



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ -
UNIOESTE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO
SENSU EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PESQUISA DE NOVOS ANTIBIÓTICOS ANTI-*Pseudomonas
aeruginosas* UTILIZANDO MÉTODOS *in silico***

CRISTIANE DANIEL

**CASCADEL - PR
2020**

CRISTIANE DANIEL

PESQUISA DE NOVOS ANTIBIÓTICOS ANTI-*Pseudomonas aeruginosa*
UTILIZANDO MÉTODOS *in silico*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Cascavel - Paraná

2020

CRISTIANE DANIEL

PESQUISA DE NOVOS ANTIBIÓTICOS ANTI-*Pseudomonas aeruginosa*
UTILIZANDO MÉTODOS *in silico*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

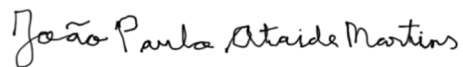
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE
Orientador



Prof. Dr. Alexandre Maller
UNIOESTE
Banca



Prof. Dr. João Paulo Ataíde Martins
UFMG
Banca

Cascavel – Paraná
2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Daniel, Cristiane

PESQUISA DE NOVOS ANTIBIÓTICOS ANTI-Pseudomonas aeruginosas UTILIZANDO MÉTODOS in silico / Cristiane Daniel; orientador(a), Eduardo Borges de Melo, 2020.
76 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Graduação em Farmácia Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Ciências Aplicadas à Saúde, 2020.

1. Modelagem molecular. 2. QSAR. 3. PqsD. 4. Triagem virtual. I. de Melo, Eduardo Borges . II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Cristiane Daniel

“Pesquisa de novos antibióticos anti-*Pseudomonas aeruginosa* utilizando métodos *in silico*”

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* de Cascavel, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

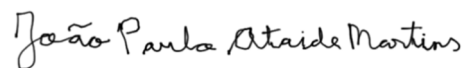
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE (Presidente)



Prof. Dr. Alexandre Maller
Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE



Prof. Dr. João Paulo Ataíde Martins
UFMG (membro externo ao programa)

Aprovado em 01 de dezembro de 2020.

Local: UNIOESTE/*campus* de Cascavel.

BIOGRAFIA

CRISTIANE DANIEL

Filha de Carlos Alberto Daniel e Claudete Daniel. Nasceu em 1993, no município de Três de Maio-RS. Atualmente é analista de Assuntos Regulatórios na Indústria Farmacêutica Prati-Donaduzzi & Cia LTDA localizada no município de Toledo-PR. Graduada em Farmácia pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (2016). Trabalhou por dois anos em outros setores da mesma indústria onde hoje atua, sendo eles, Controle de Qualidade e Central de Atendimento ao Consumidor, e um ano e meio em um sub empresa desta mesma indústria, na Biocinese – Centro de Estudos Biofarmacêuticos. Ainda, atuou por dois anos como farmacêutica plantonista em duas drogarias localizadas na cidade de Toledo-PR. Em 2018, iniciou suas atividades no Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UNIOESTE, na área de fármacos e medicamentos, com pesquisa em modelagem molecular e estudos de QSAR.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Eduardo Borges de Melo.

À universidade (UNIOESTE) e ao Programa de Pós Graduação Stricto-sensu em Ciências Farmacêuticas (PCF) e todo o seu corpo docente e administrativo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), e à Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

PESQUISA DE NOVOS ANTIBIÓTICOS ANTI-*Pseudomonas aeruginosa* UTILIZANDO MÉTODOS *in silico*

A infecção hospitalar, é um grave problema de saúde pública, pois aumenta o tempo e custos de internações e leva ao aumento das taxas de morbidade e mortalidade de pacientes. Os antibióticos cada vez menos potencialmente ativos, limitam as opções de tratamento para essas infecções, com isso a crescente necessidade de desenvolvimento de novos fármacos e novas classes de antibióticos. Infecções causadas pela *P. aeruginosa* são classificadas como o terceiro patógeno com maior frequência à resistência e encontrar um tratamento efetivo contra elas é um desafio, as concentrações capazes de inibir a resistência e tornar-se ativas contra a bactéria são incompatíveis à exposição humana. Neste contexto, utilizar alternativas que contornem a resistência desta bactéria tem sido uma boa opção para erradicação da infecção, a inativação de enzimas que tem capacidade de conferir tal resistência seria uma delas. Com isso a modelagem molecular tem se mostrado uma das ferramentas mais importantes na descoberta desses novos fármacos, pois possui potencial para alcançar propriedades intrínsecas que favoreçam as interações específicas. O objetivo deste projeto foi realizar estudos de Quantitative structure-activity relationship (QSAR) para um conjunto de compostos derivados de ácido benzamidobenzóico que apresentaram capacidade de inibição *in vitro* da atividade da 2-heptyl-4(1H)-quinolone synthase (PqsD) de *P. aeruginosa*, e a partir deste conjunto definir um modelo farmacofórico, para utilizar como ferramenta de triagem virtual na identificação de novos compostos com potencial para atividade antimicrobiana. **Materiais e métodos:** foi utilizado um conjunto de dados formado por estruturas contendo o ácido benzamidobenzóico como farmacóforo essencial, previamente descritas na literatura, utilizando ferramentas de modelagem molecular com geometrias termodinamicamente estáveis foram definidas e utilizadas na obtenção de uma série de descritores moleculares, estes utilizados para estudos 2D-QSAR. Estas mesmas estruturas também foram utilizadas como base para modelagem farmacofórica para triagem virtual. O modelo obtido no QSAR foi validado conforme atualmente recomendado pela literatura. Estudos de ancoramento molecular e toxicologia *in silico* foram utilizados como parte do estudo visando encontrar novos compostos hits potencialmente úteis como ponto de partida para o desenvolvimento de novos antibióticos para o tratamento de infecções proporcionadas pela bactéria em estudo. Este trabalho obteve 12 compostos, dos quais 10 se mostram promissores compostos-protótipos para o planejamento de novos inibidores da PqsD de *P. aeruginosa*, passo inicial para o desenvolvimento de novos agentes antibióticos. **Palavras chaves:** Triagem virtual; QSAR; Modelagem molecular; *Pseudomonas aeruginosa*; PqsD.

