), com administração do FS após o EPI (A), em conjunto ao EPI (B) e do FS anterior ao EPI (C).	45
Figura 11. Estrutura do Cloridrato de Verapamil.	45
Figura 12. Estrutura do FS HB:La ³⁺	46
Figura 13. Estruturas do FS S-PS e inibidor CCCP utilizados no estudo Jia <i>et al</i> 2019.	47
Figura 14. Estruturas dos derivados de porfirina TPP, CITPP, Cl ₂ TPP, Cl ₂ TPPS, TPPS e TMPyP.	48
Figura 15. Esquema representativo da TFDA a partir da ligação covalente entre FS (fotossensibilizador) e EPI (inibidor de bomba de efluxo, do inglês “ <i>efflux pump inhibitor</i> ”).	49
Figura 16. Híbridos de Azul de Metileno e diferentes inibidores da bomba de efluxo NorA sintetizados em Rineh, 2017.	50
Figura 17. Híbridos em Rineh, 2017 que apresentaram maior atividade contra MRSA.	50
Figura 18. Híbridos em Rineh, 2018 testados em:	51
Figura 19. Estrutura do Azure A.	52
Figura 20. Estrutura da Capsaicina.	52

Figura 21. Estrutura da molécula alvo constituída de Azure A (vermelho), que representa um FS, ligada covalentemente à Capsaicina (azul), que é um inibidor de bomba de efluxo (NorA) da <i>S. aureus</i> , por um conector com um grupo carbonílico.	53
Figura 22. Composto modelo 2, baseado na similaridade de reatividade com o FS derivado, onde a <i>p</i> -nitroanilina (vermelho) mimetiza o Azure A, e o 2-metóxfenol (azul) a capsaicina.	58
Figura 23. CCD após 96h da amidação da <i>p</i> -nitroanilina com HOBt e EDC à temperatura ambiente (a); CCD após 24h à 85°C, com maior consumo de MP (b); CCD após 24h à 120°C (c). R equivale ao MP (<i>p</i> -nitroanilina), M a misto e P ao produto. Eluente: hexano/acetato de etila (7:3)	61
Figura 24. RMN de ¹ H do precipitado da reação da <i>p</i> -nitroanilina, ácido 2-bromoacético, HOBt e EDC (RMN de ¹ H, 400MHz, DMSO-d ₆).	61
Figura 25. CCD da amidação da <i>p</i> -nitroanilina com cloreto de ácido após 24h (a); CCD após 48h (b). MP equivale ao material de partida (<i>p</i> -nitroanilina), M a misto e P ao produto de reação. Eluente: hexano/acetato de etila (7:3)	64
Figura 26. CCD após extração (amidação da <i>p</i> -nitroanilina com cloreto de ácido) com água/acetato de etila (a); CCD após tratamento com iodo (b). A é referente à fração aquosa, M misto e O a fração orgânica. Eluente: hexano/acetato de etila (7:3)	65
Figura 27. RMN de ¹ H do produto extraído da reação da <i>p</i> -nitroanilina, cloreto de ácido 2-bromoacético (intermediário A) (RMN de ¹ H, 400MHz, DMSO-d ₆).	65
Figura 28. CCD após 4h de reação de síntese do intermediário B (a e b), MP (2-metóxfenol) equivale ao material de partida, M a misto e P ao produto de reação; CCD após extração com água/acetato de etila (c), onde FA é fase aquosa, M é misto e FO a fase orgânica. Eluente: hexano/acetato de etila (8:2).	68
Figura 29. RMN de ¹ H do produto extraído da reação para produção do intermediário B (RMN de ¹ H, 400MHz, CDCl ₃).	69
Figura 30. CCD após 2h de reação de síntese do intermediário C. MP é o material de partida (intermediário B), M é misto e P o possível produto. Eluente: DCM/metanol (9:1)	71
Figura 31. RMN de ¹ H do produto filtrado da reação para produção do intermediário C (RMN de ¹ H, 400MHz, DMSO-d ₆).	71
Figura 32. RMN de ¹ H do material extraído da reação para produção do intermediário C (RMN de ¹ H, 400MHz, DMSO-d ₆).	72
Figura 33. CCD após 6h de reação de síntese com EDC e HOBt do Composto 4. Da esquerda para a direita: “A” corresponde ao Azure A, “M” misto entre Azure e produto, “P” ao produto, “M” ao misto entre possível produto e ácido C e, “C” ao ácido intermediário C. Em (a)	

nota-se o consumo do ácido, o que demonstrou formação do éster ativado. Eluente: DCM/metanol (9:1).	74
Figura 34. CCD após 24h de reação de síntese com EDC e HOBt do Composto 4 (a e b), onde o consumo do Azure A (MP) não foi visível. CCD após extração (direita), onde “A” é fase aquosa, “M” misto e “O” fase orgânica, onde a maior concentração de FS se situou na fase aquosa “A”. Eluente: DCM/metanol (9:1) e DCM/metanol (85:15).	74
Figura 35. RMN de ^1H do produto extraído da reação com HOBt e EDC para produção do Composto 4. (RMN de ^1H , 400MHz, DMSO- d_6).	75
Figura 36. CCD após 24h de reação de síntese do Composto 4 à temperatura ambiente a partir do cloreto de ácido. “MP” é material de partida Azure A, “M” misto e “P” o possível produto. Eluente: DCM/metanol (9:1).	76
Figura 37. CCD após 6h (a) e após 48h (b) de aquecimento da síntese do Composto 4 a partir do cloreto de ácido. “MP” é material de partida Azure A, “M” misto e “P” o possível produto. Eluente: DCM/metanol (9:1).	77
Figura 38. A: CCD após secagem do solvente da síntese do Composto 4 a partir do cloreto de ácido. “A” é o FS, “MP” é o ácido, “M” misto entre ácido e produto e “P” o possível produto. Eluente: DCM/metanol (9:1). B: CCD do material após secagem onde “MP” é o Azure A, “M” misto entre Azure A e produto e “P” o possível produto. Eluente: n-butanol/ácido acético/água (4:1:5).	77
Figura 39. RMN de ^1H do produto da reação via cloreto de ácido para produção do Composto 4. (RMN de ^1H , 400MHz, DMSO- d_6).	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes de FS e alguns exemplos estudados.	29
Tabela 2. Dados de RMN de ^1H do composto 3 (DMSO- d_6).	62
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H do intermediário A (DMSO- d_6).	66
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H do intermediário B (CDCl_3).	69
Tabela 5. Dados de RMN ^1H do produto filtrado do intermediário C (DMSO- d_6).	72

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Proposta de síntese para o derivado de Azure A com fragmento de Capsaicina. .	57
Esquema 2. Esquema de síntese proposto para o composto modelo 2.	58
Esquema 3. Rota de síntese para obtenção do intermediário A com EDC e HOBt.	59
Esquema 4. Mecanismo de reação de amidação via EDC e HOBt.	60
Esquema 5. Rota de síntese para obtenção do intermediário A via formação de cloreto de ácido.	62
Esquema 6. Mecanismo de reação da formação do cloreto de ácido a partir do cloreto de oxalila e DMF.	63
Esquema 7. Mecanismo de reação de amidação via cloreto de ácido.	64
Esquema 8. Representação de isômeros formados a partir dos efeitos de ressonância do intermediário A.	66
Esquema 9. Nova rota sintética para a síntese do Composto Modelo 2 ou Composto 4.	67
Esquema 10. Rota de síntese para obtenção do intermediário B.	67
Esquema 11. Mecanismo de reação de substituição nucleofílica.	68
Esquema 12. Rota de síntese para obtenção do intermediário C.	70
Esquema 13. Mecanismo de reação da hidrólise do éster em meio básico.	70
Esquema 14. Rota de síntese para obtenção do Composto 4 a partir de EDC e HOBt.	73
Esquema 15. Rota de síntese para obtenção do Composto 4 a partir de Cloreto de Ácido.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Superfamília " <i>ATP-Binding Cassette</i> "
CA-MRSA	<i>Staphylococcus</i> resistente à meticilina encontradas na comunidade
CCD	Cromatografia em camada delgada
DCM	Diclorometano
DMF	N,N-dimetilformamida
EDC	Cloridrato de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EP	Bomba de efluxo (do inglês " <i>Efflux Pumps</i> ")
EPI	Inibidor de bomba de efluxo (do inglês " <i>efflux pump inhibitor</i> ")
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Et ₃ N	Trietilamina
FS	Fotossensibilizador
G(-)	Gram-negativa
G(+)	Gram-positiva
HOBt	N-hidroxibenzotriazol
IMP	Proteína transportadora de membrana interna (do inglês " <i>Inner Membrane Protein</i> ")
MATE	Superfamília " <i>Multidrug and toxic compound extrusion</i> "
MDR	Resistente a múltiplas drogas (do inglês " <i>Multidrug-resistant</i> ")
MFS	Superfamília " <i>Major Facilitator Superfamily</i> "
MFP	Proteína de fusão membrana periplasmática (do inglês " <i>Membrane Fusion Protein</i> ")
MP	Material de Partida
MRSA	<i>Staphylococcus</i> resistente à meticilina
¹ O ₂	Oxigênio singlete
OMP	Proteína transportadora de membrana externa (do inglês " <i>Outer Membrane Protein</i> ")
PBP	Proteínas de ligação à penicilina
RAM	Resistência Antimicrobiana
RND	Superfamília " <i>Resistance-Nodulation-cell-Division</i> "
RPP	Proteínas de proteção ribossomal
SMR	Superfamília " <i>Small Multidrug Resistance</i> "

SPE	Substâncias poliméricas extracelulares
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFDA	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
THG	Transferência horizontal de genes
VISA	<i>S. aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina

SUMÁRIO

Resumo	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ESQUEMAS	11
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	16
1.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	18
1.3 RESISTÊNCIA POR MEIO DE BOMBAS DE EFLUXO	20
1.4 MICRORGANISMOS MAIS COMUNS NAS INFECÇÕES QUE ACOMETEM TECIDOS SUPERFICIAIS	23
1.5 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COMO ALTERNATIVA NO COMBATE À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	24
1.5.1 Influência da estrutura da membrana celular na TFDA	26
1.6 FOTOSSENSIBILIZADORES (FSs)	28
1.7 SISTEMAS DE IRRADIAÇÃO MAIS UTILIZADOS	40
1.8 FSs ASSOCIADOS À INIBIDORES DE BOMBAS DE EFLUXO, TENDO COMO ALVO MECANISMOS DE RESISTÊNCIA MICROBIANA POR EFLUXO	42
1.9 PLANEJAMENTO DE UM COMPOSTO HÍBRIDO DERIVADO DE AZURE A E CAPSAICINA	51
2 OBJETIVO	53
2.1 OBJETIVOS GERAIS	53
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	54
3.1 SÍNTESE DO COMPOSTO MODELO	54
3.1.1 Amidação seguida por substituição nucleofílica	54
3.1.1.1 Amidação da <i>p</i> -nitroanilina com HOBt e EDC	54
3.1.1.2 Amidação da <i>p</i> -nitroanilina via formação de cloreto de ácido	54
3.2.1 Eterificação seguida por amidação	55
3.2.1.1 Substituição Nucleofílica	55
3.2.1.2 Hidrólise do intermediário B	55
3.2.1.3 Amidação com AZURE A	55
3.2.1.3.1 Amidação com Azure A via EDC e HOBt	55
3.2.1.3.2 Amidação via cloreto de ácido	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 PLANEJAMENTO DE SÍNTESE DO COMPOSTO HÍBRIDO DE AZURE A E CAPSAICINA	57
4.2 INVESTIGAÇÃO DA ROTA SINTÉTICA EM ESTRUTURAS QUÍMICAS SIMPLIFICADAS	57
4.3 SÍNTESE DO COMPOSTO MODELO	58

4.3.1 Amidação seguida por substituição nucleofílica	58
4.3.1.1 Amidação com HOBt e EDC	59
4.3.1.2 Amidação via formação de cloreto de ácido	62
4.3.2 Eterificação seguida por amidação	67
4.3.1.1 Substituição nucleofílica	67
4.3.1.2 Hidrólise do intermediário B	70
4.3.1.3 Amidação com AZURE A	73
<i>4.3.1.3.1 Amidação com Azure A via EDC e HOBt</i>	73
<i>4.3.1.3.2 Amidação com Azure A via cloreto de ácido</i>	75
5 CONCLUSÃO	79
6 REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Resistência antimicrobiana (RAM) é definida pela diminuição da eficácia de medicamentos que combatem microrganismos como bactérias, vírus, fungos e outros patógenos, em decorrência de adaptações evolutivas. Consequentemente, vários antibióticos e outros fármacos antimicrobianos presentes no mercado se tornam obsoletos frente às infecções, o que torna inevitável o uso de medicamentos de alto custo e difícil acesso. Antibióticos de classes carbapenêmicos e polimixinas, além de diminuir as chances de recuperação e aumentar os custos dos serviços de saúde, representando uma perda de 9 bilhões de euros por ano na Europa e de 35 bilhões de dólares nos EUA (OMS, 2021; DADGOSTAR, 2019).

Ademais, a RAM pode tornar procedimentos médicos como cirurgias, diálises e quimioterapias mais arriscados, e impactar a vida de pessoas com condições crônicas tais como asma, diabetes e artrite reumatóide. A cada ano, ocorrem por volta de 700.000 mortes, a cada ano, em decorrência da RAM; caso não sejam descobertas novas alternativas frente aos antibióticos tradicionais, acontecerão, em média, 10 milhões de mortes por ano até 2050, ultrapassando diabetes, doenças cardíacas e câncer como as principais causas de morte em humanos (MORRISON, ZEMBOWER, 2020; DADGOSTAR, 2019).

Antes mesmo da descoberta dos fármacos antimicrobianos, a resistência já era presente nos microrganismos: bactérias isoladas de águas glaciais com datação de mais de 2.000 anos apresentaram resistência à ampicilina, outras obtidas do *permafrost*, de cerca de 30.000 anos, exibiram resistência à vancomicina; a *Staphylococcus aureus* é conhecida por ser resistente à penicilina desde a sua introdução no mercado, em 1940. Em contrapartida, algumas linhagens de bactérias resistentes só surgiram a partir da sua exposição a antibióticos: após a introdução da meticilina em 1959, foi reportado o aparecimento da *Staphylococcus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) nos anos 1960; 20 anos após o surgimento da Vancomicina, a existência de *Staphylococcus coagulase* negativa resistente à vancomicina foi reportada; 10 anos depois, a resistência de *Enterococcus* foi descrita e, em 1997, houve o surgimento de linhagens de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA, do inglês *Vancomycin Intermediate S. aureus*). O mesmo foi observado para outras classes de antibióticos como a tetraciclina e levofloxacina,

em outras espécies de bactérias. Assim, foi possível o aparecimento de bactérias multirresistentes, tais como *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e MRSA, que prolongam o tempo de hospitalização e impacta economicamente nos sistemas de saúde (MORRISON, ZEMBOWER, 2020; CHRISTAKI, *et al.*, 2020).

A resistência antibiótica pode ser intrínseca, adquirida ou adaptativa. A resistência intrínseca é um fenômeno natural, inerente às propriedades da bactéria e universalmente encontrada no genoma de uma espécie, que independe da exposição aos antibióticos. Os mecanismos desse tipo de resistência normalmente estão relacionados à permeabilidade da membrana, que impede a entrada e acúmulo do fármaco no interior da célula, à presença de bombas de efluxo, que bombeiam antibióticos e outras moléculas para fora da célula. Por fim, também é relacionada à falta de sítios ativos que se ligam ao antibiótico (CHRISTAKI, *et al.*, 2020).

A resistência adquirida, resultante da exposição a antibióticos, é decorrente de mutações ou da aquisição de material genético por meio da transferência horizontal de genes (THG), na qual uma bactéria previamente sensível ao fármaco adquire a resistência. Por fim, a resistência adaptativa, que também causa preocupação, ocorre em resposta a estímulos ambientais: estresse, pH, concentração de íons, presença de nutrientes, entre outros. Ao contrário da adquirida, a resistência adaptativa é transitória e acontece a partir da modulação da expressão genética frente às mudanças do meio; existem evidências que a metilação do DNA de bactérias por meio de enzimas é responsável pelos diferentes traços de expressão genética em uma população bacteriana. Um exemplo é a modulação da expressão de bombas de efluxo e porinas, que tem sido apontada no surgimento de resistência adaptativa. Esse acontecimento também pode ser o responsável pela discrepância de resultados observados em testes *in vivo* e *in vitro* para a eficácia de antibióticos (MORRISON, ZEMBOWER, 2020; CHRISTAKI, *et al.*, 2020).

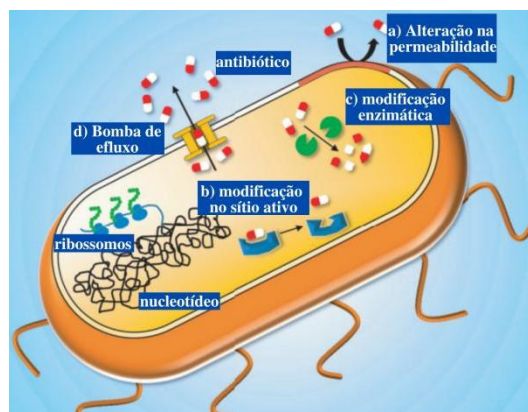
Bactérias se reproduzem rapidamente, o que causa mudanças evolutivas em curtos períodos de tempo, e a exposição e o mau uso de antibióticos gera uma pressão seletiva nestes microrganismos, o que favorece a sobrevivência das bactérias que adquiriram a resistência. Como a taxa de descoberta de novas classes de antibióticos não acompanha a taxa do aparecimento de novas linhagens resistentes, infecções por microrganismos multirresistentes e extensivamente resistentes tornam-se um dos principais alertas da saúde pública mundial (MORRISON, ZEMBOWER, 2020; CHRISTAKI, *et al.*, 2020).

1.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Existem dois níveis de RAM: o celular e o da colônia. A resistência a nível celular é em fator de expressões gênicas, seja por mutação ou pela THG. A resistência de um grupo de bactérias pode superar a resistência individual em relação ao estresse ambiental, o que é visualizado nos biofilmes, que cresce em até 1000 vezes a persistência bacteriana. Os biofilmes são formados a partir do encapsulamento da comunidade de microrganismos, em uma superfície inerte, por uma matriz hidratada de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), secretadas pela colônia. A formação de SPE é correlacionada a 65% das infecções hospitalares, pois age como barreira protetora aos antimicrobianos (CHENG, 2016; WANG, 2019).

Nas células, existem quatro mecanismos diferentes, representados na Figura 1, que resultam na resistência aos fármacos: (1) diminuição da absorção ou acúmulo de fármacos por diminuição da permeabilidade da membrana ou por aumento da expressão de bombas de efluxo presentes na membrana celular; (2) inativação ou modificação de fármacos por meio de enzimas, que podem destruir ou alterar antibióticos e outros medicamentos; (3) alteração do alvo ou sítio ativo que se liga ao fármaco; (4) mudança de rotas metabólicas, tendo como exemplo a habilidade de *Enterococcus* de absorver ácido fólico a partir do ambiente, o que permite o contornar os efeitos de Sulfametoxazol (MORRISON, ZEMBOWER, 2020; CHRISTAKI, *et al.*, 2020; NAINU, 2021).

Figura 1. Representação dos 4 principais mecanismos de resistência a nível celular: (a) alteração na permeabilidade (b) modificação de sítios ativos por meio de mutações, THG ou resistência adaptativa (c) modificação ou degradação de fármacos a partir de ação enzimática (d) bombas de efluxo.



Fonte: SHARMA, 2019.

Bactérias Gram-negativas possuem permeabilidade limitada, devido à membrana celular externa de lipopolissacarídeo. A permeabilidade dessa membrana ocorre em função de proteínas especiais, as porinas, que estabelecem canais específicos, por onde antibióticos hidrofílicos (β -lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclina e cloroanfenicol) permeiam para o espaço periplasmático e, em seguida, para o interior da célula. A permeabilidade reduzida é responsável pela resistência intrínseca dos bacilos Gram-negativos à penicilina, eritromicina, clindamicina e vancomicina. Tanto a quantidade, quanto o tipo de porinas expressadas na membrana afetam na absorção de fármacos; mutações que afetam a expressão ou função dessas proteínas podem resultar em resistência adquirida (CHRISTAKI, *et al.*, 2020).

Bombas de efluxo são sistemas complexos dependentes de energia (efluxo ativo), presentes nas membranas citoplasmáticas das células, que bombeiam moléculas tóxicas para seu exterior. A resistência às tetraciclina codificada por plasmídeos em *Escherichia coli* resulta deste efluxo. A maioria dos sistemas de efluxo não são específicas e podem causar a multirresistência. Os efluxos são codificados cromossomicamente, o que pode ser a causa da resistência intrínseca de alguns microrganismos frente a alguns fármacos (CHRISTAKI, *et al.*, 2020).

A inativação enzimática de fármacos pode ser realizada a partir da degradação da molécula ou da mudança de um grupo funcional. As enzimas que têm esse papel são divididas em três classes baseadas no tipo de reação: hidrolases, oxido-redutases, ou transferases. As β -lactamases são um exemplo de hidrolases, uma vez que hidrolisam a ligação amida do anel β -lactâmico essencial para atividade antimicrobiana, o que os torna inefetivos. β -lactamases são encontradas, principalmente, em bactérias Gram-negativas, porém também estão presentes na *S. aureus*, o que as torna intrinsicamente resistentes à penicilina. Além da degradação do grupo β -lactâmico, tetraciclina também são degradadas por enzimas oxidorreduções dependentes de NADPH na *Escherichia coli* (NAINU, 2021).

A alteração de sítios ativos constitui um dos mais importantes mecanismos de resistência adquirida, na qual bactérias podem adquirir um gene que codifica um novo sítio resistente ao antibiótico. *S. aureus* resistente à meticilina e estafilococos coagulase-negativos adquiriram o gene cromossômico *Mec A* e produzem uma proteína de ligação a penicilina (PBP, do inglês *penicillin-binding proteins*) resistente aos β -lactâmicos, suficiente para manter a integridade da parede celular durante o crescimento, quando outras proteínas são inativadas por antibióticos β -lactâmicos. Proteínas de proteção ribossomal (RPP, do inglês *ribosomal protection proteins*) são outro exemplo de resistência a partir da alteração de sítios ativos, presentes em bactérias Gram-positivas e negativas, onde as proteínas estabelecem a

resistência às quinolonas ao agir como um análogo ao DNA, reduzindo a interação de enzimas com o DNA e, conseqüentemente, a disponibilidade de sítios ativos de quinolonas (CHRISTAKI, *et al.*, 2020).