SEARCH FOR NEW ANTIBIOTICS ANTI-*Pseudomonas aeruginosa* USING IN SILICO METHODS

Hospital infection is a serious public health problem, as it increases the time and costs of hospitalizations and leads to increased rates of morbidity and mortality in patients. Antibiotics, which are less and less potentially active, limit the treatment options for these infections, with the increasing need for the development of new drugs and new classes of antibiotics. Infections caused by *P. aeruginosa* are classified as the third most frequent pathogen to resistance and finding an effective treatment against them is a challenge, since the concentrations capable of inhibiting resistance and becoming active against the bacteria are incompatible with human exposure. In this context, using alternatives that circumvent the resistance of this bacterium has been a good option to eradicate the infection, the inactivation of enzymes that have the capacity to confer such resistance would be one of them. Thus, molecular modeling has proven to be one of the most important tools in the discovery of these new drugs, as it has the potential to achieve intrinsic properties that favor specific interactions. The objective of this project was to carry out QSAR studies for a set of compounds derived from benzamidobenzoic acid that showed the ability to inhibit the PqsD activity of *P. aeruginosa in vitro*, and from this set to define a pharmacophoric model, to use as a screening tool in the identification of new compounds with potential for antimicrobial activity. Materials and methods: a data set formed by structures containing benzamidobenzoic acid as an essential pharmacophore, previously described in the literature, using molecular modeling tools, thermodynamically stable geometries were defined and used to obtain a series of molecular descriptors, these used for 2D-QSAR studies. These same structures were also used as a basis for pharmacophoric modeling for virtual screening. The model obtained in the QSAR was validated as currently recommended by the literature. Molecular anchorage studied, in silico toxicology were used as part of the study aiming to find new potentially successful compounds as a starting point for the development of new antibiotics for the treatment of infections caused by the bacteria under study. This work obtained 12 compounds, of which 10 are promising compound-prototypes for the planning of new *P. aeruginosa* PqsD inhibitors, an initial step for the development of new antibiotic agents.

Keywords: Virtual screening; QSAR; Molecular modeling; *Pseudomonas aeruginosa*; PqsD.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo geral	2
2.2 Objetivo específico	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 Infecções hospitalares	3
3.2 Infecções resistentes	4
3.3 Infecções por bactérias gram-negativas	7
3.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
3.5 Patogenicidade e fatores de virulência	9
3.6 Resistência da <i>P. aeruginosa</i>	9
3.6.1 PqsD: 2-heptil-4 (1H) -quinolona sintase	12
3.7 Tratamento contra <i>P. aeruginosa</i>	12
3.8 Novos antibióticos	13
3.9 Modelagem molecular	14
3.10 Triagem virtual	14
3.11 Estudos de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR)	15
4 CAPÍTULO I - IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS NOVOS AGENTES ANTI-<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UTILIZANDO MÉTODOS <i>in silico</i>. (Artigo redigido segundo normas da Revista Química Nova, QUALIS B3)	17
INTRODUÇÃO	19
PARTE EXPERIMENTAL	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
CONCLUSÃO	34
5. CONCLUSÕES GERAIS	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
7.1 Fundamentação teórica	36
7.2 Artigo Científico	39
ANEXOS	42

LISTA DE TABELAS

Fundamentação teórica

Tabela 1: Antibióticos inativados pelas classes das enzimas carbapenemases. 12

Artigo científico

Tabela 1: Resultados gerais dos estudos de ancoramento molecular com o conjunto hit..... 27

Tabela 2: Parâmetros das validações interna e externa..... 30

Tabela 3: Definições dos descritores selecionados 32

Tabela 4: Descritores e atividades preditas para os compostos do conjunto hit 33

Anexos

Tabela S1: Conjunto de dados selecionado para o estudo, e resultados das predições obtidas nas validações interna e externa..... 44

Tabela S2: Descritores selecionados para o modelo 2D-QSAR..... 61

LISTA DE FIGURAS

Fundamentação teórica

Figura 1: Modelos estruturais de funcionamento das bombas de efluxo de *P. aeruginosa*, indicando a localização das proteínas constituintes da bomba e ação preferencial a determinados tipos de substratos. FQ: fluoroquinolona; BL: β -lactâmico; TC: tetraciclina; CF: cefalosporina; CP: carbapenêmico; AG: aminoglicosídeo 11