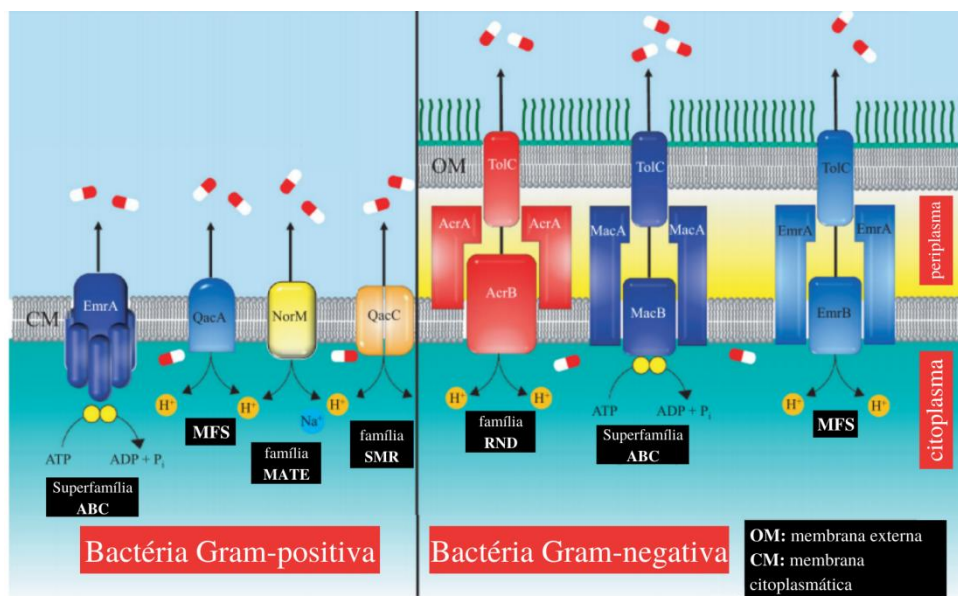
Por fim, alterações em rotas metabólicas e na regulação foram descritas na resistência à daptomicina em *Enterococcus* e *S. aureus*, além da resistência intermediária à vancomicina, também, da *S. aureus*. A daptomicina destrói a célula por meio de alterações da homeostase da membrana; nos *Enterococcus*, mutações de genes que codificam a homeostase da parede celular e de genes que codificam o metabolismo de fosfolipídeos estão associados ao desenvolvimento da resistência a daptomicina. Em *Staphylococcus aureus*, várias mutações de homeostase e da parede celular também resultaram nessa resistência. A resistência intermediária à vancomicina de *S. aureus* também parece estar associada a mutações que afetam a homeostase da célula (CHRISTAKI, *et al.*, 2020).

De modo geral, bactérias podem possuir tanto resistência intrínseca quanto adquirida, tendo assim, vários mecanismos. Microrganismos multirresistentes (MDR, do inglês *multiple drug resistant*) são resultantes de mais de um mecanismo, o que torna o tratamento mais difícil (MORRISON, ZEMBOWER, 2020).

1.3 RESISTÊNCIA POR MEIO DE BOMBAS DE EFLUXO

Bombas de efluxo (EPs, do inglês *efflux pumps*) utilizam de canais transportadores presentes na membrana celular, constituídas por proteínas, que atuam como defesa frente ao estresse ambiental; vários substratos como detergentes, antibióticos, metabólitos, corantes e toxinas são eliminados por bombas de efluxo. Como são bombas que atuam contra o gradiente de concentração, são dependentes de energia, ou seja, são bombas de efluxo ativas. Ao todo, existem cinco classes de bombas de efluxo relacionadas a MDR: três são bombas de próton (H^+), sendo elas a superfamília “*Resistance-Nodulation-cell-Division*” (RND), as proteínas pertencentes à “*Major Facilitator Superfamily*” (MFS) e a família “*Small Multidrug Resistance*” (SMR); uma bomba de íons Na^+ , que são os transportadores “*Multidrug and toxic compound extrusion*” (MATE); por fim, a família “*ATP-Binding Cassette*” (ABC), que utiliza energia derivada da hidrólise de ATP para conduzir o transporte. As classes SMR, RND e MATE são exclusivamente encontradas em procariotos, visualizado na Figura 2 (NAINU, 2021; ALMATAR, 2021).

Figura 2. Classes de bombas de efluxo nas bactérias: ABC, MFS, MATE, SMR e RND.



Fonte: SHARMA, 2019.

As proteínas RND são encontradas apenas em bactérias Gram-negativas, e possuem estruturas e funcionamentos complexos devido a sua parede celular em multicamadas; são caracterizadas pela associação entre três proteínas: uma proteína transportadora de membrana interna (IMP), uma proteína membrana externa (OMP) e uma proteína de fusão membrana periplasmática (MFP), o que atravessa o espaço periplasmático, e permite o efluxo de vários compostos através das membranas. Os genes codificantes das bombas de efluxo da família RND geralmente localizam-se no cromossomo, embora podem estar presentes em plasmídeos; são responsáveis pela resistência a fluoroquinolonas, β -lactamas, tetraciclina e linezolida. Esta família de bombas ocorre em *E. coli* e *Salmonella enterica* através da bomba de efluxo *AcrAB-TolC*, *AdeABC* da *Acinetobacter baumannii*, e *MexAB-OprM* da *Pseudomonas aeruginosa* (ALMATAR, 2021; SHARMA, 2019; SEUKEP, 2022; CERNICCHI, 2021).

Nas bactérias Gram-positivas, as bombas de efluxo responsáveis pela resistência se localizam na membrana plasmática, na qual a família MFS é predominante, tal como a bomba de efluxo *NorA* da *S. aureus*, *PmrA* da *Streptococcus pneumoniae* e *EmeA* da *Enterococcus faecalis*, que bombeiam várias classes de antibióticos, especialmente compostos de amônia quaternária e fluoroquinolonas. A família SMR é constituída estruturalmente por pequenos polipeptídeos com uma sequência de aminoácidos de 100-150 moléculas, com quatro transmembranas com formato de α -hélice na membrana, de característica hidrofílica. As proteínas são codificadas por genes localizados em integrons e plasmídeos, o que contribui

para a THG; um exemplo é a *AbeS* em *A. baumannii*, envolvida no efluxo de amicacina e alguns compostos antisépticos tais como acriflavina e benzalcônio (ALMATAR, 2021; SHARMA, 2019; SEUKEP, 2022; CERNICCHI, 2021).

A superfamília MATE é estruturalmente caracterizada por 12 transmembranas em α -hélice; algumas classes são *DinF*, *NorM*, entre outras encontradas em células eucarióticas. Os substratos transportados são variados, de diferentes estruturas químicas, sendo as fluoroquinolonas o substrato mais reconhecido. Bombas de efluxo da *Neisseria gonorrhoeae* atuam contra ciprofloxacina, solitromicina e antimicrobianos carregados positivamente, tais como a amônia quaternária. Uma particularidade dessa família é a capacidade de bombear espécies reativas de oxigênio (EROs), eliminando o potencial de estresse oxidativo (SEUKEP, 2022).

Por fim, a família ABC é a única que utiliza transporte ativo primário, existente tanto em células procarióticas e eucarióticas, além de ter estruturas e funcionamento relativamente diferente para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Nas Gram-positivas, a constituição é de apenas uma transmembrana proteica, expressa em *EfrAB*, *LmrA*, *Msr*, e *PatA/B.EfrAB* em *Enterococcus faecalis*. Em bactérias Gram-negativas, a estrutura se assemelha ao da família RND, com associação de 3 proteínas para o transporte. Além de bactérias, a superfamília de proteínas transportadoras do tipo ABC regula o efluxo através da membrana celular de agentes quimioterápicos para células eucarióticas. A proteína resistente a múltiplas drogas 1 (MDR1), ou glicoproteína-P, é relacionada à resistência a quimioterápicos e responsável pela eliminação de vários fármacos. A superexpressão de MDR1 está associada ao fracasso quimioterapêutico em cânceres, tendo como exemplo o câncer de próstata tratado com doxorrubicina e paclitaxel; câncer de mama, com resistência a antraciclinas; e também está correlacionado com um pior prognóstico para câncer de pulmão metastático de pacientes tratados com cisplatina e etoposídeo. (SEUKEP, 2022; ROCHA, 2015).

As bombas de efluxo também estão relacionadas na tolerância à bile em enterobactérias, o que causa o crescimento da colônia, maior virulência, secreção de biofilme e maiores chances de sobrevivência no hospedeiro. Além disso, estão mais associadas à resistência intrínseca e geralmente codificado nos cromossomos, visualizado na *NorA* (SHARMA, 2019).

1.4 MICRORGANISMOS MAIS COMUNS NAS INFECÇÕES QUE ACOMETEM TECIDOS SUPERFICIAIS

As infecções que afetam a pele e tecidos moles podem ser classificadas em primárias, cuja contaminação ocorre diretamente na pele, o que resulta em supuração e inflamação; quando a infecção acontece através da via sanguínea, com comprometimento da parede dos vasos cutâneos e possível necrose da região, se trata de uma infecção cutânea secundária (PIRES, 2015).

As infecções podem ser relacionadas a fatores individuais, tais como baixa imunidade, característica na dermatite atópica e diabetes mellitus, predisposição genética, grau de patogenicidade do microrganismo, falta de higiene, entre outros fatores. O potencial invasivo da bactéria pode ser influenciado pela presença de elementos antifagocitários da bactéria e da sua capacidade de produção de toxinas, como ocorre na *S. aureus* (PIRES, 2015).

A saúde da pele depende de colônias de organismos, que constitui uma flora residente e auxiliam na resistência contra a colonização por bactérias patogênicas por meio da competição por nutrientes. Apesar do potencial patogênico, cerca de 25-30% de indivíduos saudáveis apresentam colonização ocasional por *S. aureus*, em locais como axilas, períneo, faringe, mãos e narinas (PIRES, 2015).

Assim, existem condições que geram propensão a colonização da pele por baixa resistência, dentre as quais estão os portadores de diabetes, que são mais predispostos a complicações metabólicas e infecciosas. Além disso, a diabetes pode alterar características biofísicas da pele; a neuropatia diabética e a insuficiência vascular periférica são comuns, o que predispõem à instalação de microrganismos patogênicos e desenvolvimento de lesões cutâneas. Também, o aumento da concentração da glicose no sangue provoca diminuição da difusão de nutrientes e migração dos leucócitos pelas paredes vasculares espessadas. O conjunto desses fatores torna portadores de diabetes mellitus mais vulneráveis a infecções que, geralmente, são benignas e de curta duração. Ademais, indivíduos que utilizam de corticóides e imunossupressores regularmente também são mais suscetíveis (PIRES, 2015).

As infecções superficiais mais comuns são: impetigo, foliculite, furúnculo, abscesso; as difusas mais habituais são celulite e erisipela, normalmente causadas por *S. aureus* e *Streptococcus*. Além dessas, *P. aeruginosa*, *Enterococcus spp.* e *E. coli* também são frequentes agentes patogênicos que afetam a pele e tecidos moles (STEELE, 2020).

Dentre os microrganismos resistentes, a *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistente a vancomicina são predominantes; infecções por MRSA têm gravidade acentuada, uma vez que pessoas infectadas tem 64% mais probabilidade de morte. Desde 1999, a proporção de a MRSA ultrapassa 50% entre os pacientes em UTI e, no Brasil, os índices de cepas MRSA são de 40% a 80%. Nos EUA, vários casos de MRSA na comunidade (CA-MRSA) foram documentados, muitos deles envolviam usuários de drogas ou indivíduos com doenças de base ou hospitalização prévia. Em contrapartida, infecções por bactérias de outros gêneros como *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Corynebacterium* e *Clostridium* são menos frequentes (STEELE, 2020; RODRIGUES, *et al.*, 2019).

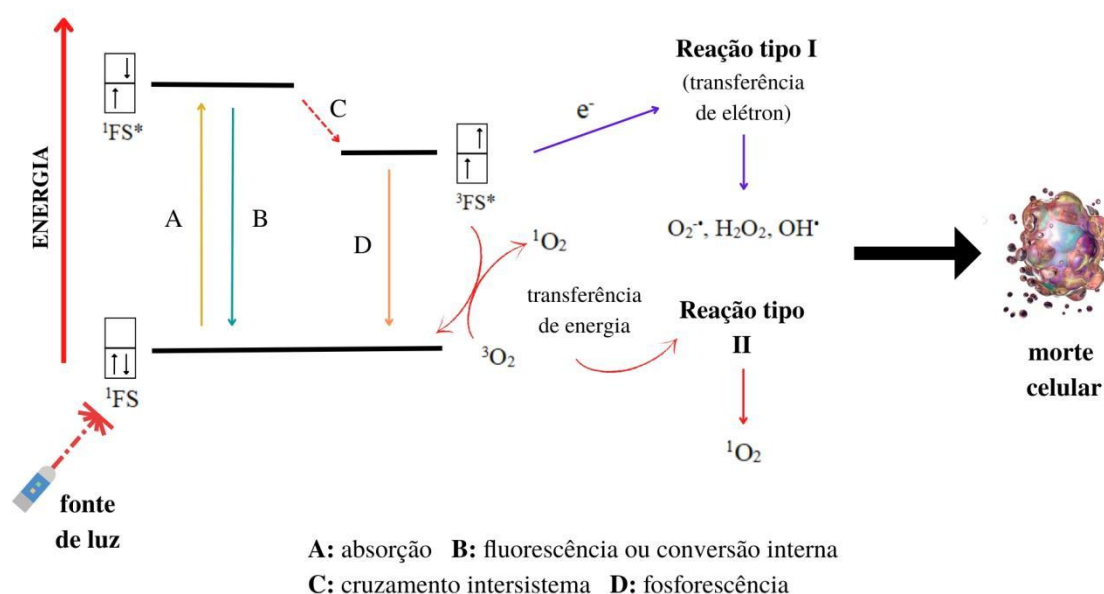
1.5 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COMO ALTERNATIVA NO COMBATE À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento baseado na interação dinâmica entre um Fotossensibilizador (FS), uma radiação de luz em um comprimento de onda específico e oxigênio molecular para promover a destruição do tecido alvo. Por si só, o FS não interage com biomoléculas a fim de produzir reações, porém, na presença de luz transfere energia para a molécula de O_2 para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como oxigênio singlete ($^1O_2$), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$) e, também peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Por meio desses produtos citotóxicos, ocorre uma série de reações fotoquímicas afim de induzir a morte celular (CORREIA, 2021).

O mecanismo das reações fotodinâmicas se inicia com a absorção de luz (Figura 3), que acarreta na transformação do FS do estado fundamental, singlete ^1FS , para o estado eletronicamente excitado de singlete $^1FS^*$, que é estável por cerca de poucos nanosegundos. Após esse tempo, o ocorre o decaimento para o estado fundamental novamente, com a liberação de energia em forma de fluorescência ou calor. Concomitantemente, o FS excitado também pode ser convertido para um estado excitado mais estável, o de tripleto $^3FS^*$, a partir da mudança de spin do elétron que ocupa o orbital mais energético. O estado tripleto, que tende a uma meia vida maior de microsegundos, permite transferência de energia para moléculas de O_2 , o que origina oxigênio singlete ($^1O_2$), o que configura a reação tipo II. Nessa reação, a espécie reativa de oxigênio formada interage com vários tipos de biomoléculas, o que causa a morte celular. Já na reação tipo I, o próprio FS no seu estado excitado reage com

os substratos biológicos para produzir radicais livres ou radicais iônicos, que por fim, reagem com O_2 e produzem EROs (CORREIA, 2021).

Figura 3. Esquema das reações tipo I e tipo II presentes na TFD.



Fonte: adaptado de CORREIA, 2021.

Todos os produtos formados nas reações tipo I e II são responsáveis pelo efeito da TFD e podem ocorrer simultaneamente nas células, cuja proporção varia de acordo com a quantidade de oxigênio disponível, tipo de FS e sua afinidade com membranas; porém, em sua maioria, o tipo II é mais dominante e o $^1O_2$ é o maior causador da citotoxicidade. Nas células tumorais, o mecanismo de ação da TFD é associado à destruição de células por meio da apoptose e necrose. Além disso, a destruição da vascularização em volta dos tumores leva ao bloqueio do transporte de oxigenação e nutrientes e resultar na morte celular por hipóxia. Ademais, a resposta inflamatória pode ser estimulada pela TFD, o que ativa a resposta imune e produção de anticorpos (CORREIA, 2021).

Além da aplicação em células tumorais, a TFDA é uma alternativa para o crescente surgimento de bactérias multirresistentes, cuja abordagem se baseia na fotossensibilização de patógenos com FSs. Suas vantagens frente aos antibióticos clássicos se baseiam em: (1) absorção ou interação predominante entre FS e célula alvo, (2) inatividade farmacodinâmica dos FSs não irradiados, (3) assim como a irradiação direcionada apenas à área infectada, onde a toxicidade está restrita apenas à região e não é sistêmica. Além disso, não foi documentada a resistência específica a algum FS (além das bombas de efluxo), ao contrário do que ocorre

com antibióticos, o que não possibilita a seleção natural de linhagens resistentes após múltiplos tratamentos (LIU, 2015).

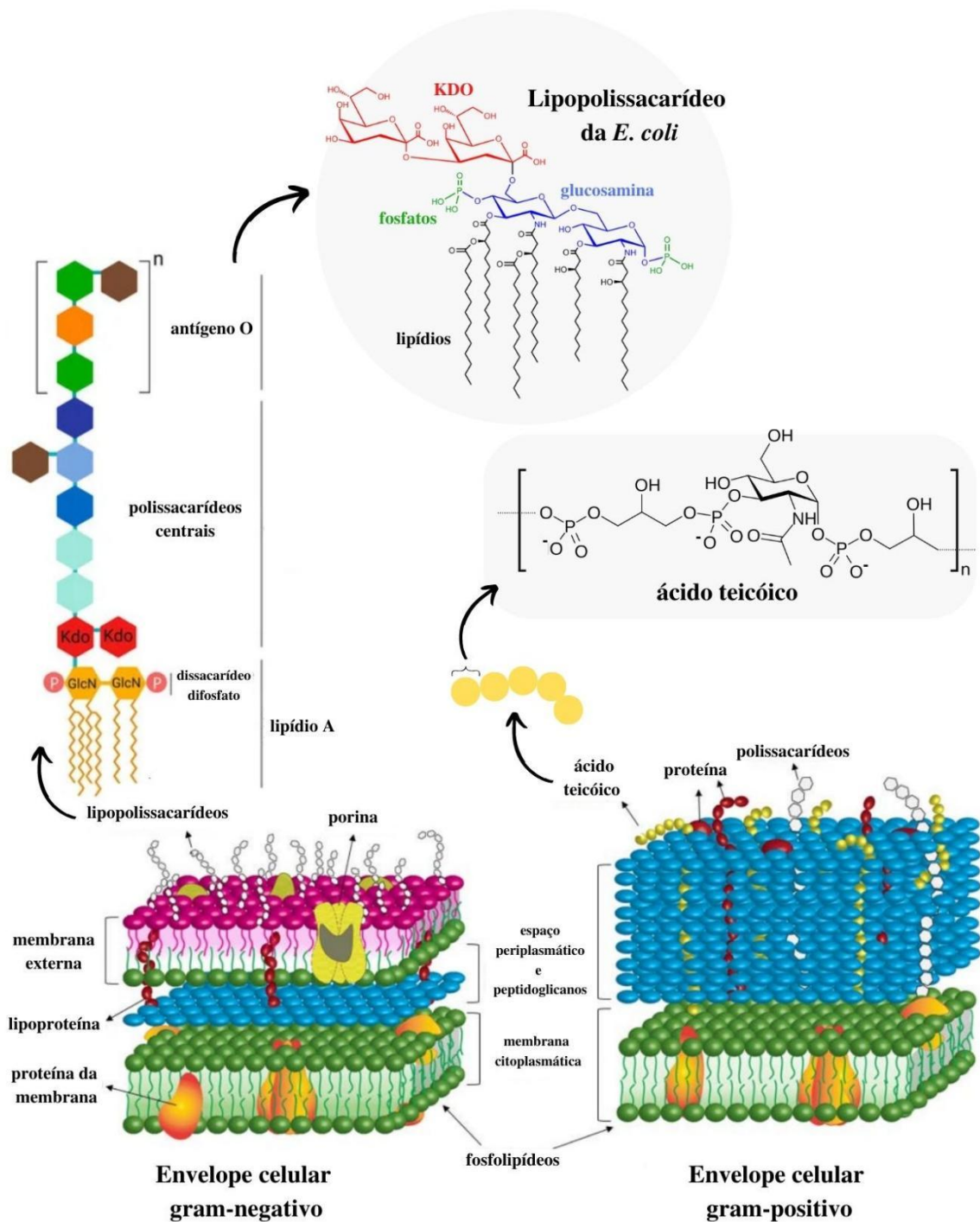
A falta de resistência específica a TFD se deve a alguns fatores; o intervalo entre administração do FS e irradiação é curto o suficiente para que a bactéria não desenvolva resistência, a falta de toxicidade dos FSs sem a presença de luz faz com que não haja a necessidade de desenvolver mecanismos de sobrevivência adaptativos, além de não ser possível reconhecê-los como a fonte do estresse oxidativo. Após a irradiação, a destruição celular é suficiente para impedir mecanismos de troca genética e, também, o alvo da TFDA, ao contrário de antibióticos tradicionais, não é específico a uma biomolécula presente na célula (LIU, 2015).

1.5.1 Influência da estrutura da membrana celular na TFDA

Na TFDA, a inativação do patógeno depende da interação do FS com a membrana celular e, nas bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, a superfície da parede celular é negativamente carregada (Figura 4); essa superfície aniônica atrai eletricamente FSs positivamente carregados. No entanto, alguns fatores devem ser considerados na escolha do FS: a membrana constituída por polissacarídeos de bactérias Gram-negativas forma uma barreira de proteção a várias substâncias químicas, porém pode ser um alvo do FS; sua estrutura aniônica, ao sofrer modificações redox pela TFDA, perde a sua integridade e resulta na morte celular. Também, FSs catiônicos competem com outros cátions importantes para a manutenção de lipopolissacarídeos, tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} , o que desestabiliza a membrana e possibilita formação de canais na membrana, que permite maior entrada de FSs (LIU, 2015).

Nas bactérias Gram-positivas, o ácido teicóico, a partir dos grupos carboxilatos e fosfatos (Figura 4), é responsável pela carga negativa da superfície celular, que também são sítios ligantes para Ca^{2+} e Mg^{2+} , que competem com o FS catiônico. Outro composto presente no envoltório celular é o peptidoglicano, que constitui uma camada mais grossa em bactérias Gram-positivas e confere proteção (Figura 4). Porém, devido a sua natureza porosa, é insuficiente na permeabilidade de maioria de FS, o que permite a difusão de tanto compostos catiônicos, quanto neutros e aniônicos. Assim, de modo geral, bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis a TFDA em comparação a Gram-negativa, o que pode ser uma vantagem no tratamento para infecções de *S. aureus* resistentes, como MRSA e VISA (LIU, 2015).

Figura 4. Representação das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



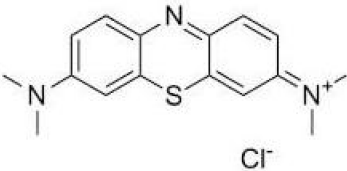
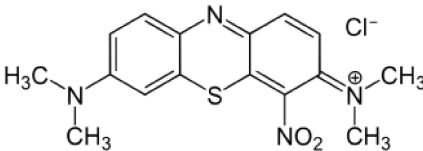
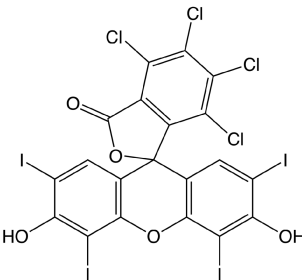
Fonte: adaptado de LIU, 2015; MAZGAEEN, 2020.

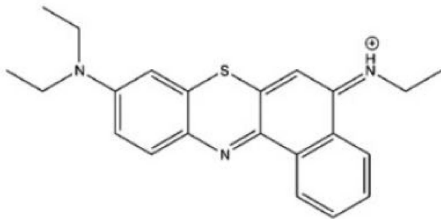
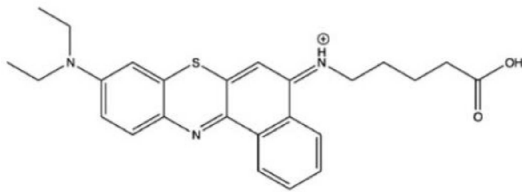
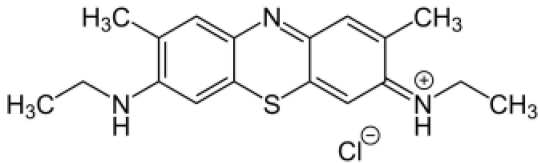
1.6 FOTOSSENSIBILIZADORES (FSs)

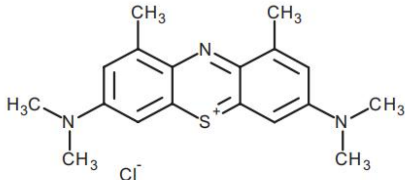
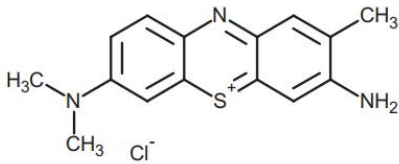
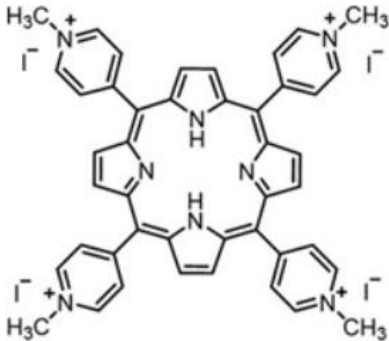
As classes de FS mais estudadas para aplicação a TFDA, listadas na Tabela 1, são as fenotiazinas, porfirinas, ftalocianinas e fulerenos, além da hipericina e curcumina, que são produtos naturais. A classe das fenotiazinas foi originalmente estudada para aplicação em células tumorais, porém podem ser aplicadas a TFDA em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, tais como a *S. aureus* sensível a meticilina (MSSA) e a MRSA, e *E. coli* devido à alta afinidade a membrana. Em algumas espécies de bactérias, a classe induz a citotoxicidade mesmo na ausência de radiação. Quanto ao seu mecanismo, o principal alvo da TFDA é o DNA citoplasmático, e quanto maior a quantidade de cargas positivas, maior a eficácia, devido ao aumento da interação com a membrana bacteriana. Entretanto, as fenotiazinas são substratos alvo de bombas de efluxo, assim, a utilização de inibidores de bombas de efluxo em conjunto ao FS pode aumentar a atividade biológica (LIU, 2015).

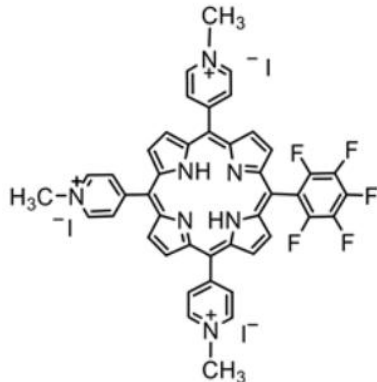
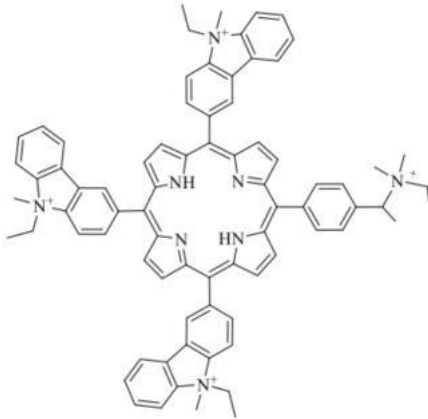
As porfirinas são empregadas na TFD devido à alta absorvidade molar, rendimento quântico do estado tripleto relativamente alto e é facilmente modificável. Normalmente, a ação fotodinâmica acontece pelo mecanismo tipo II. O aumento de cargas positivas também está relacionado ao aumento de atividade biológica em bactérias e, em casos de porfirinas neutras ou aniônicas, a eficácia contra bactérias Gram-negativas é pequena devido à baixa afinidade com a membrana. Além das células bacterianas, as porfirinas também têm afinidade às células de mamíferos (LIU, 2015).

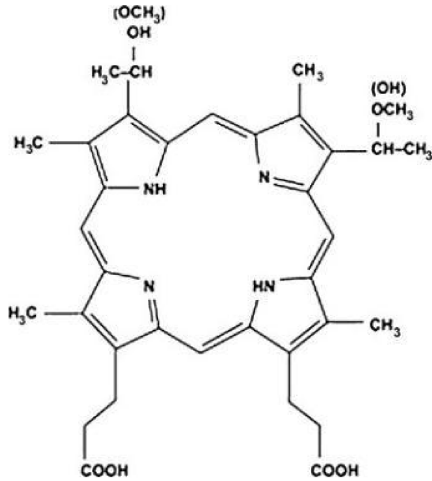
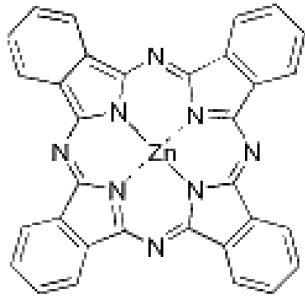
Tabela 1. Classes de FS e alguns exemplos estudados.

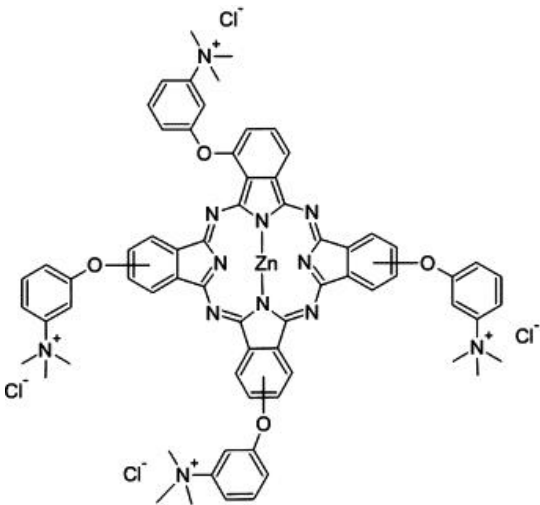
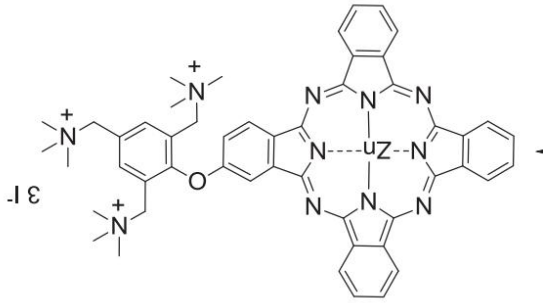
Classe	Carga	Exemplos	Espécie bacteriana testada	Eficácia bactericida, concentração do FS, dose de luz
Fenotiazinas	catiônico	Azul de metileno (<i>methylene blue</i> , MB)	G(+): <i>S. aureus</i>	~ 2 log, 10 µM, 5 J/cm ²
			G(-): <i>E. coli</i>	~ 1 log, 10 µM, 5 J/cm ²
	catiônico	Verde de metileno (<i>methylene green</i> , MG)	G(+): <i>E. faecalis</i>	Sem crescimento bacteriano, 25 µM, 6,3 J/cm ²
			G(-): <i>P. aeruginosa</i>	Sem crescimento bacteriano, 25 µM, 6,3 J/cm ²
	aniônico	Rosa Bengala (RB)	G(+): <i>S. aureus</i> ;	~ 4 log, 0,25 µM, 4 J/cm ²
			G(-): <i>E. coli</i> ,	~ 4 log, 35 µM, 8 J/cm ²

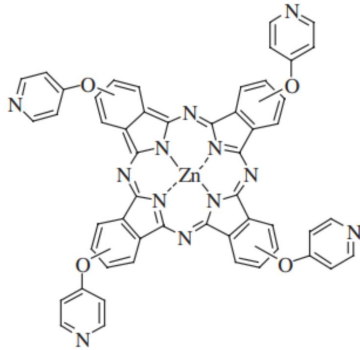
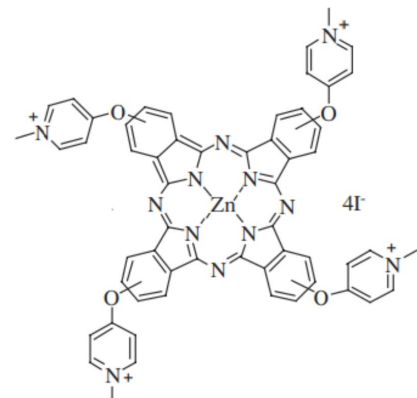
Classe	Carga	Exemplos	Espécie bacteriana testada	Eficácia bactericida, concentração do FS, dose de luz
	catiônico	5-Ethylamino-9-diethyl-aminobenzophenotiazinium chloride (EtNBS)	G(+): <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i>	
				> 6 log, 10 µM, 10 J/cm ²
	catiônico	EtNBS-COOH	G(-): <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	
			G(+): MSSA MRSA	Inibição significativa do crescimento, 2,5 µM, 15 J/cm ²
	catiônico	Novo azul de metileno N (<i>new methylene blue N</i> , NMBN)		
			G(-): <i>A. baumannii</i>	6 log, 10 µM, 22,5 J/cm ²

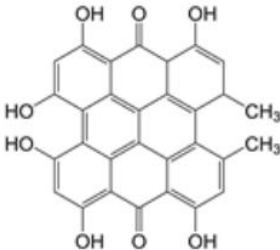
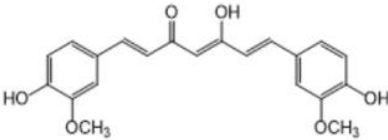
Classe	Carga	Exemplos	Espécie bacteriana testada	Eficácia bactericida, concentração do FS, dose de luz
	catiônico	Azul de dimetileno (<i>dimethylene blue</i> , DMMB)		
			G(-): <i>A. baumannii</i>	6 log, 10 μ M, 15 J/cm ²
	catiônico	Azul de toluidina O (<i>toluidine blue O</i> , TBO)		
			G(+): <i>S. aureus</i>	> 3 log, 10 μ M, 32 J/cm ²
			G(-): <i>E. coli</i>	> 3 log, 35 μ M, 32 J/cm ²
Porfirinas	catiônico	5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl) porphyrin tetra-iodide (tetra-Py ⁺ -Me)		
			G(-): <i>E. coli</i>	0,2 log, 5,0 μ M, 3,6 J/cm ²
			G(+): <i>S. warneri</i>	2,8 log, 0,5 μ M, 3,6 J/cm ²

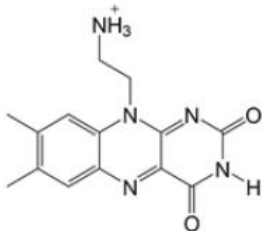
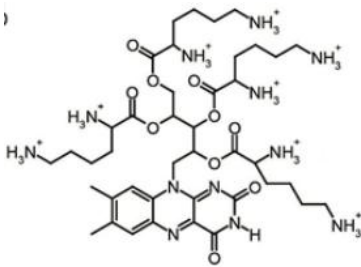
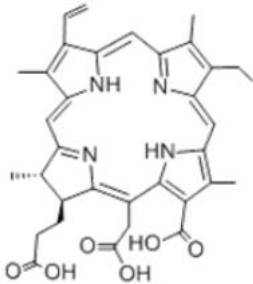
Classe	Carga	Exemplos	Espécie bacteriana testada	Eficácia bactericida, concentração do FS, dose de luz
	catiônico	5,10,15-tris(1-methylpyridinium-4-yl):20-(pentafluorophenyl) porphyrin tri-iodide (tri-Py ⁺ -Me-PF)		
			G(-): <i>E. coli</i>	3,1 log, 5,0 μM, 3,6 J/cm ²
			G(+): <i>S. warneri</i>	5,6 log, 0,5 μM, 3,6 J/cm ²
	tetra catiônico	5,10,15,20-tetrakis[3-(ethylcabazoyl)]porphyrin (TCP)		
			G(+): <i>S. aureus</i> MRSA	2 log, 1 μM, 162 J/cm ²

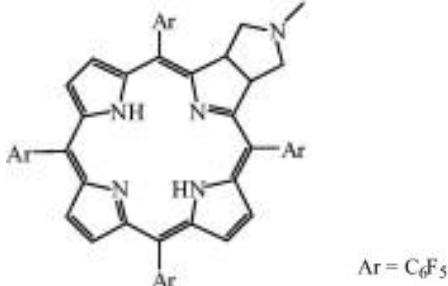
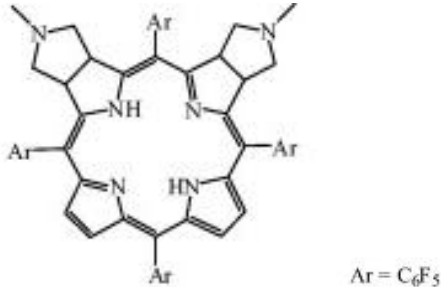
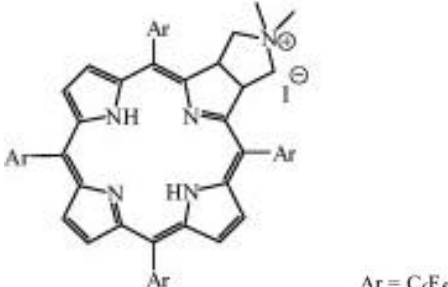
Classe	Carga	Exemplos	Espécie bacteriana testada	Eficácia bactericida, concentração do FS, dose de luz
	aniônico	Hematoporphyrin monomethyl ether (HMME)	G(+): <i>S. aureus</i>	90%, 0,5 µg/mL, 360 J/cm ²
				
Ftalocianinas	neutro	Zinc phthalocyanine (ZnPc)	G(-): <i>A. hydrophila</i>	< 0,5 log, 2,0 mM, 54 J/cm ²
				

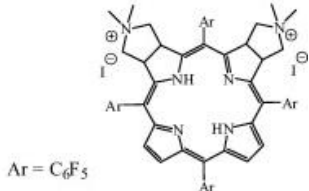
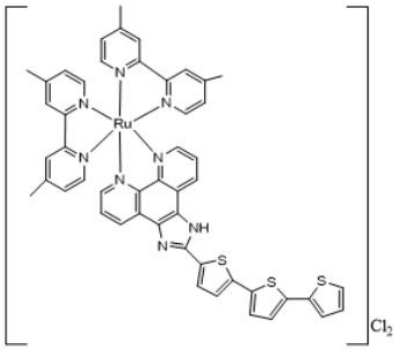
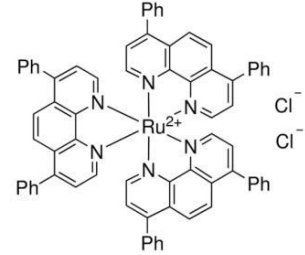
Classe	Carga	Exemplos	Espécie bacteriana testada	Eficácia bactericida, concentração do FS, dose de luz
	tetra catiônico	Zinc (II) phthalocyanine derivative (RLP068/Cl)		
			G(+): MRSA	5~6 log, 64 ng/mL, 30 J/cm ²
			G(-): <i>P. aeruginosa</i>	5~6 log, 26,4 µg/mL, 30 J/cm ²
	catiônico	Zinc (II) phthalocyanine substituted with a triamino moiety and its tri-N-methylated Analogue		
			G(+): MSSA MRSA	~ 4 log, 5 - 13 nM, 48 J/cm ²
			G(-): <i>Aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	~ 4 log, 0,2 - 3,5 µM, 48 J/cm ²

Classe	Carga	Exemplos	Espécie bacteriana testada	Eficácia bactericida, concentração do FS, dose de luz
	neutro	Uncharged zinc (II) pyridyloxyphthalocyanine	G(-): <i>E. coli</i>	0,5 log, 10 μ M, 54 J/cm ²
				
	catiônico	Zinc (II) N-methylpyridyloxy-phthalocyanine		4,5 log, 10 μ M, 54 J/cm ²
				
Fulerenos	catiônico	C ₆₀ Decaiodide Monoadducts	G(+): <i>S. aureus</i> G(-): <i>E. coli</i>	3 log, 1 μ M, 100 J/cm ²
	catiônico	DTC ₆₀ ²⁺ iodide N,N-dimethyl-2-(4'-N,N,N-trimethylaminophenyl)fulleropyrrolidinium	G(-): <i>E. coli</i>	3,5 log, 1 μ M, 162 J/cm ²

Classe	Carga	Exemplos	Espécie bacteriana testada	Eficácia bactericida, concentração do FS, dose de luz
	catiônico	Porphyrin-linked fullerene C ₆₀ dyad derivatives 1 (TCP-C ₆₀) C ₆₀ dyad derivatives 2	G(+): <i>S. aureus</i>	3,2 log, 5 µM, 162 J/cm ²
				4,5 log, 5 µM, 162 J/cm ²
	catiônico	Fullerenyl malonate quaternary ammonium iodide salt C ₇₀	G(-): <i>E. coli</i> G(+): <i>S. aureus</i>	6 log, 10 µM, 10 J/cm ² (UVA), 100 J/cm ² (luz branca)
	catiônico	C ₇₀ [>M(C ₃ N ₆ +C ₃) ₂]	G(-): <i>E. coli</i> , <i>A. baumannii</i>	2 log, 1,0 µM, 100 J/cm ²
Fontes naturais	neutro	Hypericin 	G(+): <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i>	> 6 log, 1 µg/mL, 48 J/cm ²
			G(-): <i>E. coli</i> G(-): <i>P. aeruginosa</i>	0,7 log, 1 µg/mL, 48 J/cm ²
	neutro	(1E-6E)-1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione (curcumin) 	G(+): <i>S. mutans</i>	54%, 0,75~1,5 µg/mL, 5,7 J/cm ²
			G(+): <i>L. acidophilus</i>	91%, 0,7 ~1,5 µg/mL, 5,7 J/cm ²

Classe	Carga	Exemplos	Espécie bacteriana testada	Eficácia bactericida, concentração do FS, dose de luz
	catiônico	Flavin derivative (FLASH-01a)		
			G(+): MRSA	5,1 log, 50 μ M, 1,5 J/cm ²
		Flavin derivative (FLASH-07a)		
			G(-): EHEC <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	6,5 log, 50 μ M, 1,5 J/cm ²
Clorina	neutro	Chlorin e6 (Ce6)		
			G(+): <i>S. aureus</i> G(-): <i>E. coli</i>	5 log, 10 μ g/mL, 15 J/cm ²

Classe	Carga	Exemplos	Espécie bacteriana testada	Eficácia bactericida, concentração do FS, dose de luz
	neutro	Chlorin derivatives1	G(-): <i>E. coli</i>	0,57 log, 5 μ M, 43,2 J/cm ²
				
	catiônico	Cationic chlorin derivatives2		0,77 log, 5 μ M, 43,2 J/cm ²
				
	neutro	Isobacteriochlorin derivatives3		0,24 log, 20 μ M, 43,2 J/cm ²
				

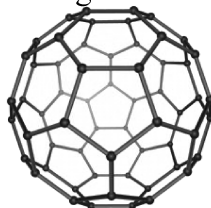
Classe	Carga	Exemplos	Espécie bacteriana testada	Eficácia bactericida, concentração do FS, dose de luz
	catiônico	Cationic isobacteriochlorin derivatives4  Ar = C ₆ F ₅		> 5,0 log, 5 μM, 43,2 J/cm ²
Complexos bipiridínicos de rutênio	catiônico	Ruthenium(II) derivative (TLD1433) 	G(+): <i>S. aureus</i> G(+): MRSA	6,7 log, 12 μM, 58,8 J/cm ² 8,3 log, 12 μM, 58,8 J/cm ²
	dicatiônico	Tris-(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)-ruthenium(II)-dication (RD3) 	G(-): <i>P. gingivalis</i> , <i>F. nucleatum</i>	4 log, 12,5 μM, 7 J/cm ²

Fonte: adaptado de LIU, 2015.

Os FS das ftalocianinas mais estudados estão associados a ftalocianina de Zn (II), que geram predominantemente $^1\text{O}_2$, assim como as porfirinas; não apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas sem agentes que perturbam a estabilidade da membrana, tal como o EDTA, ou agentes que facilitam a entrada do FS. Por outro lado, todas as ftalocianinas catiônicas modificadas com um grupo amino, apresentam maior afinidade a membrana da *E. coli* (LIU, 2015).

Os fulerenos (Figura 5) em estado excitado podem reagir com doadores de elétrons para formar radicais aniônicos tais como C_{60}^- , C_{70}^- , e gerar EROs na presença de O_2 . Devido à alta lipofilicidade e natureza neutra, têm pouca interação com a membrana das bactérias; para que apresente atividade, é necessária a modificação com moléculas anfifílicas (LIU, 2015).

Figura 5. Estrutura geral do fulereno.



Fonte: <<https://en.wikipedia.org/wiki/Fullerene>.> Acesso em: 22/12/2022.

De origem natural, os FSs mais estudados são a hipericina, composto vermelho de antraquinona, que a partir da excitação possui atividade antitumoral, antiviral e antibacteriana a partir do mecanismo tipo II; e a curcumina, um composto polifenólico que tem afinidade à várias biomoléculas tais como fosfolipídeos, proteínas e ácido nucleicos e possui maior atividade contra bactérias Gram-positivas (LIU, 2015).

1.7 SISTEMAS DE IRRADIAÇÃO MAIS UTILIZADOS

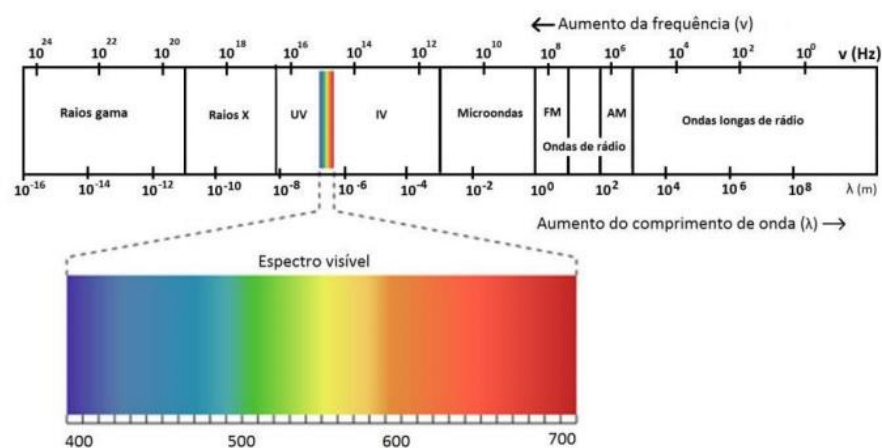
A TFD pode ser performada com diferentes tipos de luz: laser, lâmpadas e LEDs. Lasers (de corante ou de diodo) são amplamente utilizados na Terapia Fotodinâmica superficial e intersticial e apresentam a largura de banda estreita, se tratando de uma luz monocromática. Podem ser acoplados a fibras ópticas para aplicação endoscópica e intersticial, ou a lentes a fim de expandir a radiação por uma área maior, com aplicação para lesões superficiais. As lâmpadas fluorescentes, incandescentes, de halogênio, de arco de

xenônio ou de sódio podem utilizadas na TFD, acopladas a fibras ópticas a fim de selecionar um comprimento de onda específico e eliminar comprimentos no ultravioleta e infravermelho; devido ao espalhamento da luz, a aplicabilidade é maior para lesões superficiais. Os LEDs, por outro lado, são normalmente mais utilizados devido ao baixo custo e menor largura de banda em comparação às lâmpadas comuns. Em comparação ao laser de diodo, os LEDs apresentam largura de banda 5% maior em relação ao comprimento de onda central, o que diminui a sua eficiência de absorção pelo FS; pode ser aplicado para TFD superficial e intersticial (LIU, 2015; KIM, 2020).