Artigo científico

Figura 1: Estrutura básica dos compostos do conjunto de treinamento e histograma de distribuição dos compostos conforme seus valores de pIC₅₀. ... 21

Figura 2: Estrutura tridimensional da PqsD (PDB 3H76), subunidades A e B, com destaque para o sítio de ligação da subunidade A. A tríade catalítica (resíduos Cys112 e His257 e Asn87) está destacada em vermelho. 23

Figura 3: A. Modelo farmacofórico selecionado. Roxo: grupo aromático; vermelho: grupo íon negativo; amarelo: grupo aceptor de ligação de hidrogênio; branco: grupo doador de ligação de hidrogênio. B. Representação do farmacóforo sobre a molécula referência do estudo (25), a mais potente do conjunto de dados. 26

Figura 4: Compostos selecionados através de triagem baseada em ligante utilizando modelo farmacofórico selecionado e os processos de redução do conjunto de dados baseado em propriedades físico-químicas e toxicológicas. . 27

Figura 5: Resultados do ancoramento molecular (representações 2D e 3D) dos compostos hits D e G, que apresentaram as maiores afinidades de ligação com o sítio de ligação da PqsD (PDB 3H76). Figura construída no Discovery Studio Visualizer 17.2. 28

Figura 6: Resultados dos testes de robustez leave-N-out (LNO) (A) e correlação ao acaso (B). 31

Figura 7: Domínio de aplicabilidade Euclideano obtido 33

Figura 8: Tendência linear observada entre ΔG de ligação e a atividade predita dos 10 compostos hits localizados dentro do domínio de aplicabilidade. 34

Anexos

Figura S1: Resultados do ancoramento molecular (representações 2D e 3D) dos compostos hits A, B, C, E, F e H no sítio de ligação da PqsD (PDB 3H76). Figura construída no Discovery Studio Visualizer 17.2. 64

Figura S2: Resultados do ancoramento molecular (representações 2D e 3D) dos compostos hits I, J, K e L no sítio de ligação da PqsD (PDB 3H76). Figura construída no Discovery Studio Visualizer 17. 65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CADD: *Computer-Aided Drug Design* - planejamento de fármacos auxiliado por computador

DFT: *density functional theory* – teoria do funcional de densidade;

E_{HOMO}: energia do orbital molecular ocupado de maior energia;

E_{LUMO}: energia do orbital molecular desocupado de maior energia;

HF: Hartree-Fock;

HOMO: *highest occupied molecular orbital* - orbital molecular ocupado de maior energia;

LNO: validação cruzada *leave-N-out*;

LOO: validação cruzada *leave-one-out*;

LUMO: *lowest unoccupied molecular orbital* - orbital molecular desocupado de maior energia;

LV: *latent variables* – variáveis latentes;

MLR: *multiple linear regression* – regressão linear múltipla;

NBO: *Natural Bond Orders*

OPS: *ordered predictors selection* – seleção por preditores ordenados;

PLS: *Partial Least Squares* – quadrados mínimos parciais;

PQS: *Pseudomonas quinolona*

PQSD: *2-heptyl-4(1H)-quinolone synthase*

Q2 LNO: *correlation coefficient of leave-N-out cross-validation* - coeficiente de correlação da validação cruzada *leave-N-out*;

Q2 LOO: *correlation coefficient of leaveone-out crossvalidation* - coeficiente de correlação da validação cruzada *leave-oneout*;

QS: *quorum sensing*

QSAR: *quantitative structure-activity relationship* – relações estrutura-atividade quantitativas;

R₂pred: *correlation coefficient of prediction* - coeficiente de correlação da validação externa;

R₂: *coefficient multiple determination* - coeficiente de determinação múltipla;

RDF: *radial distributiton function*;

RMSEC: *standard error of calibration* – erro padrão de calibração;

SEP: *standard error of prediction* – erro padrão de predição externa;

1. INTRODUÇÃO

A infecção hospitalar, é um grave problema de saúde pública, pois aumenta o tempo e custos de internações e leva ao aumento das taxas de morbidade e mortalidade de pacientes. Atualmente é a quarta maior causa de mortes no mundo, ultrapassando os óbitos causados por acidente vascular cerebral (AVC) e infarto.

A prescrição de antibióticos nos hospitais fundamenta-se na eficácia do medicamento frente à infecção. Portanto, a terapêutica se baseia na utilização de um medicamento agressivo e de amplo espectro, o que culmina na melhora do quadro. Porém, essa terapia empírica muitas vezes faz o uso desnecessário desses medicamentos de amplo espectro, aumentando as chances de propagar a resistência.

Infecções causadas pela *Pseudomonas aeruginosa* são classificadas como o terceiro patógeno com maior frequência à resistência e estão associadas a altas taxas de mortalidade, o que causa ainda mais preocupação, já que a contaminação pela bactéria já atinge 13 % dos casos de infecções hospitalares, e 30 % de infecções em UTIs. Ainda hoje, encontrar um tratamento efetivo contra infecções pseudomonais é um desafio, pois as concentrações capazes de inibir a resistência e tornar-se ativas contra a bactéria são incompatíveis à exposição humana.