É importante enfatizar que para TFD deve-se utilizar fontes de irradiação na região do visível ou infravermelho próximo (Figura 6), pois a região do UV (maior energia que no visível) pode causar danos no DNA, possibilitando mutações genéticas malignas; e a região do infravermelho distante e/ou micro-ondas (menor energia que no visível) não possui energia suficiente para promover o FS para o estado excitado. Além disso, tem-se que a absorção de luz pelo tecido diminui à medida que o comprimento de onda diminui, assim, a luz vermelha é a mais eficiente na TFD (Figura 7).

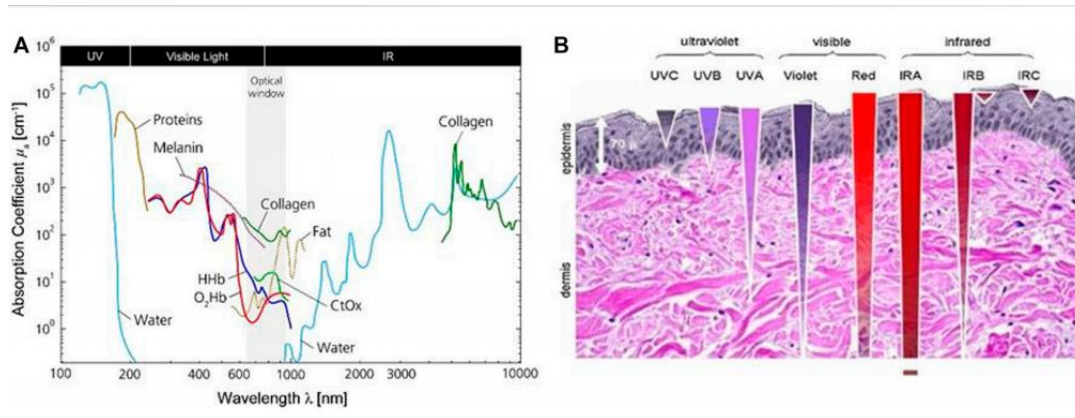
Tecidos são compostos por uma variedade de células e compostos, na qual a interação e absorção da luz depende das características desses tecidos. Cromóforos endógenos, tais como a hemoglobina e melanina, absorvem luz abaixo de 650 nm, o que torna a absorção da luz azul menos profunda. Acima de 950 nm, a luz é absorvida por moléculas de água e comprimentos acima de 1000 nm penetram tecidos com menor eficiência. Assim, a permeabilidade maior no tecido ocorre entre 600 e 950 nm, que é a janela fototerapêutica (REZENDE, 2022).

Figura 6. Representação do espectro de comprimentos de onda.



Fonte: OLIVEIRA, 2015.

Figura 7. (A) Espectro de absorção de diferentes cromóforos endógenos, presentes nos tecidos biológicos. **(B)** Esquema da propagação de luz através do tecido.



Fonte: REZENDE, 2022.

Muitos fatores influenciam na eficiência da TFD: comprimento de onda, dose de luz e intervalo entre a aplicação do fármaco e irradiação. Em infecções mais superficiais, esses fatores não influenciam tanto quanto em áreas infectadas mais profundas (LIU, 2015; CORREIA, 2021).

1.8 FSs ASSOCIADOS À INIBIDORES DE BOMBAS DE EFLUXO, TENDO COMO ALVO MECANISMOS DE RESISTÊNCIA MICROBIANA POR EFLUXO

Como mencionado anteriormente, a resistência a múltiplas drogas geralmente surge devido a sistemas de efluxo transmembrana, que servem para bombear compostos nocivos das células microbianas (ALEKSHUN, 2007). Uma ampla gama de substratos, como detergentes, antibióticos, metabólitos, corantes e toxinas são expelidos através de bombas de efluxo (MARQUEZ, 2005). Tem sido demonstrado que essas bombas de efluxo minimizam a morte de células bacterianas durante TFDA com FS, aparentemente diminuindo as concentrações intracelulares de FS e EROs (intracelulares) associadas (VERA, 2012; KOURTESI, 2013; REZAI, 2018; HAMBLIN, 2020).

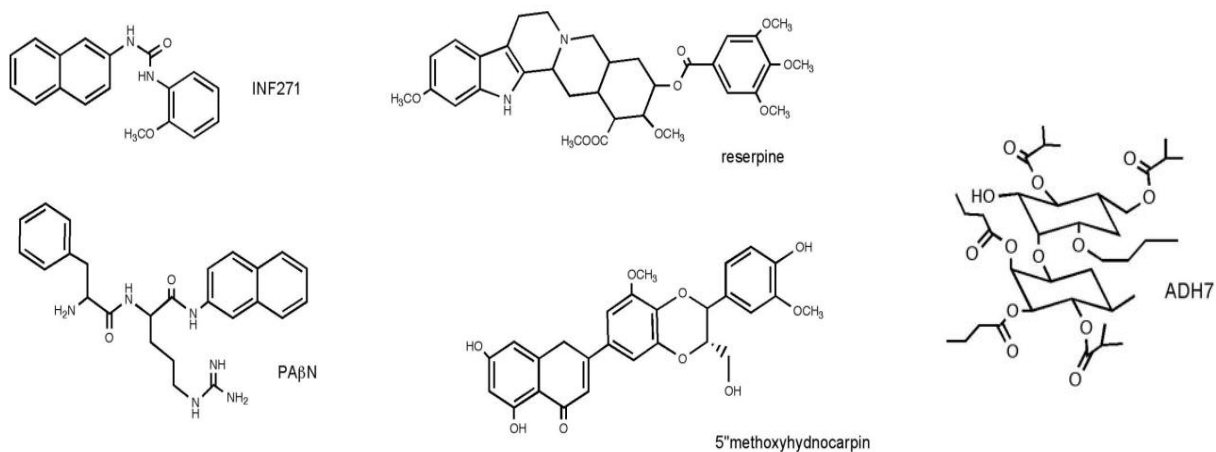
Tegos *et al* 2006, a partir do conhecimento de que moléculas catiônicas anfipáticas são substratos naturais de bactérias MDR devido à semelhança físico-química ao alcalóide antibacteriano berberina, que se trata de substrato do sistema de efluxo MFS previamente caracterizado (VERA, 2012), realizou testes comparativos entre compostos fenotiazínicos (azul de metileno, azul de toluidina, azul de dimetileno) e outros, tais como rosa bengala e um

derivado de clorina (“*poly-L-lysine-chlorine₆*”) em bactérias como *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, onde a expressão de bombas de efluxo foi controlada. Observou-se que a superexpressão das bombas de efluxo, especialmente a NorA, aumentou a taxa de sobrevivência das bactérias expostas aos compostos fenotiazínicos. Entre as espécies de bactérias, a *P. aeruginosa* requereu maior concentração de FS para a sua inativação, seguida da *E. coli*, em comparação à *S. aureus*. A partir desse estudo, foi possível perceber que bombas de efluxo (de tipos RND e MFS) das diferentes bactérias tem como substrato os compostos catiônicos da classe de fenotiazina, e a sua superexpressão é capaz de diminuir a eficácia de alguns FSs; para as outras classes de FSs, houve pouca variação da taxa de sobrevivência a partir da modulação das bombas de efluxo (TEGOS, 2006). Assim, a associação entre inibidores de bombas de efluxo e FSs de fenotiazina tornou-se uma opção para aumentar a fotoatividade em bactérias resistentes (TEGOS, 2006).

No estudo de 2008 do mesmo autor, foi testado na bomba NorA (família MFS) da *S. Aureus*, *AcrAB-TolC* (família RND) da *E. coli* e *MexAB-OprM* (família RND) da *P. aeruginosa* os inibidores INF271, um derivado de difenilureia, Reserpina, um alcalóide encontrado em plantas do gênero *Rauwolfia*, INF-55, um indol, 5-methoxyhydnocarpin (5-MHC) (Figura 8), entre outros, em conjunto com alguns FSs (Figura 9). Neste estudo as moléculas inibidoras de bomba de efluxo (Figura 8) foram incubadas de três formas: em conjunto, antes e logo após a administração do FS (Figura 10), de modo que a associação entre inibidores de bombas de efluxo e FS foi realizada por efeito sinérgico (TEGOS, 2008).

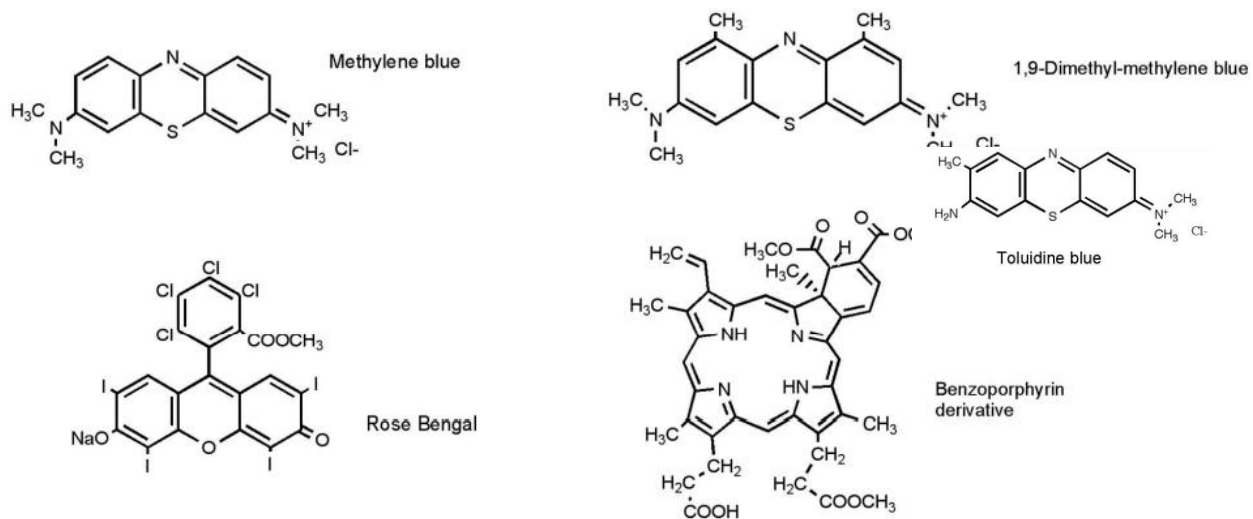
No geral, o uso dos inibidores aumentou a inativação fotodinâmica antimicrobiana para os compostos fenotiazínicos. Entre as espécies de bactérias testadas, a mais afetada com a inibição foi a *S. aureus*, o que confirma que a NorA tem maior especificidade aos compostos de fenotiazina em comparação a RND das bactérias Gram-negativas, em específico a *P. aeruginosa*. Por fim, foi observada que a resposta biológica foi mais eficiente quando foi adicionado o FS após o inibidor do que simultaneamente, o que mostra uma possível competição nos receptores da bomba entre fotossensibilizador e inibidor, onde a incorporação do FS se tornou mais acentuada após a administração do inibidor de bomba de efluxo (TEGOS, 2008).

Figura 8. Alguns inibidores de bombas de efluxo utilizadas no estudo de Tegos, 2008.



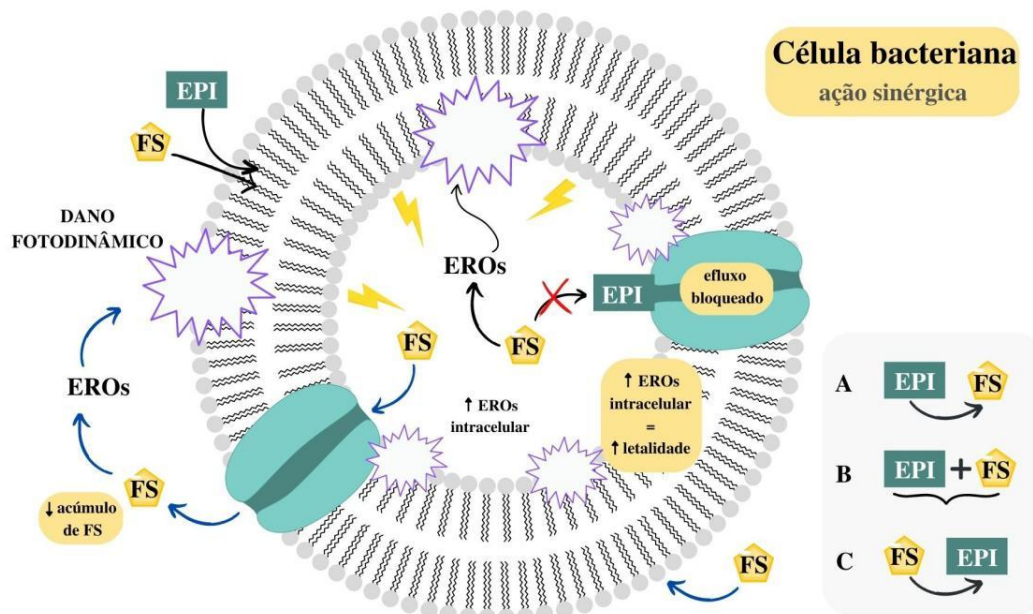
Fonte: TEGOS, 2008.

Figura 9. FSs utilizados no estudo de Tegos, 2008.



Fonte: TEGOS, 2008.

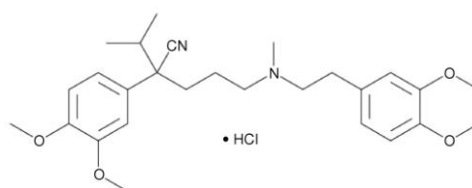
Figura 10. Esquema representativo da TFDA a partir da ação sinérgica entre FS (fotossensibilizador) e EPI (inibidor de bomba de efluxo, do inglês “*efflux pump inhibitor*”), com administração do FS após o EPI (A), em conjunto ao EPI (B) e do FS anterior ao EPI (C).



Fonte: Figura criada pela autora utilizando o site Canva.

Outro exemplo de associação entre inibidores de bombas de efluxo e FS realizada por efeito sinérgico foi descrito no estudo de 2010 de Kishen, que testou ação do Azul de Metileno catiônico e Rosa Bengala aniônico em conjunto ao inibidor cloridrato de Verapamil (inibidor de bombas de efluxo da superfamília ABC) (Figura 11) da bomba de efluxo da *Enterococcus faecalis*, visando a inativação de biofilme. Foi observado que o uso do inibidor consideravelmente o efeito do FS, uma vez que bombas de efluxo são mais expressas em células envoltas em biofilme; além disso, o composto azul de metileno catiônico causou mais danos ao biofilme, devido à maior interação com a membrana aniônica da bactéria (KISHEN, 2010).

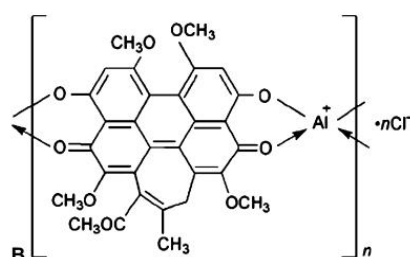
Figura 11. Estrutura do Cloridrato de Verapamil.



Fonte: <<https://www.cellsignal.com/products/activators-inhibitors/verapamil-hydrochloride/49079>>

Hashimoto *et al* 2012 realizou estudos com os fotossensibilizadores “*Hypocrellin B*” com íons de lantanídeo (HB:La³⁺) (Figura 12) e o Azul de metileno em uma linhagem multirresistente (MDR) da bactéria da espécie *P. aeruginosa*, associados ao inibidor de canais de cálcio, Verapamil. A partir dos resultados, observou-se uma redução em torno de 5 logs, após uma dose de luz de 24 J/cm², nos grupos incubados com HB:La³⁺ com e sem o inibidor, o que indica que o FS não se trata de um substrato da bomba de efluxo da *P. aeruginosa*. Por outro lado, o Azul de metileno apresentou variações estatísticas significativas quando incubado com o inibidor de bomba de efluxo, apresentando um aumento de morte celular em torno de 1 log (HASHIMOTO, *et al.*, 2012).

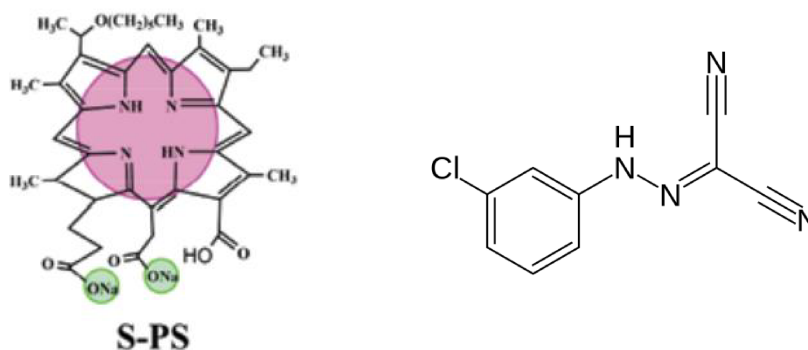
Figura 12. Estrutura do FS HB:La³⁺.



Fonte: HASHIMOTO, *et al.*, 2012.

Jia *et al* 2019 avaliou a inativação bacteriana da *S. aureus* MDR e selvagem a partir do FS “*S-Porphin sodium*” (S-PS) (Figura 13) e os inibidores de bomba de efluxo Reserpina (Figura 8) e “*carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazine*” (CCCP) (Figura 13). No geral, a TFDA com S-PS resultou na destruição da membrana celular *via* EROs, o que diminuiu significativamente a proliferação da bactéria, onde a linhagem selvagem apresentou maior sensibilidade devido à menor quantidade de bombas de efluxo expressas em comparação à MDR, o que influenciou na maior incorporação do FS. Na linhagem MDR, a fotoatividade foi melhorada a partir da adição de inibidores de bombas de efluxo CCCP e Reserpina anteriormente à aplicação do FS, porém, não foi possível a total destruição do biofilme nas mesmas concentrações (JIA, *et al.*, 2019).

Figura 13. Estruturas do FS S-PS e inibidor CCCP utilizados no estudo Jia *et al* 2019.



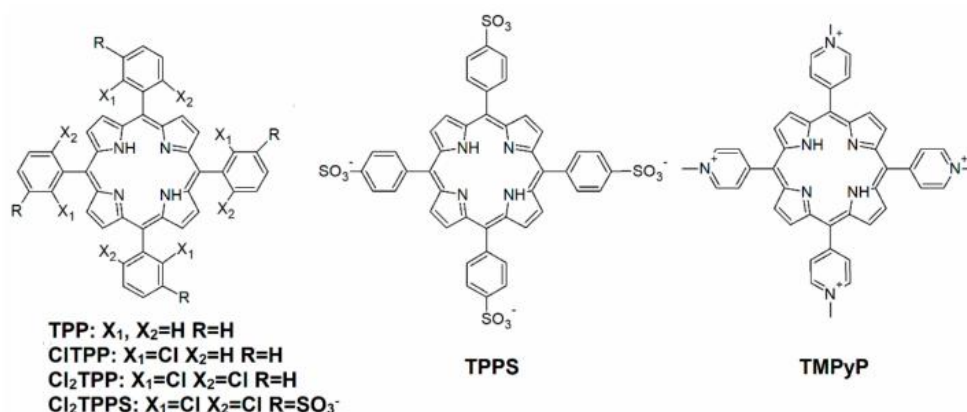
Fonte: WANG, *et al.*, 2018;

<https://en.wikipedia.org/wiki/Carbonyl_cyanide_m-chlorophenyl_hydrazone>. Acesso em: 16/01/2022

Em Sulek *et al* 2020 foi estudada a inativação fotodinâmica de bactérias das espécies *E. coli* e *S. aureus* utilizando derivados de porfirina (Figura 14) como FS e Verapamil como inibidor de bomba de efluxo, com a finalidade de aumentar o acúmulo de FS no interior das células. O inibidor Verapamil promoveu uma melhora no efeito fotodinâmico de 1-2 logs contra a *E. coli* em conjunto com TMPyP, TPPS e Cl₂TPPS. Esse efeito sugere que o efeito fotodinâmico é mediado a partir dos FSs ligados à membrana externa e membrana celular interna por meio de interações eletrostáticas entre a superfície aniônica da parede celular da *E. coli* e o TMPyP positivamente carregado (SULEK, *et al.*, 2020).

Para bactérias Gram-positivas, os derivados de ácido sulfônico aniônicos (TPPS e Cl₂TPPS) apresentaram um acúmulo eficiente nas células em comparação a TMPyP, que por ser catiônico, interagiu melhor com a membrana da bactéria Gram-negativa. Na *E. coli*, o inibidor Verapamil acrescentou em 3 logs o número de mortes celulares; na *S. aureus*, foi atingida a redução em torno de 6 logs de células viáveis. De modo geral, com a introdução do inibidor de bomba de efluxo, menores doses de luz foram necessárias para causar a inativação (SULEK, *et al.*, 2020).

Figura 14. Estruturas dos derivados de porfirina TPP, ClTPP, Cl₂TPP, Cl₂TPPS, TPPS e TMPyP.



Fonte: SULEK, *et al.*, 2020.

A partir dos estudos de associação sinérgica entre inibidores de bombas de efluxo e vários fotossensibilizadores, pode-se afirmar que existe um aumento significativo na atividade fotodinâmica em bactérias MDR ao utilizar o inibidor de bomba de efluxo adequado para a bomba de efluxo de cada bactéria. Por outro lado, em bactérias que não há bombas de efluxo superexpressas, FSs anfipáticos como os compostos fenotiazínicos são substratos naturais das bombas da família MFS presentes em bactérias Gram-positivas, como a NorA da *S. aureus*.

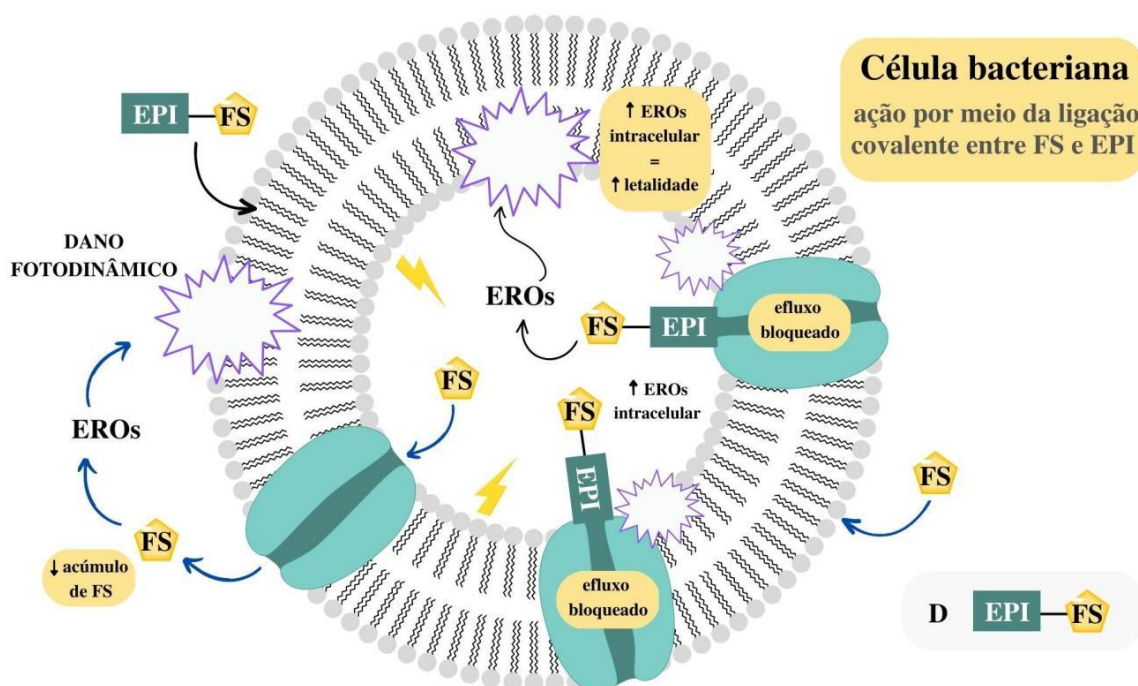
Em bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*, há evidências de que o efluxo de porfirinas é controlado pelo sistema de bomba *ToIC*, o que justifica a melhora da atividade fotodinâmica no estudo de Sulek *et al* 2020. Apesar da falta de estudos acerca dos mecanismos de efluxo para cada fotossensibilizador em células bacterianas, nota-se que a TFDA associada a um inibidor de bomba de efluxo é um método promissor para bactérias multirresistentes.

Até então, os estudos testavam a atuação sinérgica de inibidores e FS, entretanto, poucos estudos têm mostrado que FSs ligados covalentemente ao EPI podem aumentar os efeitos fotodinâmicos. Em Ball *et al* 2006, híbridos de berberina com inibidores de bombas de efluxo da *S. aureus* foram sintetizados, onde a atividade antibacteriana teve expressivo aumento em relação à berberina pura, devido ao rápido acúmulo do híbrido nas células bacterianas (VERA, 2012).

As similaridades físico-químicas entre a berberina e os compostos fenotiazínicos e o fato de ambos serem substratos de bombas de efluxo de bactérias Gram-positivas possibilitou uma estratégia análoga a TFDA, onde híbridos contendo um fragmento inibidor de bomba de efluxo permite maior acúmulo do FS dentro da célula (Figura 15). Um exemplo é o estudo de

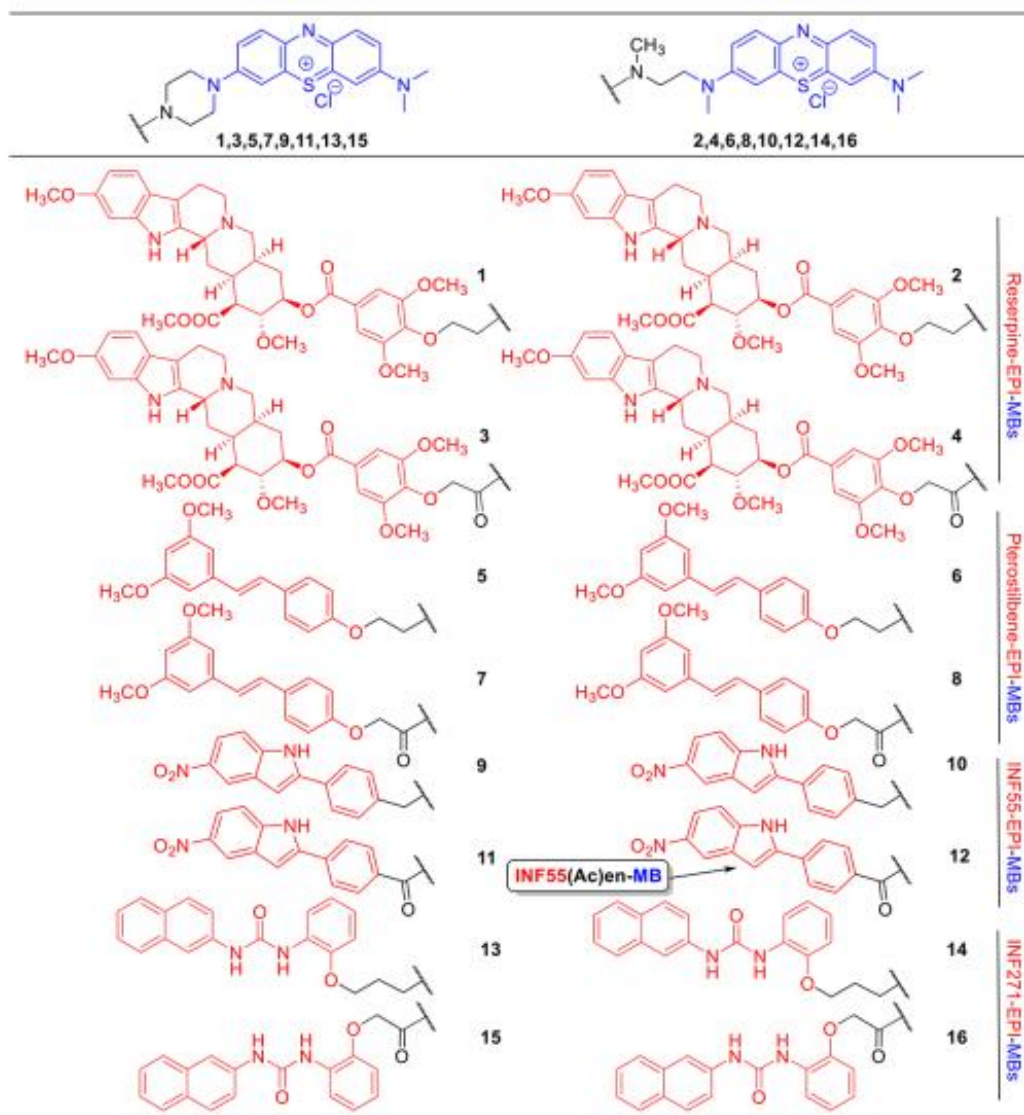
2017 de Rineh *et al*, em que foram feitas modificações em FSs com fragmentos inibidores da NorA. Foram sintetizados 16 híbridos (Figura 16) com diferentes inibidores para avaliar a inativação fotodinâmica antimicrobiana da *S. aureus*. Dentre os híbridos estudados, dois compostos (Figura 17) exibiram atividade máxima em testes *in vitro* contra MRSA (RINEH, 2017).

Figura 15. Esquema representativo da TFDA a partir da ligação covalente entre FS (fotossensibilizador) e EPI (inibidor de bomba de efluxo, do inglês “*efflux pump inhibitor*”).



Fonte: Figura criada pela autora utilizando o site Canva.

Figura 16. Híbridos de Azul de Metileno e diferentes inibidores da bomba de efluxo NorA sintetizados em Rineh, 2017.



Fonte: RINEH, 2017.

Figura 17. Híbridos em Rineh, 2017 que apresentaram maior atividade contra MRSA.



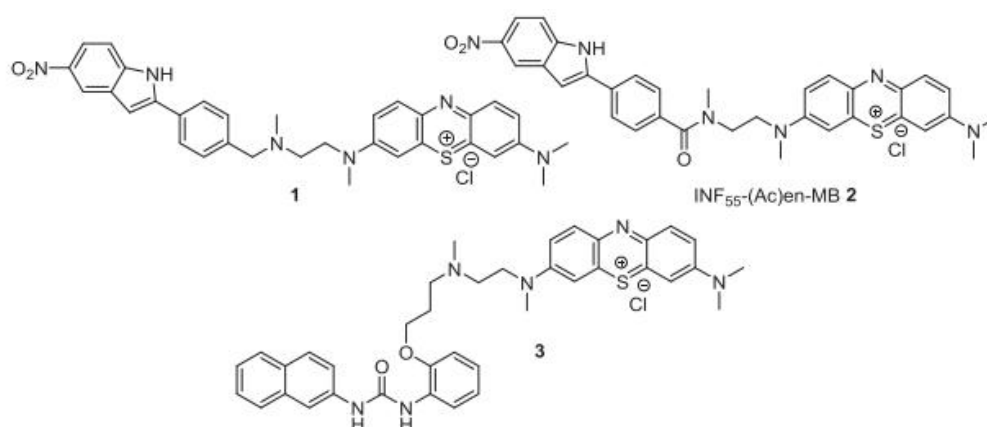
Fonte: ALMATAR, 2021.

No estudo Rineh 2018, os híbridos com maior atividade fotodinâmica do estudo de 2017 (Figura 17) foram testados, juntamente com um terceiro híbrido **3** da Figura 18, em

bactérias Gram-negativas *E. coli* e *A. baumannii*. Assim como o híbrido **2** com o inibidor INF55 (Figura 16) apresentou a maior atividade contra a *S. aureus* em relação ao Azul de metileno, o mesmo ocorreu na *E. coli*, possivelmente por não ser um substrato da bactéria ou por efeito inibitório da bomba de efluxo a partir do INF55, o que aumenta a concentração do FS no interior da célula (RINEH, 2018).

Para a *A. baumannii*, o maior efeito fotodinâmico foi apresentado pelo híbrido **1**, por se tratar de um substrato com menos afinidade ou por efeito inibitório da bomba de efluxo; outra possibilidade é a maior afinidade da molécula pela parede celular da bactéria, o que resulta na maior concentração de FS localizado na célula. Por fim, observou-se que inibidores de bomba de efluxo da NorA covalentemente ligados a um FS podem aumentar a eficácia da TFDA para bactérias Gram-negativas, que são mais resistentes que Gram-positivas.

Figura 18. Híbridos em Rineh, 2018 testados em:



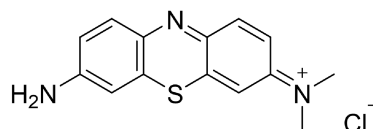
Fonte: RINEH, 2018.

1.9 PLANEJAMENTO DE UM COMPOSTO HÍBRIDO DERIVADO DE AZURE A E CAPSAICINA

O derivado de fenotiazina planejado para a rota sintética parte do FS Azure A (Figura 19), cujo centro de reatividade se localiza na amina primária, o que permite boa reatividade quimiosseletividade em comparação a outros compostos de fenotiazina (Azure B, Azul de Metileno, Azul de Toluidina).

Azure A é um derivado fenotiazínico catiônico, de alta polaridade e baixa tendência à agregação, o que o torna um FS promissor para aplicação na TFDA em bactérias e fungos, cuja atividade biológica se mostrou efetiva contra *Candida albicans* (MOREIRA, *et al*, 2010).

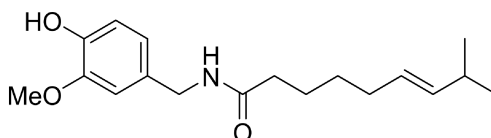
Figura 19. Estrutura do Azure A.



Fonte: do autor.

A Capsaicina (Figura 20) é uma molécula de ocorrência natural, encontrada na pimenta Chili, do gênero *Capsicum*. Foi testada sua eficácia em conjunto com Ciprofloxacino, onde pôde ser observada o aumento a atividade antimicrobiana, além do aumento da janela terapêutica por cerca de 1,1h, o que ocorreu em fator da inibição das bombas de efluxo de bactérias; o que foi demonstrado a partir da inibição do efluxo de brometo de etídeo pela NorA, o que reduziu a virulência da *S. aureus* (NAAZ, 2021).

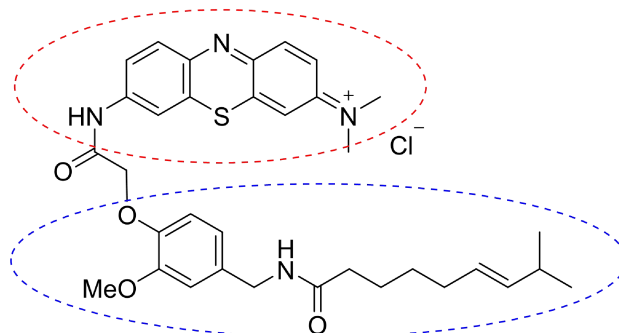
Figura 20. Estrutura da Capsaicina.



Fonte: do autor.

Tendo em vista que a TFD tem mais aplicação a tecidos superficiais, uma vez que a penetrabilidade da radiação nos tecidos é limitada (REZENDE, 2022), o composto alvo (Figura 21) a ser sintetizado foi baseado nos estudos acerca da atividade inibitória da Capsaicina e na inativação fotodinâmica antimicrobiana por meio de compostos de fenotiazina, que são substratos da bomba de efluxo NorA, presente na *S. aureus*, um dos principais microrganismos causadores de infecções em tecidos superficiais.

Figura 21. Estrutura da molécula alvo constituída de Azure A (vermelho), que representa um FS, ligada covalentemente à Capsaicina (azul), que é um inibidor de bomba de efluxo (NorA) da *S. aureus*, por um conector com um grupo carbonílico.



Fonte: do autor.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Funcionalizar Azure A (FS) com fragmento de inibidor de efluxo NorA (capsaicin) para aplicação em bactéria resistente à antibióticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Revisar os principais estudos de FS com ação antibacteriana e inibitória em relação a bombas de efluxo;
- ii) Planejar e sintetizar um FS com ação inibitória da bomba de efluxo NorA;
- iii) Estudar a rota sintética do FS partindo de estruturas químicas simplificadas, a fim de produzir um composto modelo.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 SÍNTESE DO COMPOSTO MODELO

3.1.1 Amidação seguida por substituição nucleofílica

3.1.1.1 Amidação da *p*-nitroanilina com HOBt e EDC

Foram adicionados 0,724 mmol (2 equivalentes) do ácido 2-bromoacético e 0,362 mmol da *p*-nitroanilina no meio reacional, contendo 1 mL de DMF. Foram utilizados 0,724 mmol (2 equivalentes) de EDC e 0,0362 mmol de HOBt catalítico. A reação foi deixada em agitação à temperatura ambiente por 4 dias. Após isso, a reação foi colocada à 85°C por 24h e à 120°C por mais 24h. A reação foi interrompida com a adição de água gelada, onde o precipitado formado foi submetido à filtração e seco sob vácuo.

3.1.1.2 Amidação da *p*-nitroanilina via formação de cloreto de ácido

Foram acrescentados 1,09 mmol do ácido 2-bromoacético e DMF catalítico em 0,5 mL de tolueno anidro sob atmosfera de Argônio. Em banho de gelo e agitação, foi adicionado 2,71 mmol (2,5 equivalentes) de cloreto de oxalila. Após isso, o banho de gelo foi retirado e a reação permaneceu à temperatura ambiente por 4h.

Posteriormente, o tolueno presente foi removido sob vácuo, e o cloreto de ácido produzido ($\approx$ 3 equivalentes) adicionado a 0,362 mmol de *p*-nitroanilina, juntamente com 0,362 mmol de trietilamina anidra (1 equivalente), 2 mL de tolueno, em banho de gelo e agitação, sob atmosfera de Argônio. O banho de gelo foi retirado e o meio reacional foi deixado em agitação por 48h. A reação foi interrompida com adição de água gelada e extraída com acetato de etila (3 x 5 mL).

3.2.1 Eterificação seguida por amidação

3.2.1.1 Substituição Nucleofílica

Adicionou-se 1,61 mmol (1 equivalente) de 2-metóxfenol, 1,61 mmol de bromoacetato de etila e 1,61 mmol de Na_2CO_3 , em 1 mL de DMF. A reação foi mantida a 80°C em agitação, por 4h. A reação foi interrompida com adição de água gelada e extraída com acetato de etila (3 x 5 mL).

3.2.1.2 Hidrólise do intermediário **B**

O produto da reação da Substituição Nucleofílica do bromo (1,16 mmol) foi adicionado, juntamente com 15 equivalentes de NaOH 2M (17,4 mmol), a 1 mL de metanol, sob agitação, à temperatura ambiente. Após 4h, o metanol foi removido e foi adicionado, gota a gota, HCl 2M em excesso até a precipitação de todo produto, que foi filtrado e seco sob vácuo.

Além disso, foi feita uma extração da solução da reação com acetato de etila (3 x 5 mL), onde o acetato também foi removido.

3.2.1.3 Amidação com AZURE A

3.2.1.3.1 Amidação com Azure A via EDC e HOBt

Foram adicionados 0,103 mmol (1 equivalente) do ácido (2-metóxfenoxi) acético e 0,103 mmol do Azure A no meio reacional, contendo 0,5 mL de DMF. Foram utilizados 0,154 mmol (1,5 equivalentes) de EDC e 0,010 mmol de HOBt catalítico. A reação foi deixada em agitação à temperatura ambiente por 24h dias; após isso a reação foi interrompida com a adição de água gelada e extraída com DCM sucessivas vezes e com acetato de etila (3 x 8 mL).

3.2.1.3.2 Amidação via cloreto de ácido

Foram acrescentados 0,384 mmol do ácido (2-metóxfenoxi) acético e DMF catalítico em 5 mL de tolueno anidro sob atmosfera de Argônio. Em banho de gelo e agitação, foi adicionado 3,84 mmol (10 equivalentes) de cloreto de oxalila. Após isso, o banho de gelo foi retirado e a reação permaneceu à temperatura ambiente por 4h.

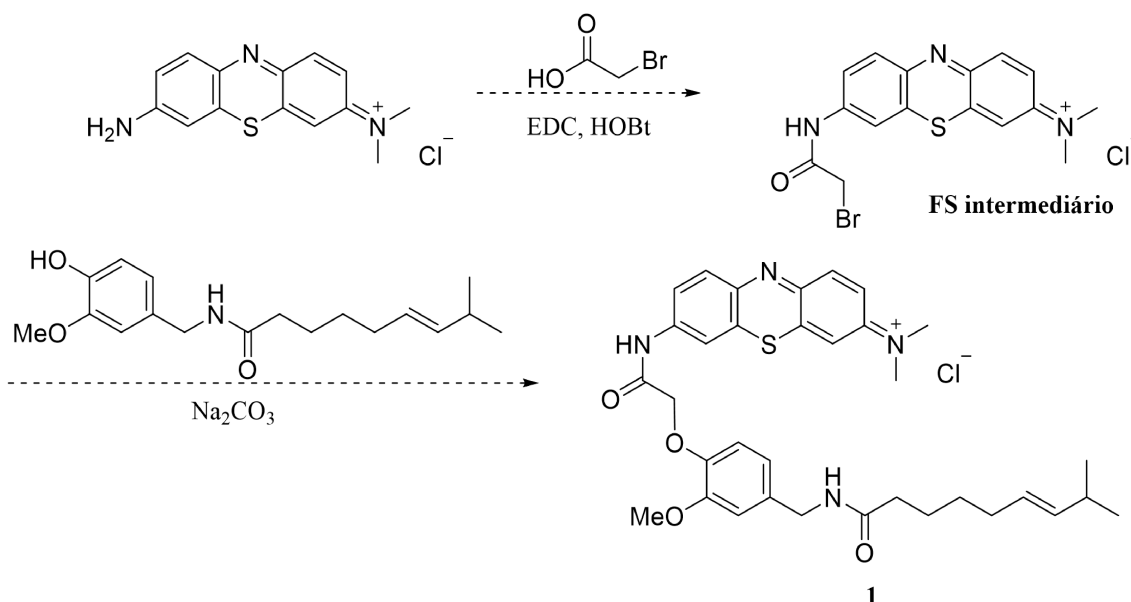
Posteriormente, o tolueno presente foi removido, e o cloreto de ácido produzido (≈ 2 equivalentes) adicionado a 0,194 mmol de Azure A, juntamente com 1,92 mmol de trietilamina anidra (5 equivalentes), em 5 mL de DMF, banho de gelo e agitação, sob atmosfera de Argônio. O banho de gelo foi retirado e o meio reacional foi deixado em agitação por 24h à temperatura ambiente e, posteriormente, à 90°C por 48h. Por fim, a reação foi colocada sob vácuo até completa remoção do DMF.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PLANEJAMENTO DE SÍNTESE DO COMPOSTO HÍBRIDO DE AZURE A E CAPSAICINA

Inicialmente, o planejamento de síntese foi baseado na amidação do FS (azure A) a partir do ácido 2-bromoacético, e a posterior reação de substituição nucleofílica com a capsaicina, resultando num éter, presente na molécula alvo (composto 1, esquema 1).

Esquema 1. Proposta de síntese para o derivado de Azure A com fragmento de Capsaicina.

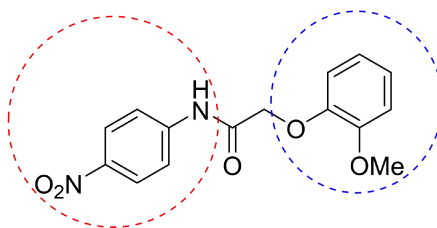


Fonte: do autor.

4.2 INVESTIGAÇÃO DA ROTA SINTÉTICA EM ESTRUTURAS QUÍMICAS SIMPLIFICADAS

Para avaliar a proposta sintética do esquema 1 e o perfil de reatividade de um composto altamente conjugado e com presença de grupo retirador, como o Azure A, foi planejado uma síntese utilizando de compostos estruturalmente mais simples: a *p*-nitroanilina, que possui um grupo nitro retirador de elétrons, simulando o efeito do íon imínio no FS. O 2-metóxfenol, nesse caso, simula a reatividade de um fragmento da Capsaicina (Figura 22).

Figura 22. Composto modelo **2**, baseado na similaridade de reatividade com o FS derivado, onde a p-nitroanilina (vermelho) mimetiza o Azure A, e o 2-metóxfenol (azul) a capsaicina.



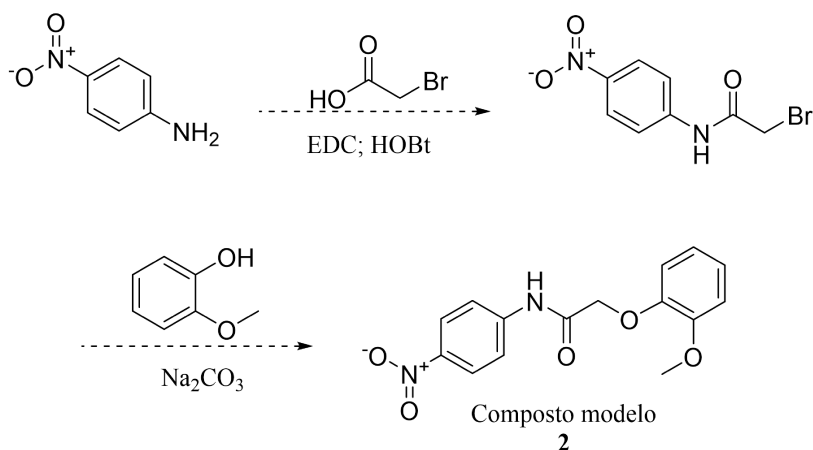
Fonte: do autor.

4.3 SÍNTESE DO COMPOSTO MODELO

4.3.1 Amidação seguida por substituição nucleofílica

Primeiramente, a rota sintética planejada se baseou na reatividade da anilina para formação de uma amida ao reagir com o ácido 2-bromoacético na presença de agentes de condensação (EDC e HOBt), para posterior reação de substituição nucleofílica do brometo de alquila intermediário com o 2-metóxfenol (Esquema 2).

Esquema 2. Esquema de síntese proposto para o composto modelo **2**.