Os antibióticos cada vez menos potencialmente ativos, limitam as opções de tratamento para essas infecções, com isso a crescente necessidade de desenvolvimento de novos fármacos e novas classes de antibióticos, vem se tornando uma preocupação aparente dos tempos atuais. A modelagem molecular tem se mostrado uma das ferramentas mais importantes na descoberta desses novos fármacos, pois possui capacidade de alcançar propriedade intrínsecas que favoreçam as interações específicas entre ligante e receptor.

Neste contexto, utilizar alternativas que contornem a resistência desta bactéria tem sido uma boa opção para erradicação da infecção. Uma das maneiras observadas, seria a inativação de enzimas que tem capacidade de conferir tal resistência, entre elas a PqsD que possui atividade na produção de fatores de virulência.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo realizar estudos de QSAR para um conjunto de compostos derivados de ácido benzamidobenzóico que apresentaram capacidade de inibição *in vitro* da atividade da PqsD de *P. aeruginosa*, e a partir deste conjunto definir um modelo farmacofórico, para utilizar como ferramenta de triagem virtual na identificação de novos compostos com potencial para atividade antimicrobiana.

2.2 Objetivo específico

- Seleção na literatura de um conjunto de compostos com atividade contra a bactéria *P. aeruginosa*, mais especificamente contra a enzima PqsD desta bactéria;
- Obtenção das estruturas tridimensionais dos compostos citados utilizando ferramentas de modelagem molecular;
- Obtenção de geometrias termodinamicamente estáveis de cada composto;
- Obtenção de descritores moleculares a partir das geometrias mais estáveis;
- Realização de estudos QSAR-2D;
- Validação dos modelos QSAR obtidos;
- Realização de estudos de triagem virtual, utilizando métodos de modelagem farmacofórica, a partir do conjunto em estudo;
- Seleção dos compostos obtidos da etapa acima, utilizando filtro de toxicidade;
- Avaliação do conjunto reduzido por ancoramento molecular no sítio de ligação da PqsD;
- Identificação de compostos com potencial para atividade contra a enzima, resultando em possível atividade antimicrobiana.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Infecções hospitalares

Nas últimas décadas a infecção adquirida em hospitais passou a ser uma preocupação imponente. Estima-se que aproximadamente 10 % dos pacientes hospitalizados no mundo adquirem algum tipo de infecção relacionada à assistência à saúde. Nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) esse número é ainda maior, podendo chegar à 35 % (OLIVEIRA et al., 2012).

Por ser um assunto de preocupação mundial, em 1998 o Ministério da Saúde regulamentou medidas de prevenção e controle de infecção hospitalar e a definiu como sendo “qualquer infecção adquirida após internação do paciente, podendo ter relação com a hospitalização e/ou procedimentos hospitalares” (ANVISA, 1998).

A infecção hospitalar aumenta o tempo e custos das internações e ainda leva ao aumento das taxas de morbidade e mortalidade de pacientes. O Ministério da Saúde estima que a taxa de infecção hospitalar no Brasil é de 15 %, e que mais da metade dos casos (55,7 %) são fatais, o que equivale a cerca de 230 mil mortes anualmente. O problema já se tornou a quarta maior causa de mortes no mundo, ultrapassando os óbitos causados por acidente vascular cerebral (AVC) e infarto (FERREIRA, 2005; ASCOM/ANVISA, 2018; RIBEIRO e CORTINA, 2016).

Os procedimentos invasivos e as condições imunocomprometidas dos pacientes corroboram para o desenvolvimento dessas infecções, já que a presença de bactérias em superfícies e equipamentos se torna comum nesse ambiente por ser um local destinado a tratamentos. A utilização de cateteres venosos e sondas vesicais estão entre as maiores fontes de contaminações: o risco de um paciente desenvolver uma infecção aumenta de 3% a 10% por dia de cateterismo, com risco de 100% no trigésimo dia (QUIJADA-MARTÍNEZ et al., 2017; RIBEIRO e CORTINA, 2016; FLORES-MEIRELES et al., 2015).

Geralmente a infecção hospitalar inicial é monomicrobiana, tendo como prevalência as Enterobacteriaceae, em sua maioria a *Escherichia coli*. No entanto, com o internamento prolongado essas infecções evoluem para polimicrobianas, envolvendo *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *P. aeruginosa* e/ou espécies de *Enterococcus* e *Candida* spp. Isto dificulta o tratamento empírico com

antimicrobianos, e leva ao desenvolvimento de microrganismos multirresistentes (QUIJADA-MARTÍNEZ et al., 2017; JACOBSEN et al., 2008).

3.2 Infecções resistentes

A resistência bacteriana se caracteriza pela capacidade de crescimento da bactéria mesmo na presença de determinado antibiótico em concentração suficiente para inibir tal atividade. Essa resistência é conferida principalmente através de fatores genéticos e mutações, que são repassadas na reprodução da bactéria, motivadas, na maior parte das vezes, pela utilização irracional de fármacos antimicrobianos. Ainda, a capacidade de reprodução acelerada e o surgimento de novas cepas de bactérias multirresistentes faz com que o cenário da resistência se torne cada vez mais preocupante (RIBEIRO, M; CORTINA, 2016; ARAUJO et al., 2010; VITERBO DE FARIA, PESSALACIA e DA SILVA, 2016; MARILIA et al., 2016).