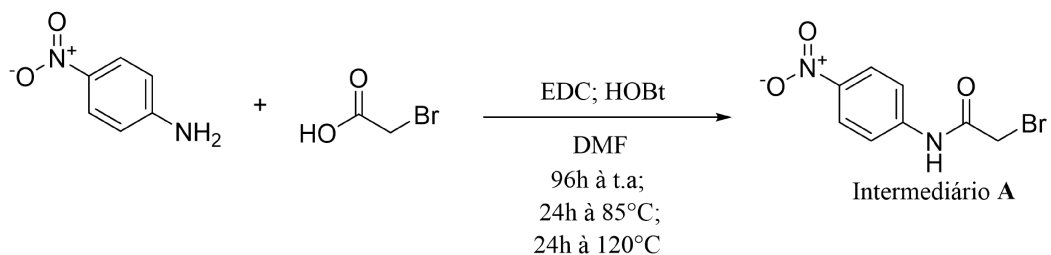


Fonte: do autor.

4.3.1.1 Amidação com HOBt e EDC

A primeira reação de amidação foi feita na presença do agente de condensação EDC e HOBt como catalizador em DMF como solvente (Esquema 3).

Esquema 3. Rota de síntese para obtenção do intermediário A com EDC e HOBt.

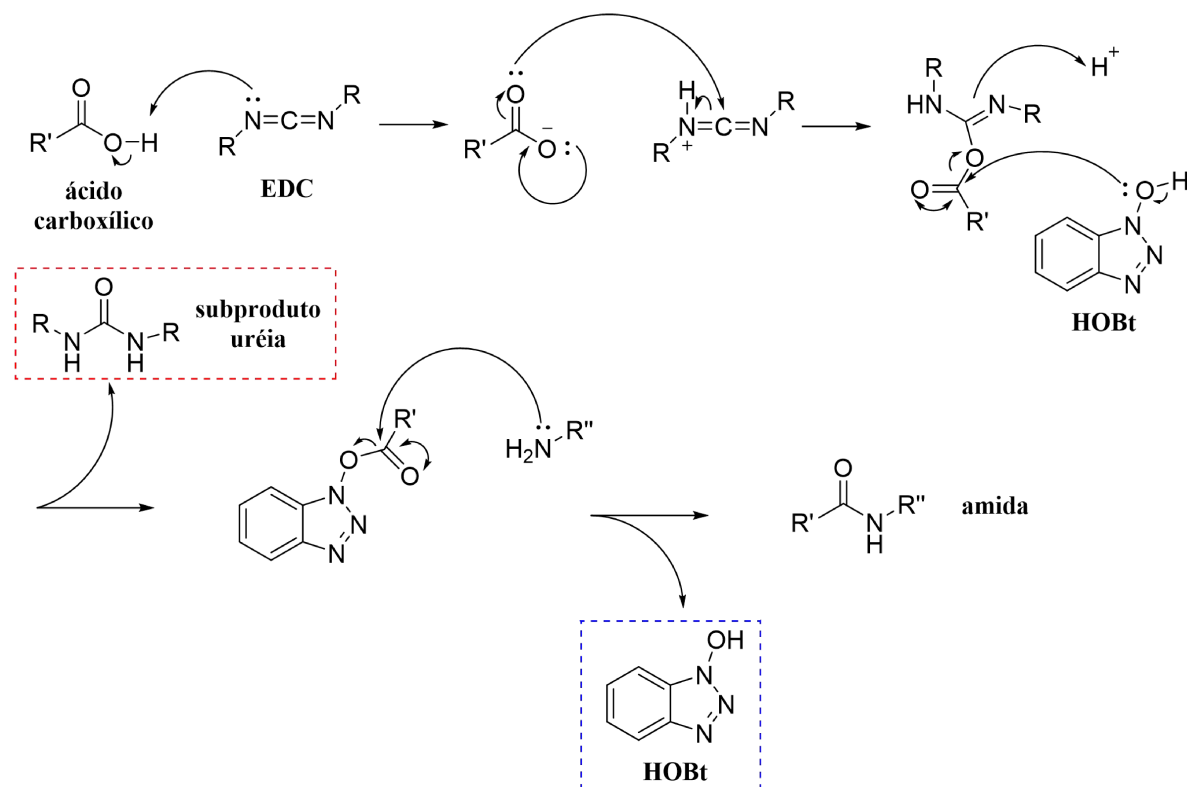


Fonte: do autor.

O mecanismo se inicia com uma reação ácido-base, onde um par de elétrons do nitrogênio do grupo carbodiimida captura o próton do ácido carboxílico utilizado como reagente, seguida do ataque nucleofílico do grupo carboxilato no carbono sp central da carbodiimida. Após a adição, a dupla ligação do nitrogênio captura um próton (do HOBt) por adição eletrofílica e, também, o grupo hidroxila do HOBt ataca a carbonila do éster, resultando na substituição nucleofílica da carbonila; o produto formado a partir dessa reação com o HOBt é denominado éster ativado.

O éster ativado é quem reage com a amina para formar a amida e o HOBt é reconstituído, por se tratar de um catalizador da reação (Esquema 4).

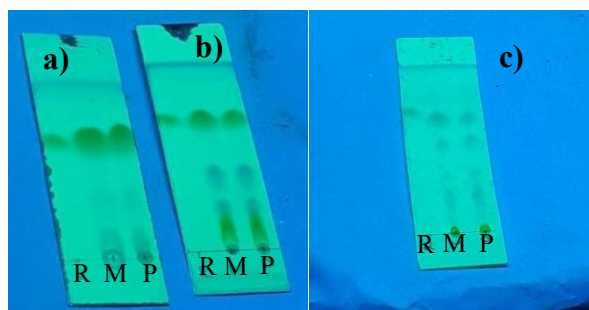
Esquema 4. Mecanismo de reação de amidação via EDC e HOBT.



Fonte: do autor.

Nas primeiras 96h foram realizadas diversas cromatografias em camada delgada (CCD) para acompanhar a evolução da reação, onde foi observada a presença da *p*-nitroanilina, material de partida (MP), no meio reacional. Assim, a reação foi colocada em aquecimento à 85°C por 24h, sendo possível notar a maior formação de possíveis produtos e consumo do MP (Figura 23). Após isso, a reação foi colocada em aquecimento à 120°C por mais 24h; com pouco aumento da intensidade das manchas correspondentes aos possíveis produtos formados, a reação foi interrompida, e o precipitado formado a partir da adição de água foi caracterizado por RMN ^1H (Figura 24). A massa obtida da filtração foi de 38,7 mg, o que corresponde a um rendimento de 33,8%.

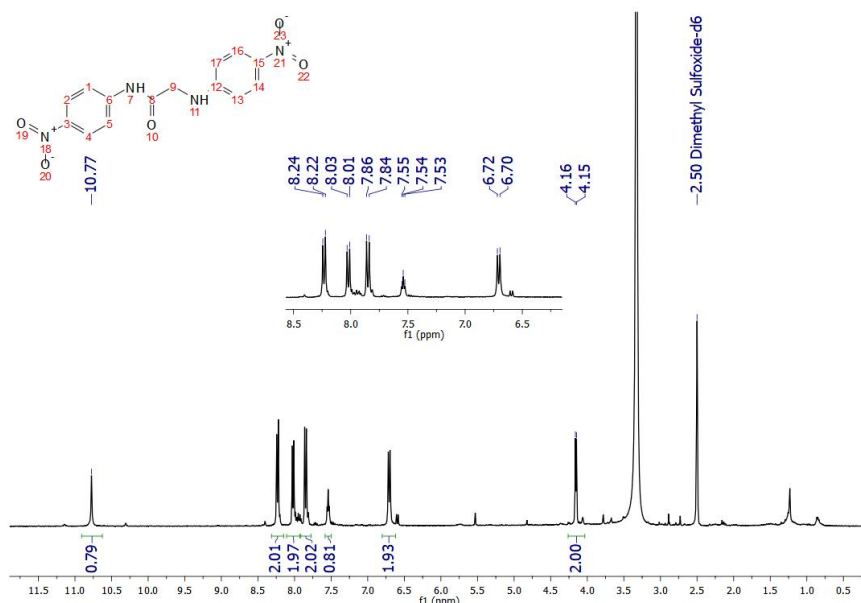
Figura 23. CCD após 96h da amidação da *p*-nitroanilina com HOBt e EDC à temperatura ambiente (a); CCD após 24h à 85°C, com maior consumo de MP (b); CCD após 24h à 120°C (c). R equivale ao MP (*p*-nitroanilina), M a misto e P ao produto. Eluente: hexano/acetato de etila (7:3)



Fonte: do autor.

A partir da análise de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , foi verificada a formação de um subproduto, composto **3** (Figura 24), o que mostra que a reação não teve quimiosseletividade à amidação, ocorrendo, simultaneamente, a substituição nucleofílica no fragmento brometo de alquila. Na Tabela 2 estão relacionados os prótons de cada ambiente químico da molécula obtida e seus respectivos sinais no RMN de ^1H .

Figura 24. RMN de ^1H do precipitado da reação da *p*-nitroanilina, ácido 2-bromoacético, HOBt e EDC (RMN de ^1H , 400MHz, DMSO- d_6).



Fonte: do autor.

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H do composto **3** (DMSO- d_6).

Hidrogênio	Deslocamento δ_{H} ^a (m ^b ; J ^c)
H9	4,16 (d; 6,1)
H13 e H17	6,71 (d; 9,2)
H11	7,54 (t; 5,9)
H1 e H5	7,85 (d; 9,2)
H14 e H16	8,02 (d; 9,1)
H2 e H4	8,23 (d; 9,1)
H7	10,77 (s)

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS com padrão interno

^b multiplicidade

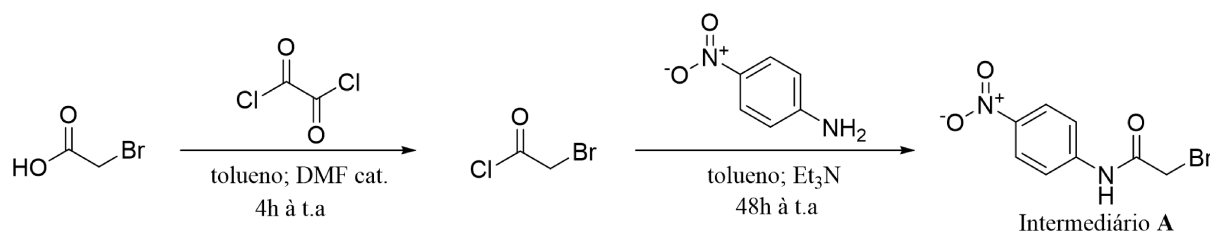
^c constantes de acoplamento em Hz

Fonte: do autor.

4.3.1.2 Amidação via formação de cloreto de ácido

Para melhorar a quimiosseletividade, optou-se pela amidação a partir do cloreto de ácido, por ser um eletrófilo mais reativo, que reage preferencialmente com a amina (Esquema 5).

Esquema 5. Rota de síntese para obtenção do intermediário **A** via formação de cloreto de ácido.



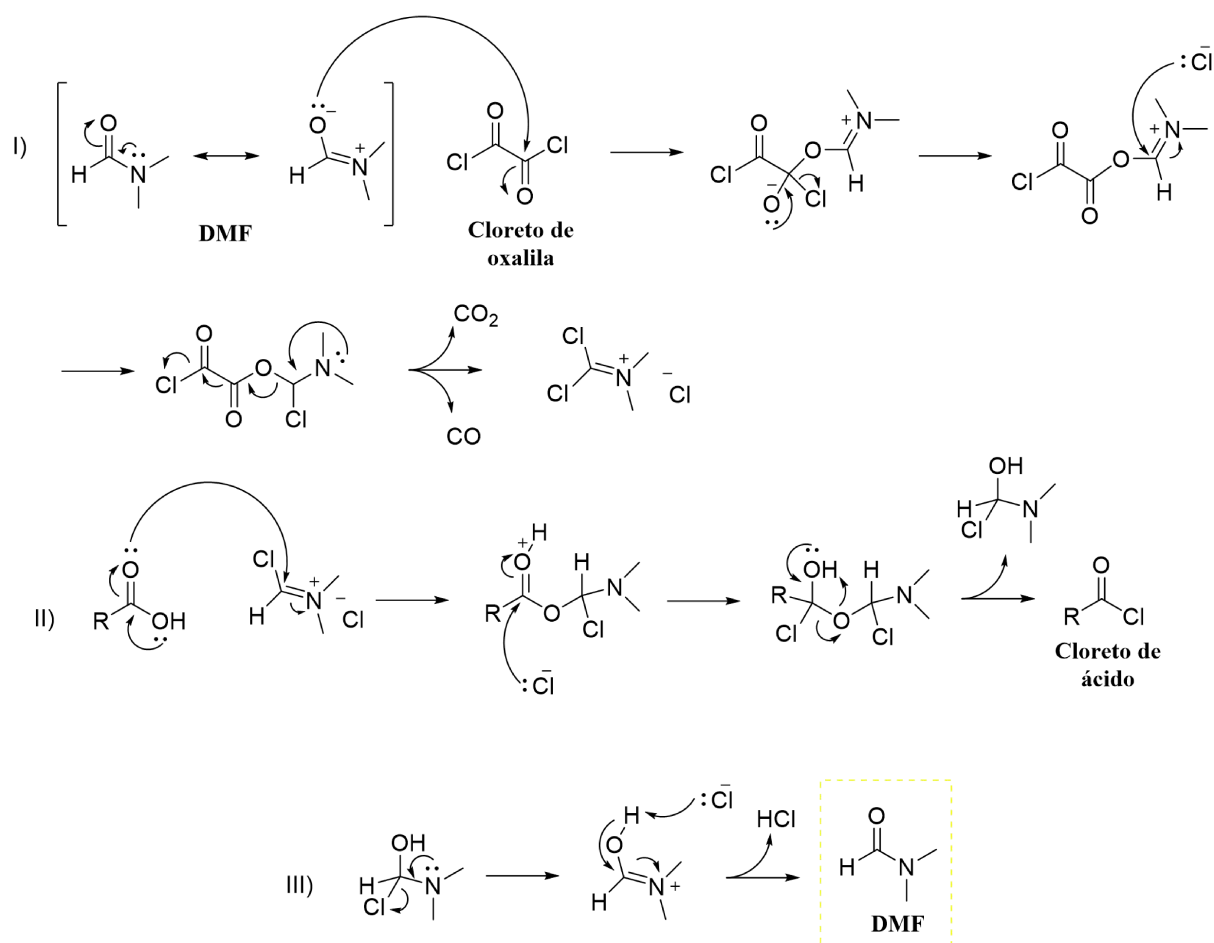
Fonte: do autor.

O mecanismo da formação do cloreto de ácido (Esquema 6) se inicia pelo ataque nucleofílico de um par de elétrons do oxigênio do DMF à carbonila do cloreto de oxalila. O oxigênio com carga negativa, ao recuperar a ligação dupla carbonílica acarreta na eliminação do cloreto, que ataca o carbono com densidade eletrônica positiva ligado ao nitrogênio. Na

etapa II, após as eliminações de CO₂ e CO, a molécula resultante reage com o ácido carboxílico, onde o carbono δ^+ ligado ao nitrogênio sofre um ataque a partir da hidroxila, resultando numa adição nucleofílica.

O cloreto presente no meio reacional reage facilmente com o carbono carbonílico da estrutura formada, e a sua adição acarreta na eliminação da estrutura que é reconstituída como DMF catalítico. O cloreto de ácido formado é um eletrófilo mais reativo que o ácido carboxílico, uma vez que o cloro apresenta um efeito retirador muito grande sob a carbonila; além disso, é um bom grupo de saída na reação de substituição nucleofílica. Essas características são essenciais para reações com nucleófilos mais fracos, como na *p*-nitroanilina, um composto com efeito retirador do grupo nitro e grande conjugação.

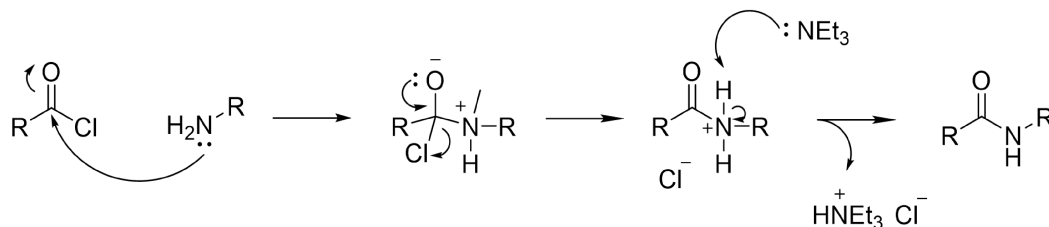
Esquema 6. Mecanismo de reação da formação do cloreto de ácido a partir do cloreto de oxalila e DMF.



Fonte: do autor.

O mecanismo da amidação a partir cloreto de ácido (Esquema 7) se inicia pelo ataque nucleofílico da amina na carbonila do ácido, resultando na substituição nucleofílica.

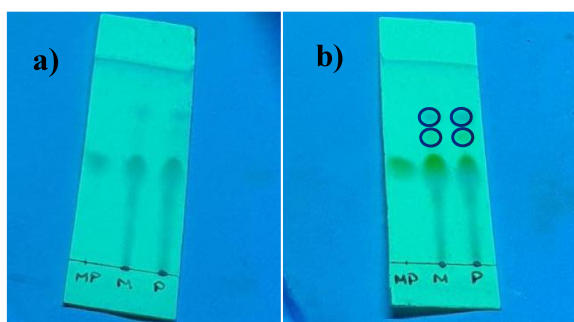
Esquema 7. Mecanismo de reação de amidação via cloreto de ácido.



Fonte: do autor.

Na reação realizada em laboratório, o ácido 2-bromoacético foi transformado no cloreto de bromoacetila a partir da reação com cloreto de oxalila em tolueno como solvente e DMF como catalisador. Posteriormente, o cloreto de ácido formado reagiu com a *p*-nitroanilina na presença de trietilamina como base e tolueno como solvente. A reação foi acompanhada por CCD.

Figura 25. CCD da amidação da *p*-nitroanilina com cloreto de ácido após 24h (a); CCD após 48h (b). MP equivale ao material de partida (*p*-nitroanilina), M a misto e P ao produto de reação. Eluente: hexano/acetato de etila (7:3)

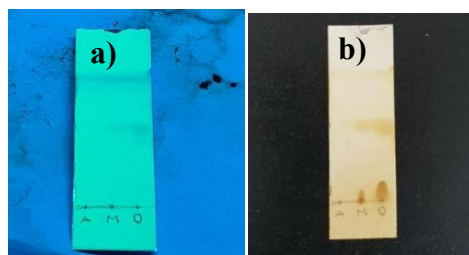


Fonte: do autor.

Após 48h de reação, foi possível notar na CCD (Figura 25) a presença de manchas mais apolares que poderiam ser correspondentes ao possível produto. Assim, para evitar mais formação de subprodutos, a reação foi interrompida e o meio reacional foi extraído com acetato de etila. A partir da CCD das fases orgânica e aquosa da extração líquido-líquido (Figura 26) revelada na câmara de ultravioleta e após tratamento com iodo, verificou-se que o

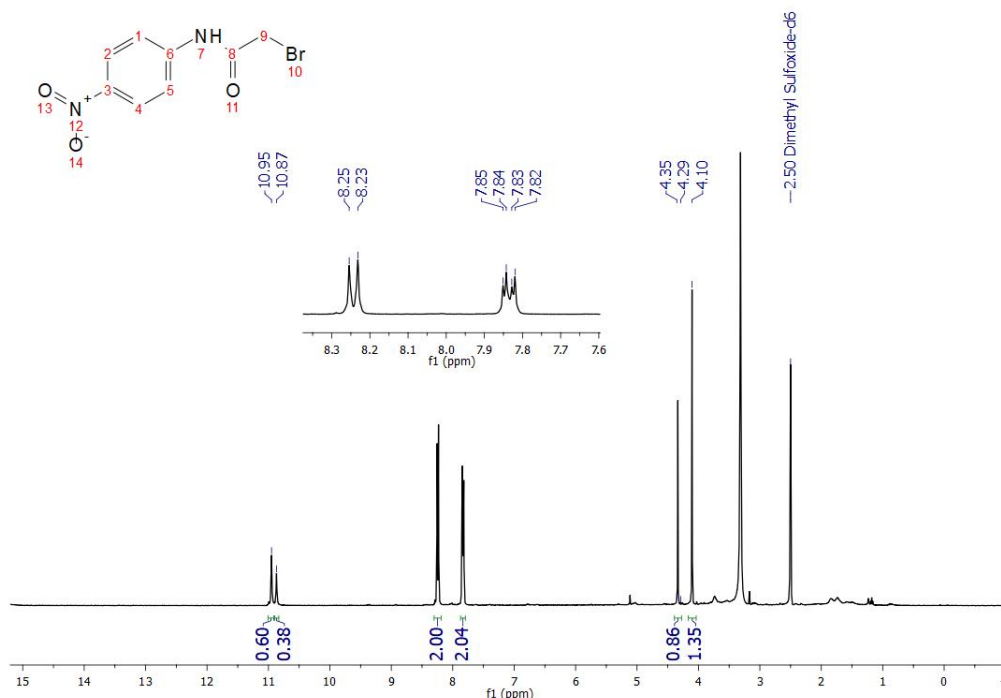
possível produto foi efetivamente extraído pelo acetato de etila. A fase orgânica, após secagem do solvente, foi submetida a uma análise de RMN de ^1H (Figura 27) para caracterização. O produto extraído apresentou uma massa de 20 mg, o que corresponderia a um rendimento de 21,3%.

Figura 26. CCD após extração (amidação da *p*-nitroanilina com cloreto de ácido) com água/acetato de etila (a); CCD após tratamento com iodo (b). A é referente à fração aquosa, M misto e O a fração orgânica. Eluente: hexano/acetato de etila (7:3)



Fonte: do autor.

Figura 27. RMN de ^1H do produto extraído da reação da *p*-nitroanilina, cloreto de ácido 2-bromoacético (intermediário A) (RMN de ^1H , 400MHz, DMSO- d_6).



Fonte: do autor.

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H do intermediário **A** (DMSO- d_6).

Hidrogênio	Deslocamento δ_{H} ^a (m ^b ; J^c)
H9	4,35 (s); 4,10 (s)
H1 e H5	7,84 (m)
H2 e H4	8,24 (d; 9,1)
H7	10,95 (s); 10,87 (s)

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS com padrão interno

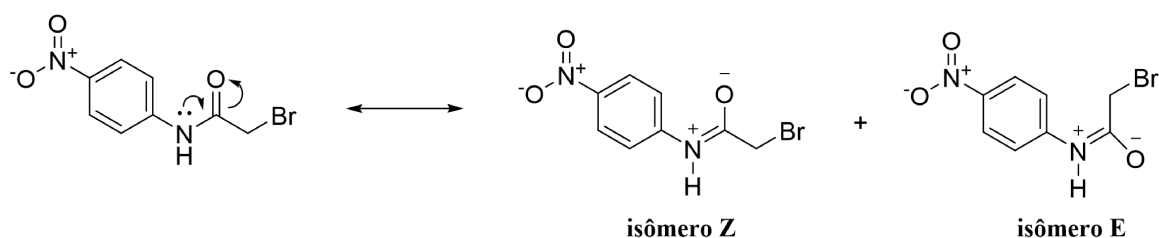
^b multiplicidade

^c constantes de acoplamento em Hz

Fonte: do autor.