Até o início deste século a resistência bacteriana se limitava quase que totalmente ao ambiente hospitalar. Este já não é mais o panorama atual, e acredita-se que essa situação ocorra em virtude da má utilização dos antimicrobianos dentro dos próprios hospitais, e não pelo aumento da produção e comercialização dos mesmos (BUENAHORA et al., 2016; VITERBO DE FARIA, PESSALACIA e DA SILVA, 2016).

A prescrição de antibióticos nos hospitais fundamenta-se na eficácia do medicamento frente à uma infecção. Portanto, a terapêutica baseia-se na utilização de um medicamento agressivo e de amplo espectro, o que culmina na melhora do quadro. Porém, essa terapia empírica muitas vezes faz uso desnecessário desses antimicrobianos de amplo espectro, aumentando as chances de propagar a resistência (VITERBO DE FARIA, PESSALACIA e DA SILVA, 2016).

A literatura evidencia a prevalência de tratamentos empíricos de antimicrobianos e indica que 59% das prescrições são inadequadas. Farias, Pessalacia e Silva mostraram que de 275 internados avaliados que fizeram a utilização de pelo menos um antibiótico de amplo espectro, somente 18,5% haviam tido confirmação da presença de patógenos. Portanto, a grande maioria fez o uso sem ter nenhuma infecção comprovada (VITERBO DE FARIA, PESSALACIA e DA SILVA, 2016; FRANCO et al., 2015).

O exame de cultura que identifica o agente responsável pela infecção é um procedimento padronizado na grande maioria dos hospitais e juntamente a ele são

preconizados protocolos que auxiliam na determinação do antibiótico mais adequado para o tratamento. No entanto, essa prática é empregada pela minoria dos profissionais prescritores, o que expõem não só o paciente mas toda a sociedade a riscos que poderiam ser diminuídos e até mesmo evitados (VITERBO DE FARIA, PESSALACIA e DA SILVA, 2016; HAKKI et al., 2007).

A recomendação dos Serviços de Controle de Infecções Hospitalares (SCIH) é para que o antimicrobiano só seja prescrito após a realização do antibiograma e sua avaliação em comparação com os protocolos disponíveis. Essa conscientização profissional é fundamental e pode ser considerada uma medida de precaução e prevenção frente aos riscos já citados (VITERBO DE FARIA, PESSALACIA e DA SILVA, 2016).

O cenário atual é preocupante, tanto devido às alternativas terapêuticas “ineficazes”, quanto ao difícil acesso de novas drogas antibacterianas que, além de serem de alto custo, tem disponibilidade limitada no mercado. Além disso, o desenvolvimento dessas novas drogas vem caindo consideravelmente e a indústria farmacêutica não consegue acompanhar a avanço da multirresistência bacteriana. Por esta razão, nota-se a importância da conscientização e utilização racional de antimicrobianos (QUIJADA-MARTÍNEZ et al., 2017; VITERBO DE FARIA, PESSALACIA e DA SILVA, 2016).

A resistência bacteriana pode ser dividida em duas categorias: intrínseca e adquirida. A primeira, intrínseca ou natural, é determinada quando o microrganismo manifesta estruturas ou mecanismos que impedem a ação do fármaco sobre a célula, ocorre sem uma exposição prévia ao antibiótico e pode ser justificada por três possíveis razões: não possuir uma metabolização compatível com o mecanismo de ação do antibiótico, ação de enzimas que podem inativar o antibiótico e/ou disposição de uma morfologia peculiar (FRANCO et al., 2015; BAPTISTA, 2013).

Já a resistência adquirida incide em mutação do material genético, e a partir desta o antibiótico que antes sensibilizava o microrganismo agora já não o faz. Essa mutação genética se dá quando ocorre algum erro na replicação ou alteração na estrutura do gene, podendo ser repassada de forma vertical (reprodução) ou horizontal através de um de quatro meios básicos: (i) transformação, que ocorre após absorção do DNA presente no ambiente de outra bactéria da mesma espécie que sofreu lise; (ii) transdução, quando o gene de uma bactéria é incorporado por

outra através de bacteriófagos; (iii) conjugação, quando a transferência do material genético se dá por contato, podendo ser direto ou pela fímbria sexual; ou (iv) transposição, onde a célula recebe o gene em seu interior através de transposons (RIBEIRO, M; CORTINA, 2016; FRANCO et al., 2015).

Os principais mecanismos da resistência aos antibióticos são classificados em quatro tipos:

- Alteração da permeabilidade celular ou bloqueio da entrada da droga: a penetração do antibiótico na célula da bactéria está relacionada com suas características moleculares. Contudo, a principal via utilizada para esse feito são algumas proteínas transmembranares responsáveis pela difusão nas células bacterianas, as porinas. Neste tipo de resistência a alteração acontece nestas proteínas, podendo ser em quantidade, tamanho e seletividade, diminuindo ou impossibilitando a permeabilização do fármaco no interior da bactéria e como consequência diminuindo ou inibindo o seu efeito bactericida ou bacteriostático (RIBEIRO e CORTINA, 2016; BAPTISTA, 2013).

- Alteração do local de ação/sítio-alvo da droga: caracterizado por diminuir ou inativar a afinidade do fármaco com o local de ação, alterando ou codificando a estrutura da proteína alvo (peptidoglicano), interferindo na síntese de proteínas (de transporte, ativação ou inativação) ou do DNA (afetando a expressão), modificações essas que não causam prejuízos às funções celulares da própria bactéria (RIBEIRO e CORTINA, 2016; FRANCO et al., 2015; BAPTISTA, 2013).