Ao analisar o RMN de ^1H do intermediário **A**, nota-se que no deslocamento referente ao hidrogênio da amida (H7) existem dois singletos, e o mesmo ocorre nos dupletos no deslocamento atribuído aos hidrogênios H1 e H5. Esse fenômeno é decorrente de estruturas de ressonância presente nas amidas, o que resulta na formação de isômeros com diferentes ambientes químicos. Apesar de não ser possível prever exatamente qual a estrutura de ressonância para cada deslocamento, o esquema 8 representa como esse fenômeno ocorre e resulta em ambientes químicos distintos. Entretanto, a partir da integração, é possível perceber que a proporção dos isômeros é de 6:4.

Esquema 8. Representação de isômeros formados a partir dos efeitos de ressonância do intermediário **A**.



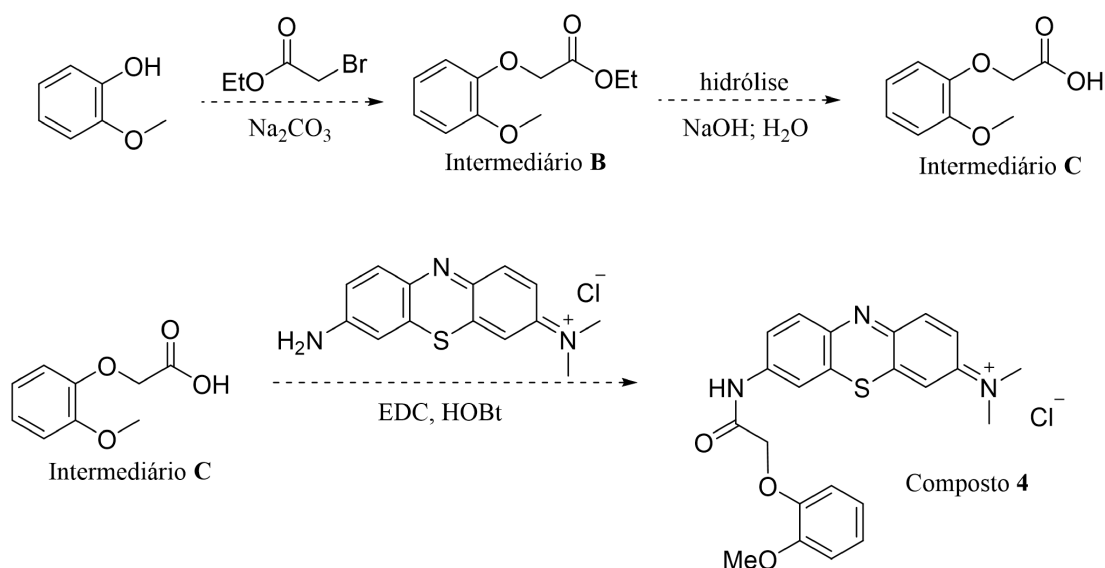
Fonte: do autor.

Durante a reação, um dos problemas visualizados foi a baixa solubilidade da *p*-nitroanilina em tolueno, mesmo com adição de Et_3N , o que pode ter contribuído para o baixo rendimento obtido, além da baixa reatividade da *p*-nitroanilina.

4.3.2 Eterificação seguida por amidação

Devido aos problemas das rotas sintéticas anteriores, tais como baixa quimiosseletividade e baixos rendimentos, uma nova rota sintética foi planejada, partindo inicialmente da eterificação do análogo à Capsaicina (2-metóxfenol) para posterior reação de amidação do Azure A, representada no esquema 9.

Esquema 9. Nova rota sintética para a síntese do Composto Modelo 2 ou Composto 4.

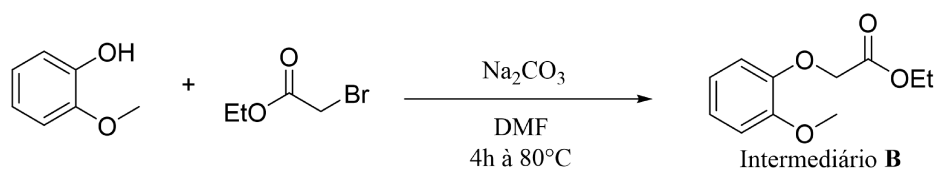


Fonte: do autor.

4.3.1.1 Substituição nucleofílica

A etapa de síntese do intermediário **B** foi feita a partir da reação do 2-metóxfenol com 2-bromoacetato de etila na presença de carbonato de sódio em DMF à 80°C (Esquema 10), com acompanhamento da reação por CDD durante as 4h.

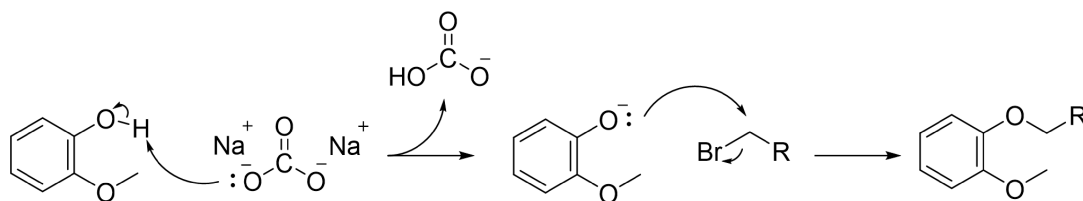
Esquema 10. Rota de síntese para obtenção do intermediário **B**.



Fonte: do autor.

A partir da captura do hidrogênio do fenol por meio do carbonato de sódio, o par de elétrons do fenolato se torna um nucleófilo mais forte, que ataca o carbono com densidade eletrônica positiva ligado ao bromo, o que resulta em uma substituição nucleofílica (Esquema 11). O carbonato, ao capturar os prótons do fenol, se transforma em ácido carbônico e se decompõe em CO_2 e água.

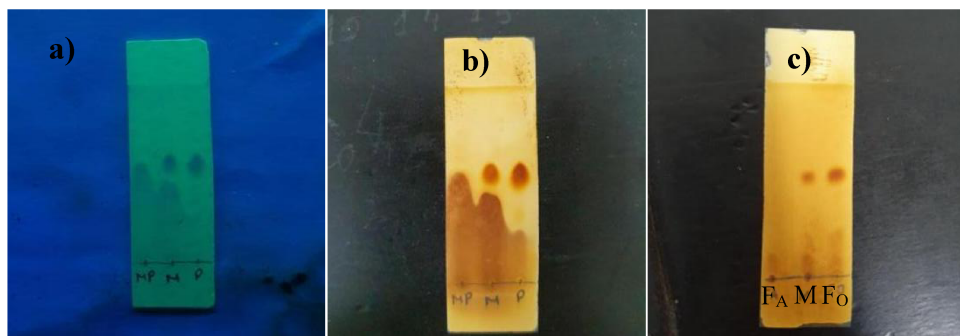
Esquema 11. Mecanismo de reação de substituição nucleofílica.



Fonte: do autor.

A partir da CCD da reação, nota-se o completo consumo do 2-metóxfenol. Assim, a reação foi interrompida e o possível produto foi extraído com acetato de etila e água destilada; a CCD das fases orgânica e aquosa após extração mostra a presença de um produto na fase orgânica. O material final pesado apresentou massa de 243,6 mg, com rendimento de 71,9%.

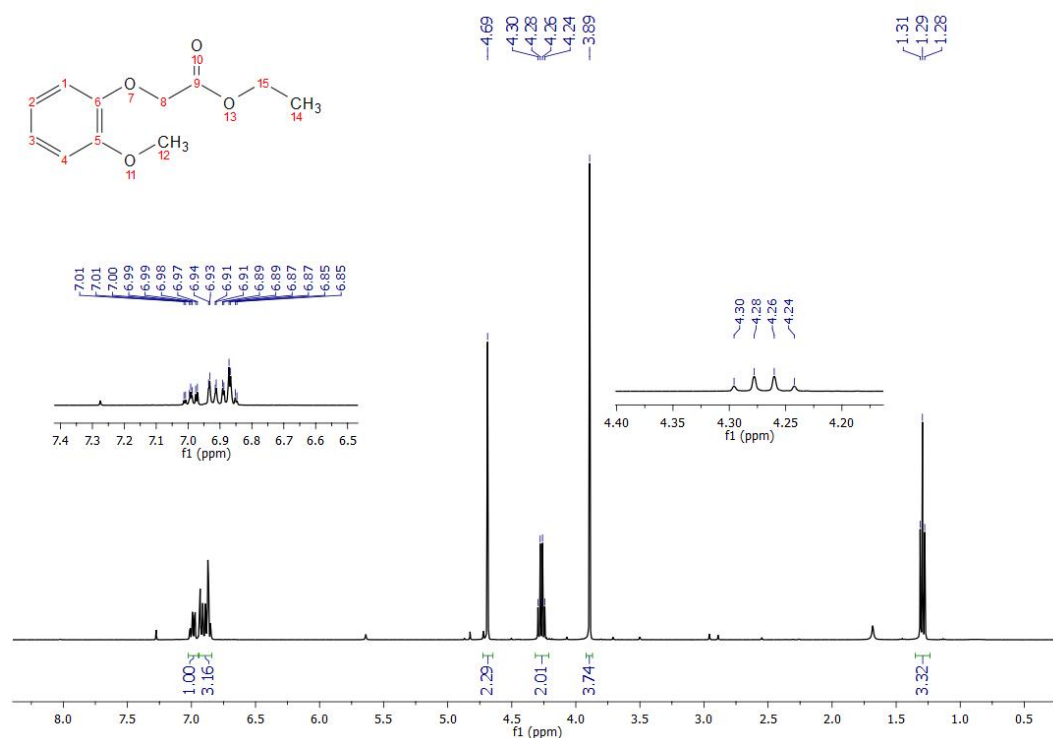
Figura 28. CCD após 4h de reação de síntese do intermediário **B** (a e b), MP (2-metóxfenol) equivale ao material de partida, M a misto e P ao produto de reação; CCD após extração com água/acetato de etila (c), onde FA é fase aquosa, M é misto e FO a fase orgânica. Eluente: hexano/acetato de etila (8:2).



Fonte: do autor.

Após isso, o material isolado foi caracterizado por RMN de ^1H (Figura 29). Por meio dos dados, pôde-se verificar a formação do intermediário **B**, que foi utilizado como reagente para obtenção do intermediário **C**.

Figura 29. RMN de ^1H do produto extraído da reação para produção do intermediário **B** (RMN de ^1H , 400MHz, CDCl_3).



Fonte: do autor.

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H do intermediário **B** (CDCl_3).

Hidrogênio	Deslocamento δ_{H} ^a (m ^b , J ^c)
H14	1,29 (t; 7,1)
H12	3,89 (s)
H15	4,27 (q; 7,1)
H8	4,69 (s)
H1 e H4	6,94 - 6,85 (m)
H2 e H3	7,01 - 6,97 (m)

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS com padrão interno

^b multiplicidade

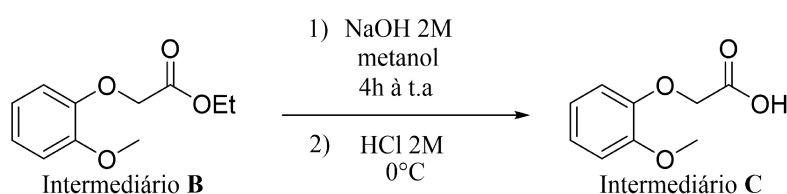
^c constantes de acoplamento em Hz

Fonte: do autor.

4.3.1.2 Hidrólise do intermediário **B**

Com o intuito de efetuar uma reação de amidação na carbonila do intermediário **B**, foi realizada uma etapa de hidrólise de éster para retirar o grupo protetor do ácido carboxílico e transformar a molécula em um ácido carboxílico (intermediário **C**), procedimento representado pelo esquema 8. Inicialmente o éster **B** reagiu com uma solução aquosa 2 M de NaOH usando metanol como solvente à temperatura ambiente.

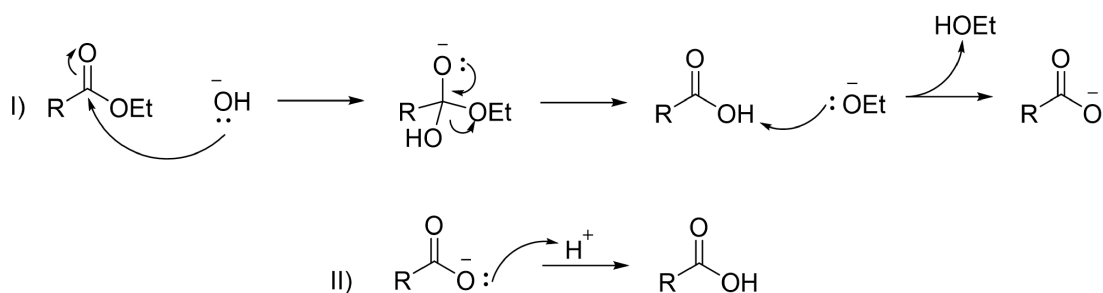
Esquema 12. Rota de síntese para obtenção do intermediário **C**.



Fonte: do autor.

O mecanismo da hidrólise do éster (Esquema 13) acontece a partir da substituição nucleofílica, onde o alcóxido é o grupo abandonador. A desprotonação do ácido a partir do alcóxido torna necessária a adição de ácido em excesso (etapa II) para que o ácido carboxílico seja reconstituído.

Esquema 13. Mecanismo de reação da hidrólise do éster em meio básico.

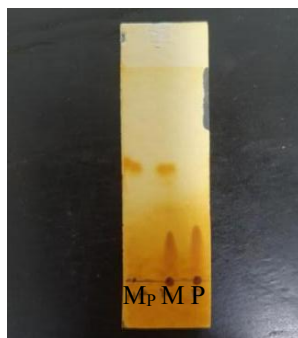


Fonte: do autor.

Após o consumo de todo o éster **B**, visualizado na CCD da Figura 30, a reação foi interrompida após 2h. Na sequência foi adicionado uma solução de HCl (2 M) à 0°C até pH 2 e o sólido formado foi filtrado, gerando uma massa de 138 mg, o que representaria um rendimento de 65,5%. Observou-se por CCD que parte do possível produto estava solubilizado na solução aquosa filtrada. Foi feita uma extração dessa solução aquosa com

acetato de etila, que após evaporação, resultou em 73,9 mg do produto. Assim, o rendimento total da reação foi de 100%. Ambos os materiais isolados (por filtração e por extração) foram caracterizados por RMN ^1H (Figuras 31 e 32).

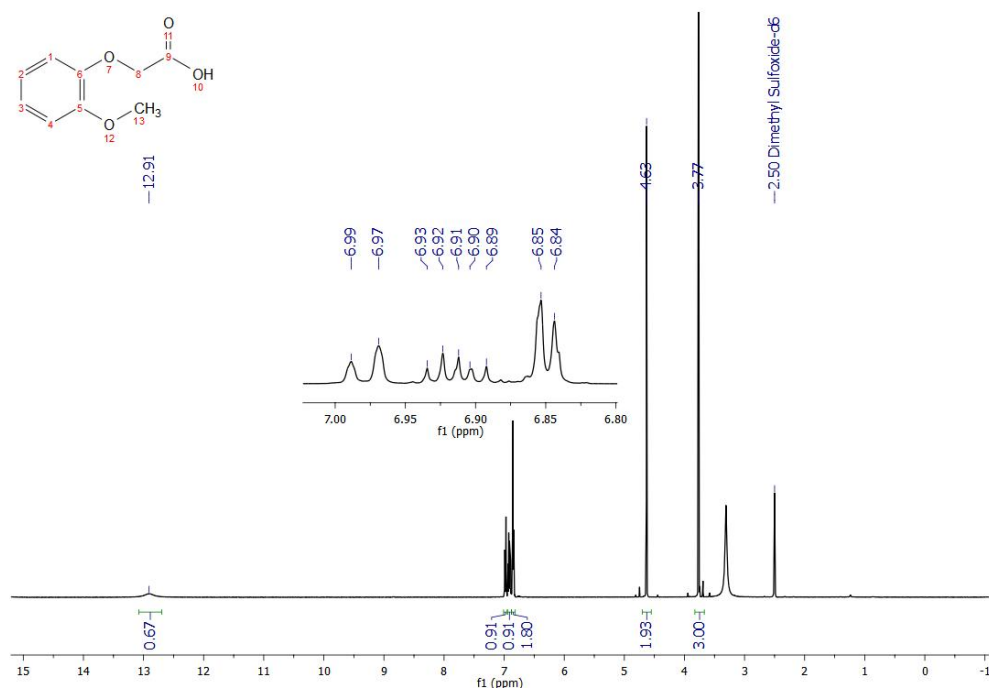
Figura 30. CCD após 2h de reação de síntese do intermediário **C**. MP é o material de partida (intermediário **B**), M é misto e P o possível produto. Eluente: DCM/metanol (9:1)



Fonte: do autor.

O ácido, por possuir maior polaridade em relação ao éster, fica mais retido na base da placa de CCD, enquanto o éster **B** elui com mais facilidade no eluente selecionado.

Figura 31. RMN de ^1H do produto filtrado da reação para produção do intermediário **C** (RMN de ^1H , 400MHz, DMSO- d_6).



Fonte: do autor.

Tabela 5. Dados de RMN ^1H do produto filtrado do intermediário **C** (DMSO- d_6).

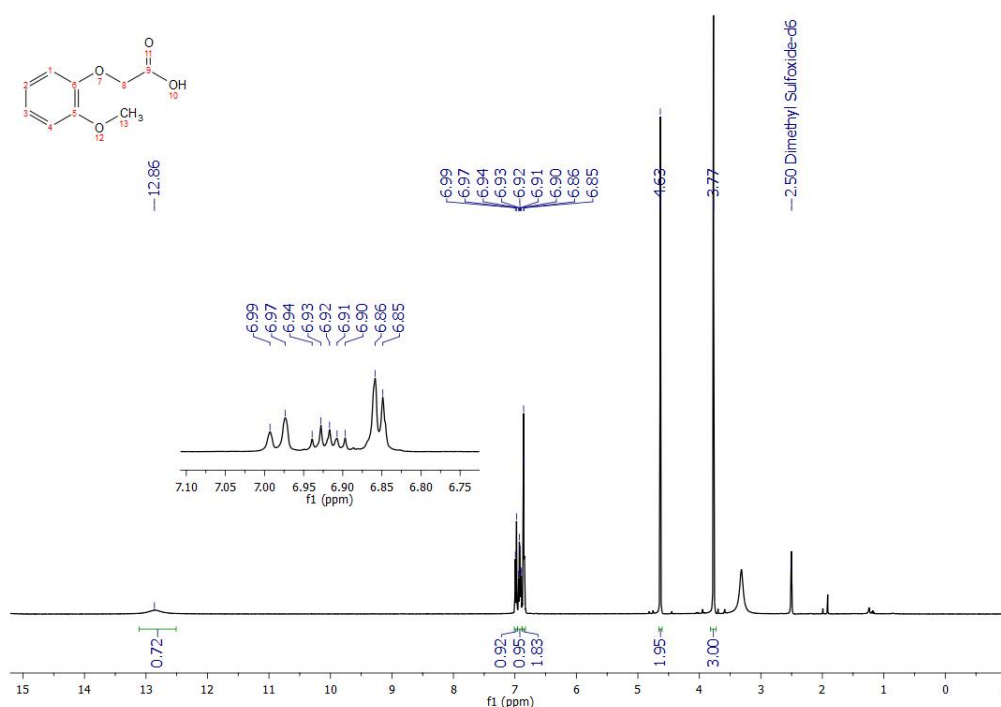
Posição ^1H	Deslocamento $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m $^{\text{b}}$)
H13	3,77 (s)
H8	4,63 (s)
H2 e H3	6,84 - 6,93 (m)
H1 e H4	6,97 - 6,99 (m)
H10	12,91 (s)

^a deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS com padrão interno

^b multiplicidade

Fonte: do autor.

Figura 32. RMN de ^1H do material extraído da reação para produção do intermediário **C** (RMN de ^1H , 400MHz, DMSO- d_6).



Fonte: do autor.

Os espectros de RMN de ^1H de ambos os materiais (filtrado e extraído) possuem mesmo perfil e deslocamentos semelhantes, o que mostra ser a mesma molécula, que foi usada na etapa seguinte de amidação.

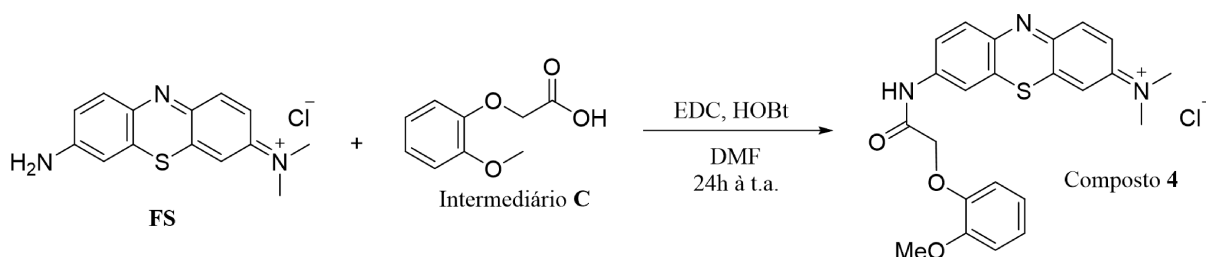
4.3.1.3 Amidação com AZURE A

Com a obtenção do intermediário **C**, e a possível otimização quanto ao rendimento e quimiosseletividade, a amidação pôde ser efetuada com o FS, Azure A.

4.3.1.3.1 Amidação com Azure A via EDC e HOBt

Inicialmente, foi realizada a tentativa de amidação entre o ácido carboxílico **C** e o Azure A usando EDC como agente de condensação, HOBt como catalisador e DMF como solvente (Esquema 14). A evolução da reação foi monitorada por CCD para verificar o consumo do Azure A e ácido **C**.

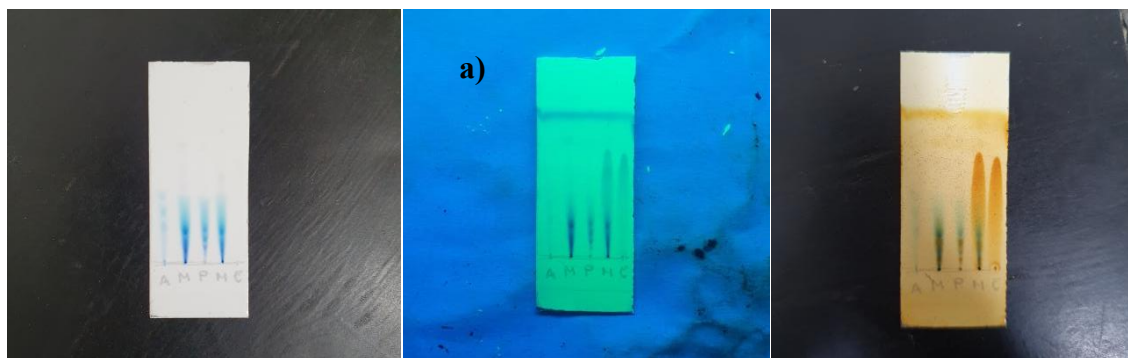
Esquema 14. Rota de síntese para obtenção do Composto **4** a partir de EDC e HOBt.



Fonte: do autor.

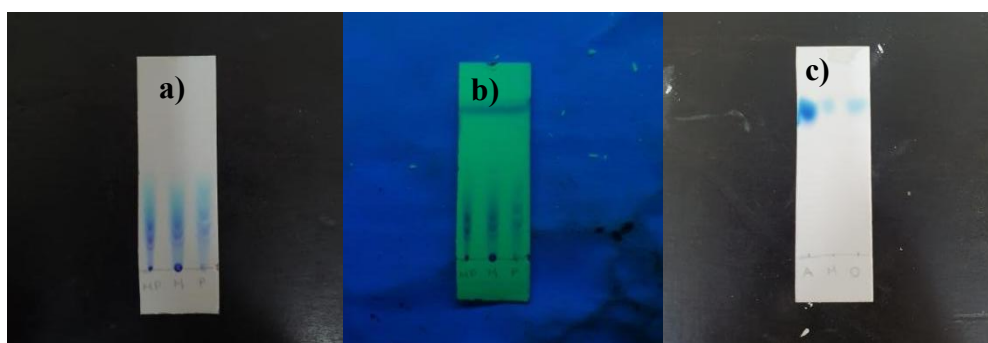
Após as primeiras horas de reação, pôde ser observado o consumo do ácido (intermediário **C**), porém, a visualização referente ao consumo do FS não pode ser feita nesse período (Figura 33). Assim, a reação foi deixada em agitação até completar 24h, onde foram feitas novas CCDs (Figura 34).

Figura 33. CCD após 6h de reação de síntese com EDC e HOBt do Composto 4. Da esquerda para a direita: “A” corresponde ao Azure A, “M” misto entre Azure e produto, “P” ao produto, “M” ao misto entre possível produto e ácido C e, “C” ao ácido intermediário C. Em (a) nota-se o consumo do ácido, o que demonstrou formação do éster ativado. Eluente: DCM/metanol (9:1).



Fonte: do autor.

Figura 34. CCD após 24h de reação de síntese com EDC e HOBt do Composto 4 (a e b), onde o consumo do Azure A (MP) não foi visível. CCD após extração (direita), onde “A” é fase aquosa, “M” misto e “O” fase orgânica, onde a maior concentração de FS se situou na fase aquosa “A”. Eluente: DCM/metanol (9:1) e DCM/metanol (85:15).



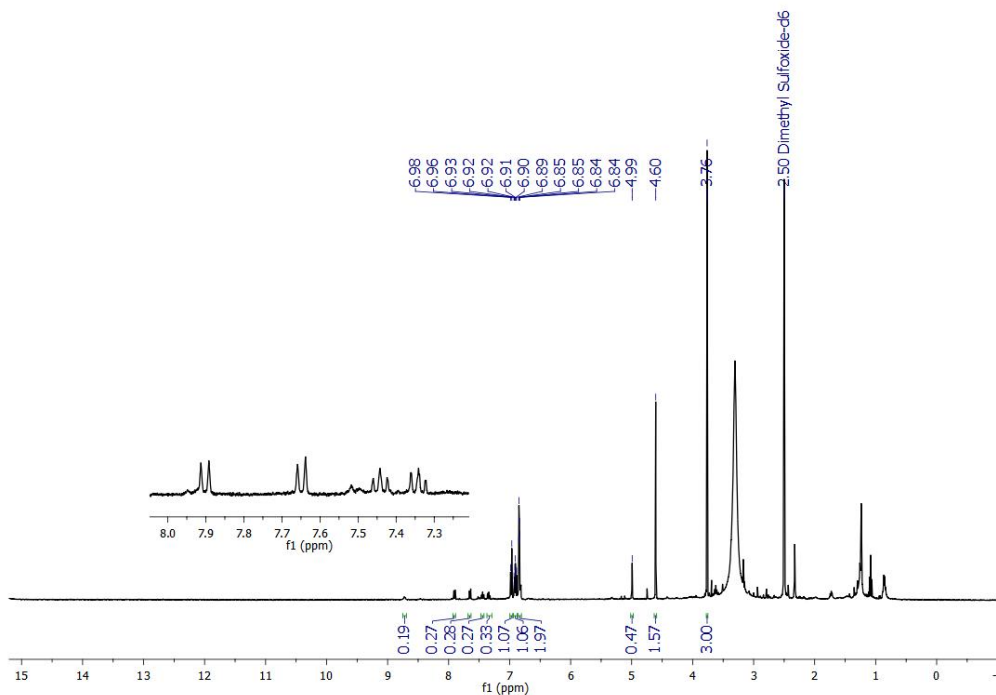
Fonte: do autor.

Devido a dificuldade de visualizar o progresso da reação, esta foi interrompida. Após adição de água destilada, a mistura foi extraída com DCM, seguido de acetato de etila, onde o material extraído nas fases orgânicas ($m = 20$ mg) foi caracterizado por RMN de ^1H (Figura 35). Durante a extração, notou-se que a maioria do material se concentrava na fase aquosa, mesmo com sucessivas extrações, o que pode ser verificado na CCD da extração, na qual a mancha correspondente à fase aquosa apresenta maior intensidade.

A preferência pela fase aquosa pode ser devido ao fato de que o Azure A é um sal catiônico, assim como o possível produto formado. O fragmento adicionado a partir da

amidação pode não tornar o produto lipofílico o suficiente para migrar totalmente para os solventes orgânicos escolhidos para a extração.

Figura 35. RMN de ^1H do produto extraído da reação com HOBt e EDC para produção do Composto 4. (RMN de ^1H , 400MHz, DMSO- d_6).



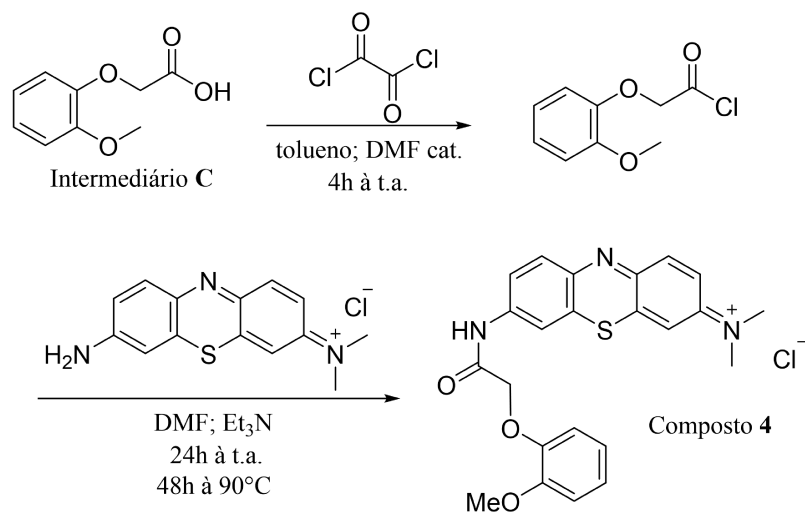
Fonte: do autor.

A partir do espectro de RMN de ^1H do material extraído, é possível notar os picos referentes ao fragmento do ácido e, com intensidade menor, o Azure A. Como não foi possível visualizar a presença do próton da possível amida formada, optou-se realizar a amidação a partir do cloreto de ácido.

4.3.1.3.2 Amidação com Azure A via cloreto de ácido

Alternativamente foi realizado a tentativa de amidação com o Azure A a partir do cloreto de ácido, que está representada no esquema 15.

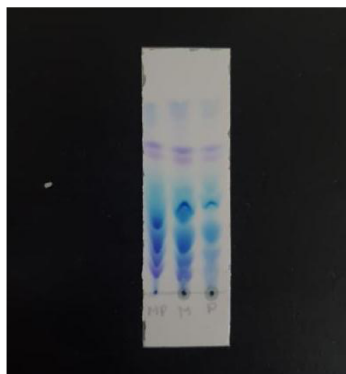
Esquema 15. Rota de síntese para obtenção do Composto **4** a partir de Cloreto de Ácido.



Fonte: do autor.

Inicialmente o ácido carboxílico **C** foi transformado no cloreto de ácido a partir da reação com cloreto de oxalila em tolueno anidro e DMF como catalisador. Posteriormente, o cloreto de ácido foi adicionado à uma mistura de Azure A e trietilamina em DMF. O meio reacional foi deixado em agitação a temperatura ambiente por 24h e monitorada por CCD. Em comparação à reação utilizando HOBt e EDC, as mudanças nas manchas da CCD referente à reação com cloreto de ácido foram mais perceptíveis, o que pôde indicar a formação do produto (Figura 36).

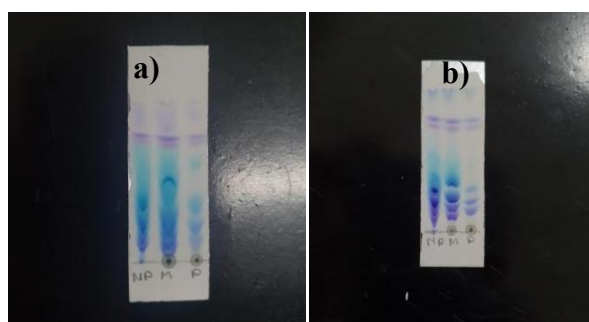
Figura 36. CCD após 24h de reação de síntese do Composto **4** à temperatura ambiente a partir do cloreto de ácido. “MP” é material de partida Azure A, “M” misto e “P” o possível produto. Eluente: DCM/metanol (9:1).



Fonte: do autor.

Assim, para favorecer a maior formação de produto, a reação foi colocada em aquecimento por 48h a 90°C e conferida por CCD. Nas primeiras 6h de aquecimento, notou-se uma mudança brusca nas manchas referente ao possível produto. Nas últimas 48h de aquecimento, a CCD apresentou maior separação das manchas na mistura reacional (Figura 37).

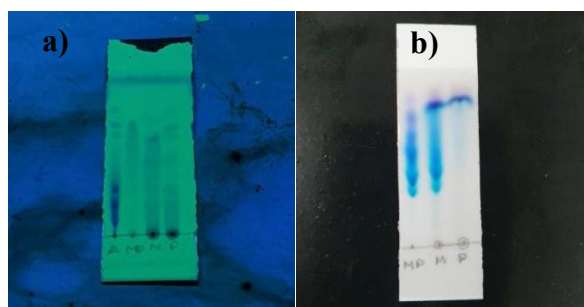
Figura 37. CCD após 6h (a) e após 48h (b) de aquecimento da síntese do Composto **4** a partir do cloreto de ácido. “MP” é material de partida Azure A, “M” misto e “P” o possível produto. Eluente: DCM/metanol (9:1).



Fonte: do autor.

A fim de evitar a concentração do material em fase aquosa, optou-se pela secagem do solvente ao invés da extração. Assim, foi feita uma nova CCD para observar o consumo de ácido, que foi utilizado em excesso, além de outra cromatografia utilizando de um eluente já utilizado para compostos fenotiazínicos (Figura 38) (KIERNAN, 2010).

Figura 38. A: CCD após secagem do solvente da síntese do Composto **4** a partir do cloreto de ácido. “A” é o FS, “MP” é o ácido, “M” misto entre ácido e produto e “P” o possível produto. Eluente: DCM/metanol (9:1). B: CCD do material após secagem onde “MP” é o Azure A, “M” misto entre Azure A e produto e “P” o possível produto. Eluente: n-butanol/ácido acético/água (4:1:5).

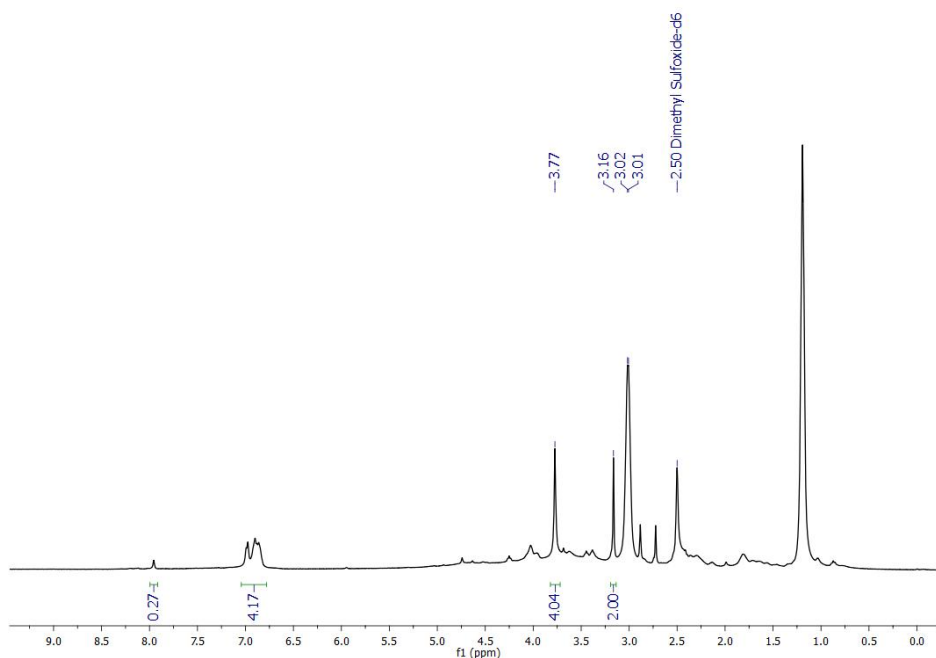


Fonte: do autor.

Por meio da CCD da Figura 38, nota-se pouca presença de ácido no possível produto, o que demonstra um progresso na reação. Além disso, na CCD com n-butanol/ácido acético/água (4:1:5) houve o maior deslocamento da mancha referente ao possível produto, o que demonstra a presença de um material menos polar em comparação ao Azure A. Assim, o material obtido foi caracterizado com RMN ^1H .

Devido à pureza do Azure A utilizado nas sínteses ser em torno de 80%, a visualização do progresso da reação foi dificultada; além disso, a reatividade desse FS não é previsível nestas condições, visto que as impurezas são corantes fenotiazínicos de estruturas químicas semelhantes, tais como Azure B, Azure C, entre outros (KIERNAN, 2010). Uma vez que o RMN de ^1H referente à Figura 39 se mostrou de complexa análise, não foi possível visualizar a formação do produto almejado. Relativo às perspectivas futuras, será feita uma viabilidade do processo de purificação por meio de coluna com sílica do produto obtido. Caso não seja viável, será avaliado a purificação do azure A antes de realizar as novas tentativas de amidação.

Figura 39. RMN de ^1H do produto da reação via cloreto de ácido para produção do Composto 4. (RMN de ^1H , 400MHz, DMSO- d_6).



Fonte: do autor.

5 CONCLUSÃO

A RAM é uma crescente preocupação mundial devido à capacidade de alguns microrganismos, em especial as bactérias, de sofrerem mutações a partir da exposição aos antibióticos, o que acarreta no surgimento de bactérias MDR. A TFDA é uma alternativa frente a RAM, que tem como objetivo a inativação de microrganismos por meio de um FS, que, na presença de luz, libera espécies reativas de oxigênio, resultando na morte celular.

Os compostos de fenotiazina, devido à sua natureza catiônica, são ótimos candidatos a FSs da TFDA, visto que bactérias possuem parede celular aniônica; essa diferença de cargas resulta na atração eletrostática entre membrana e FS, e consequentemente, na maior interação e acúmulo da substância no interior da célula. Porém, a presença e superexpressão de bombas de efluxo na membrana desses microrganismos resulta na multirresistência aos fármacos, o que resulta na diminuição da fotoatividade.

Nesse estudo, foi proposto um híbrido a partir do Azure A e do inibidor da bomba de efluxo NorA da *S. aureus*, a Capsaicina. As rotas de síntese para o composto foram avaliadas, onde a eterificação do fragmento fenólico para posterior amidação do FS apresentou maior quimiosseletividade, porém, a rota proposta para obtenção do produto almejado não foi adequada ou otimizada. Relativo às perspectivas futuras, deve-se estudar novas rotas e a possibilidade de se usar um material de partida FS com maior pureza, para melhor visualização nas CCDs.

6 REFERÊNCIAS

- ALEKSHUN, M.N., LEVY, S.B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell**, 2007. DOI 10.1016/j.cell.2007.03.004
- ALMATAR, M., *et al.* Efflux pump inhibitors: new updates. **Pharmacological Reports**, 2021. DOI 10.1007/s43440-020-00160-9
- CERNICCHI, G., FELICETTI, T., SABATINI, S. Microbial efflux pump inhibitors: A journey around quinoline and indole derivatives. **Molecules**, 2021. DOI 10.3390/molecules26226996
- CHENG, D., *et al.* Antimicrobial drugs in fighting against antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**, 2016. DOI 10.3389/fmicb.2016.00470
- CHRISTAKI, Eirini; MARCOU, Markella; TOFARIDES, Andreas. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, p. 26-40, 2020. DOI <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>.
- CORREIA, J.H., *et al.* Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions. **Pharmaceutics** ed. 13., 2021. DOI 10.3390/pharmaceutics13091332
- DADGOSTAR, Porooshat. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. **Dove Press journal: Infection and Drug Resistance**, p. 3903-3910, 2019. DOI <http://doi.org/10.2147/IDR.S234610>.
- DE OLIVEIRA, K. T., DE SOUZA, J. M., DA SILVA GOBO, N. R., DE ASSIS, F. F., & BROCKSOM, T. J. Basic concepts and applications of porphyrins, chlorins and phthalocyanines as photosensitizers in photonic therapies. **Revista Virtual de Quimica**, p. 310–335, 2015. DOI <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150016>
- Enhances Antimicrobial Photodynamic Inactivation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Vitro and in Vivo. **ACS Infectious Diseases**, ed. 3, p. 756–766, 2017. DOI 10.1021/acsinfecdis.7b00095
- HAMBLIN, M .R., HASAN, T., 2004. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical and Photobiological Sciences** 3, 436–450, 2004. DOI 10.1039/b311900a
- HAMBLIN, M.R. Drug efflux pumps in photodynamic therapy, in: *Drug Efflux Pumps in Cancer Resistance Pathways: From Molecular Recognition and Characterization to Possible Inhibition Strategies in Chemotherapy*. **Elsevier**, p. 251–276, 2020. DOI 10.1016/b978-0-12-816434-1.00008-5

HASHIMOTO, M.C., *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy on drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-induced infection. An in vivo study. **Photochemistry and Photobiology** 88, p. 590–595, 2012. DOI 10.1111/j.1751-1097.2012.01137.x

INFLUXO/EFLUXO de drogas. *In*: MECANISMOS de resistência à quimioterápicos em células tumorais. 2015. Tese (Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia) - USP/Instituto Butantan/ IPT.

JIA, M., MAI, B., LIU, S., LI, Z., LIU, Q., & WANG, P. Antibacterial effect of S-Porphin sodium photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* and multiple drug resistance *Staphylococcus aureus*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, ed. 28, p. 80–87, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.08.031>

KIERNAN, J. On chemical reactions and staining mechanisms. **Connection** 19, p. 132-136, 2010.

KIM, M.M., DARAFSHEH, A. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, 2020 DOI 10.1111/php.13219

KISHEN, A., *et al.* Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *enterococcus faecalis* biofilm. **Photochemistry and Photobiology**, ed. 86, p. 1343–1349, 2010. DOI 10.1111/j.1751-1097.2010.00792.x

KOURTESI, C., *et al.* Microbial Efflux Systems and Inhibitors: Approaches to Drug Discovery and the Challenge of Clinical Implementation. **The Open Microbiology Journal** 7, p. 34–52, 2013. DOI 10.2174/1874285801307010034

LIU, Y., *et al.* Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of Clinical and Translational Research**, 2015. DOI <https://doi.org/10.18053/jctres.201503.002>

MARQUEZ, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. **Biochimie**, 2005. DOI 10.1016/j.biochi.2005.04.012

MAZGAEEN, L., & GURUNG, P. Recent advances in lipopolysaccharide recognition systems. **International Journal of Molecular Sciences**, 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms21020379>

MOREIRA, L.M., *et al.* Azure dyes as new photosensitizer prototypes to application in photodynamic therapy against *Candida* spp. **Spectroscopy** 24, p. 621–628, 2010. DOI 10.3233/SPE-2010-0484

MORRISON, Lindsay; ZEMBOWER, Teresa R. Antimicrobial Resistance. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, p. 619-635, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004>.

NAAZ, F. 1,3,4-oxadiazole conjugates of capsaicin as potent NorA efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Bioorganic Chemistry** **113**, 2021. DOI 10.1016/j.bioorg.2021.105031

NAINU, F, *et al.* Pharmaceutical Approaches on Antimicrobial Resistance: Prospects and Challenges. **Antibiotics**, 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080981>

OMS. **Antimicrobial resistance.**, 17 nov. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 5 dez. 2022.

PIRES, Carla Avelar *et al.* Infecções bacterianas primárias da pele: perfil dos casos atendidos em um serviço de dermatologia na Região Amazônica, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, ed. 2, jun. 2015. DOI <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232015000200006>.

REZAIE, P., *et al.* The Effect of Quorum-Sensing and Efflux Pumps Interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Against Photooxidative Stress. *Journal of Lasers in Medical Sciences* 9, p. 161–167, 2018. DOI 10.15171/jlms.2018.30

REZENDE, T.K.L.; BARBOSA, H.P.; DOS SANTOS, L.F.; DE O. LIMA, K; ALVES DE MATOS, P.; TSUBONE, T.M.; GONÇALVES, R.R.; FERRARI J.L. Upconversion rare Earths nanomaterials applied to photodynamic therapy and bioimaging. **Front. Chem**, 2022. DOI 10.3389/fchem.2022.1035449

RINEH, A., *et al.* Attaching the NorA Efflux Pump Inhibitor INF55 to Methylene Blue Enhances Antimicrobial Photodynamic Inactivation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Vitro and in Vivo. **ACS Infectious Diseases** 3, p. 756–766, 2017. DOI 10.1021/acsinfecdis.7b00095

RINEH, A., *et al.* Attaching NorA efflux pump inhibitors to methylene blue enhances antimicrobial photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** 28, p. 2736–2740, 2018. DOI 10.1016/j.bmcl.2018.02.041

RODRIGUES, A. W. S.; CAMARGO, B.; MACIEL, E. P. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (mrsa) em elevadores de um Hospital da rede privada de Brasília-DF. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, v. 6, n. 11, p. 13-18, 2019.

SEUKEP, A. J.; *et al.* What Approaches to Thwart Bacterial Efflux Pumps-Mediated Resistance?. **Antibiotics**, 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101287>

SHARMA, A.; GUPTA, V. K.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **Indian Journal of Medical Research**, 2019. DOI 10.4103/ijmr.IJMR_2079_17

STEELE, A., *et al.* The safety and efficacy of phage therapy for superficial bacterial infections: A systematic review. **Antibiotics**, 2020. DOI 10.3390/antibiotics9110754

SUŁEK, A., *et al.* Photodynamic inactivation of bacteria with porphyrin derivatives: Effect of charge, lipophilicity, ros generation, and cellular uptake on their biological activity in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, ed. 21, p. 1–34, 2020. DOI 10.3390/ijms21228716

TEGOS, G.P., HAMBLIN, M.R. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, ed. 50, p. 196–203, 2006. DOI 10.1128/AAC.50.1.196-203.2006

TEGOS, G.P., *et al.* Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, ed. 52, p. 3202–3209, 2008. DOI 10.1128/AAC.00006-08

VERA, D.M.A. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. **Photochemistry and Photobiology**, 2012. DOI 10.1111/j.1751-1097.2012.01087.x

WANG, Z., *et al.* Light controllable chitosan micelles with ROS generation and essential oil release for the treatment of bacterial biofilm. **Carbohydrate Polymers**, 205, p. 533–539, 2019. DOI 10.1016/j.carbpol.2018.10.095

WANG, X., *et al.* Synthesis and evolution of S-Porphin sodium as a potential antitumor agent for photodynamic therapy against breast cancer. **Organic Chemistry Frontiers** 6, p. 362–372., 2019. DOI 10.1039/c8qo00959g