- Bombas de efluxo: são proteínas presentes na membrana da bactéria que auxiliam no efluxo de substância presente internamente, ou seja, realiza o transporte de material intracelular para o exterior da célula, esta resistência é caracterizada pelo aumento da eficiência destas proteínas, que carregam o fármaco do meio interno (NEVES et al., 2011; RIBEIRO e CORTINA, 2016; FRANCO et al., 2015).

- Inativação enzimática: como o próprio nome diz, é a inativação do fármaco através da atividade de enzimas, estas produzidas pela bactéria, ocorrendo por meio de hidrólise, transferência de um grupo ou oxi-redução, inativando o antibiótico antes mesmo de atingir seu alvo (NEVES et al., 2011; RIBEIRO e CORTINA, 2016; FRANCO et al., 2015).

3.3 Infecções por bactérias gram-negativas

Entre as infecções oportunistas, as bactérias gram-negativas se destacam no quesito resistência antimicrobiana. Estas são responsáveis por cerca de 60 % das pneumonias, 25 % das infecções na corrente sanguínea, e são a maior causa de sepse cirúrgica adquirida ou do trato urinário no ambiente hospitalar (BUENAHORA et al., 2016; CUENTAS, 2016).

Uma razão para essa capacidade de resistência, é sua membrana celular que compreende uma camada extra, conferindo maior proteção à célula. A membrana das bactérias gram-negativas possui uma organização molecular sofisticada, tornando-se altamente hidrofóbica e seletiva (QUIJADA-MARTÍNEZ et al., 2017; DELCOUR, 2009).

A membrana externa é constituída por fosfolipídios e lipopolissacarídeos (LPS). Em meio a essa camada ficam alojadas algumas proteínas, conhecidas como porinas, que desempenham o papel de estruturação, mas principalmente servem como poros de difusão hidrofílica para o espaço periplásmico, onde localizam-se enzimas degradativas e cadeias soltas de peptidoglicanos, heteropolissacarídeos que conferem rigidez à parede celular e conseqüentemente a proteção da célula. Adjunto à parede celular, encontra-se a membrana citoplasmática que é formada por duas camadas fosfolipoproteicas que atuam como barreira osmótica (DELCOUR, 2009).

O LPS é composto por três porções: lipídio A (que age como uma endotoxina que quando liberada na corrente sanguínea provoca febre), um polissacarídeo central e uma cadeia lateral O específica, que distingue diferentes cepas e auxilia na identificação do agente através de exames. A diferenciação de grau de virulência entre as bactérias é a presença, nas gram-negativas, desta endotoxina LPS que confere propriedade patogênica, enquanto que nas gram-positivas a exotoxina ácido lipoteicoico confere aderência (DELCOUR, 2009; FERREIRA, 2005).

3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

A *P. aeruginosa* está entre os agentes multirresistentes nomeados de ESKAPE pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e considerados o terceiro problema de maior importância na saúde humana. Juntamente estão o *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,

Acinetobacter baumannii e *Enterobacter* sp. (BASSETTI, GINOCCHIO e MIKULSKA, 2011; BUENAHORA et al., 2016).

Infecções causadas pelas *P. aeruginosas* estão associadas a altas taxas de mortalidade, o que causa ainda mais preocupação, já que a contaminação pela bactéria já atinge 13 % dos casos de infecções hospitalares e 30 % das infecções em UTIs. Este patógeno é classificado como o terceiro com maior frequência à resistência. Esta alta ocorrência de infecção pela *P. aeruginosa* pode ser evidenciada pela capacidade adaptativa ao ambiente, tanto nutricional quanto climático, e assim esta bactéria pode sobreviver por longos períodos em equipamentos e utensílios hospitalares (CHIU et al., 2014; FERREIRA, 2005; NEVES et al., 2011).

Pertencente à família das *Pseudomonadaceae*, esta bactéria caracteriza-se por bacilos gram-negativos retos a levemente curvos, aeróbios estritos, e móveis através de flagelos. Elas não fermentam carboidratos nem produzem esporos. Para identificação e diagnóstico são observadas características morfológicas da colônia, produção de pigmentação e realização de testes bioquímicos (FERREIRA, 2005; JÁCOME, 2011).

Para isolamento, são inoculadas em meio de cultura ágar sangue, ou ágar eosina azul de metileno (EMB), ou ainda o de maior especificidade, cetiltrimetil cloreto de amônio (cetimide). Este microrganismo é resistente a compostos de quaternário de amônio. Após crescimento em placa, pode ser observada a formação de coloração azul fenazínico e odor peculiar de uva, devido produção da piocianina. Além deste pigmento, ela é capaz de sintetizar a pioverdina, composto fluorescente que em contato com a piocianina gera uma tonalidade verde brilhante. Também pode produzir, mais raramente, a piorrubina (vermelha) e piomelanina (marrom) (JÁCOME, 2011).

A morfologia da colônia é bastante diversificada, porém a de maior incidência são colônias planas com bordas rugosas e brilho metálico. Nos testes bioquímicos caracteriza-se por fermentação de açúcares negativa, oxidase positiva, citrato positivo, lisina negativa e indol negativo (FERREIRA, 2005; JÁCOME, 2011).

3.5 Patogenicidade e fatores de virulência

A *P. aeruginosa* é considerada um patógeno sobretudo oportunista, pois acomete pessoas debilitadas, raramente provoca doenças em indivíduos saudáveis. Por preferirem ambientes úmidos, as infecções costumam ocorrer em locais com acúmulo de umidade, como queimaduras, orelha externa, cateter e feridas e se singulariza pelo aparecimento de pus azulado com odor de uva (JÁCOME, 2011).

Tem sido bastante notada em infecções graves, levando a agravamentos como sepse, infecções geniturinárias, pneumonias, infecções de pele e mucosas, casos crônicos de otite e infecções respiratórias associadas à fibrose cística (JÁCOME, 2011).

Na fibrose cística o paciente possui ampla disfunção das glândulas exócrinas, manifestando secreções mucosas espessas e viscosas, tornando-o suscetível a desenvolver infecções pulmonares, e a *P. aeruginosa* está entre o patógeno infectante mais comum dessa patologia (GÓMEZ e PRINCE, 2007; GOVAN e DERETIC, 1996; BUENAHORA et al., 2016).

Considerada a mais virulenta dentre as bactérias, a *P. aeruginosa* apresenta uma variedade de fatores de virulência que abrangem as diferentes fases da infecção. Na adesão e colonização bacteriana há o envolvimento de fatores de superfície e adesinas que auxiliam na fixação ao tecido, entre eles, as fímbrias, a membrana externa ligante ao muco, proteína F, lectinas de superfície e o alginato/biofilme são alguns dos mais importantes. Já para a invasão local os elementos que auxiliam no rompimento do epitélio, danificando a integridade celular, podemos citar, as elastases, protease alcalina, fosfolipase C, exoenzima S, neuraminidase, lectina, hemolisinas e exotoxinas A e S (FERREIRA, 2005; JÁCOME, 2011).

Esta bactéria pode causar infecções agudas através da produção de toxinas e crônicas pela formação do biofilme, ou ainda envolver as duas quando produzido ambos os componentes concomitantemente (FERREIRA, 2005).

3.6 Resistência da *P. aeruginosa*

A *P. aeruginosa* é citada como uma das bactérias que mais apresentam resistência à antibioticoterapia. Uma das mais importantes formas de adesão ao tecido, o biofilme, é um dos fatores de virulência da *P. aeruginosa*, e também pode ser considerado uma das causas de sua elevada taxa de resistência. O biofilme é

um conjunto de polissacarídeos composto por polímero de alginato. Apresenta consistência mucoide, uma característica isolada da espécie, e além da capacidade de aderência, desempenha o papel de proteção a exposição de antibióticos e ao reconhecimento do sistema imune (ARDON, et al., 2019 ; FERREIRA, 2005; GOVAN e DERETIC, 1996; JÁCOME, 2011).

As porinas, já citadas anteriormente, também podem ser determinadas como um fator de resistência por essa bactéria, são encontradas diferentes delas em sua membrana externa, entre elas, OprC, OprD, OprH, OprE e OprF cada qual desempenha uma função. A OprF é a mais específica e utilizada pelos β -lactâmicos, a OprD (porina D2) utilizada para a difusão de carbapenêmicos, OprH para Polimixina B, já a OprC e OprE são canais inespecíficos, utilizado por alguns outros antibióticos. A resistência se dá quando há a redução da permeabilidade celular através dessas proteínas, podendo ser pela diminuição de número, tamanho ou afinidade (BAPTISTA, 2013; FERREIRA, 2005; JÁCOME, 2011; NEVES et al., 2011; RIBEIRO e CORTINA, 2016).

Também como um fator de resistência apresentado, temos a “bomba de efluxo”, que nas *P. aeruginosas* pertencem à família RND (*resistance-nodulation-cell division*). Estas caracterizam-se como canais que atravessam as membranas, externa e interna, facilitando a ejeção rápida, ativa e significativa de qualquer substância nociva a sua vida. O reconhecimento dessas substâncias se dá pelas propriedades físico-químicas das mesmas, os antibióticos, por exemplo, são geralmente anfífilos e, portanto, facilmente reconhecidos. Cada bomba tem afinidade por determinado antimicrobiano. Para a *P. aeruginosa* foram caracterizadas quatro, entre elas MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM, conforme Figura 1 (FERREIRA, 2005; JÁCOME, 2011; NEVES et al., 2011):

A inativação enzimática também contabiliza como mais uma causa à resistência da *P. aeruginosa*. As enzimas sintetizadas por elas para esse fim são as β -lactamases, carbapenemases e aminoglicosidases (JÁCOME, 2011).

β -lactamases: determina a resistência a penicilinas, carbapenêmicos e cefalosporinas, reduzindo a sensibilidade das porinas OprD e aumentando a atividade da bomba MexAB-OprM. Benzilpenicilina, ampicilina, meropenem e cefalosporinas de primeira geração (cefalotina, cefazolina, cefalexina e cefadroxila)

tornam-se ineficazes frente à essa enzima (ANVISA, 2018; FERREIRA, 2005; JÁCOME, 2011).

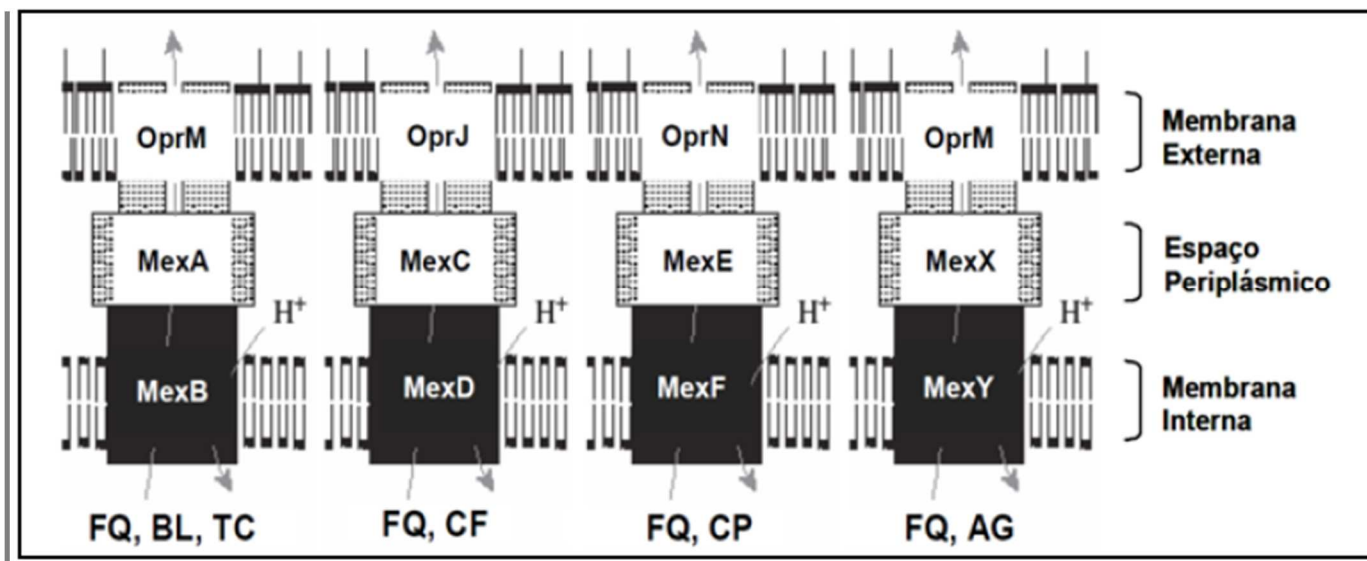


Figura 1 – Modelos estruturais de funcionamento das bombas de efluxo de *P. aeruginosa*, indicando a localização das proteínas constituintes da bomba e ação preferencial a determinados tipos de substratos. FQ: fluoroquinolona; BL: β -lactâmico; TC: tetraciclina; CF: cefalosporina; CP: carbapenêmico; AG: aminoglicosídeo (NEVES et al., 2011).

- **Carbapenemases:** também inativa penicilinas, carbapenêmicos e cefalosporina, porém através da hidrólise do anel β -lactâmico nesses fármacos. São divididas em três classes que se diferenciam pela conformação do sítio ativo: são elas, carbapenemases de classe A, classe B ou metalo- β -lactamase e classe D ou oxacilinase, conforme tabela abaixo (ANVISA, 2018; JÁCOME, 2011):

Tabela 1 – Antibióticos inativados pelas classes das enzimas carbapenemases.

CARBAPENEMASES ANTIBIÓTICOS INATIVADOS	
Classe A	Carbapenêmicos (meropenem e imipenem) e cefamicina
Classe B ou metalo- β -lactamase	Todos os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos) com exceção dos monobactâmicos (aztreonam)
Classe D ou oxacilinase	Cloxacilina, cefalosporinas de espectro estendido (ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima), meropenem e imipenem.

- **aminoglicosidases:** mais especificamente a metilases 16S rRNA, age modificando através de fosforilação ou acetilação a estrutura dos antibióticos amidoglicosídeos, antes que eles consigam se ligar a seu alvo. Entre os medicamentos inativados, estão a gentamicina, tobramicina, amicacina e neomicina (NEVES et al., 2011).

3.6.1 PqsD: 2-heptil-4 (1H) -quinolona sintase

Essa enzima é o fundamental da biossíntese de HHQ (2-heptil-4-hidroxiquinolina) e PQS (Pseudomonas quinolone) que fazem parte do sistema de sinalização, quorum sensing (QS). Esse sistema corresponde à expressão de genes que desenvolvem alguns fatores de virulência, como a piocianina, elastase B, lectina A, ramnolipídeos, e hidrogênio cianeto. Além disso, o PQS é capaz de formar biofilmes, embora o mecanismo de ação não seja claro (HINSBERGER et al., 2014; STORZ et al., 2012; WEIDEL et al., 2013).

Esta enzima está sendo considerada um bom alvo terapêutico para desenvolvimento de novas drogas, pois acredita-se que sua inibição, pode dificultar a comunicação entre a célula, principalmente em relação à produção de fatores de virulência. O que poderia resultar na desativação de alguns deles, deste modo, caso não causar a morte celular bacteriana resultaria em uma menor pressão seletiva e conseqüentemente limitaria a possibilidade de resistência desta bactéria (HINSBERGER et al., 2014; STORZ et al., 2012; WEIDEL et al., 2013).

3.7 Tratamento contra *P. aeruginosa*

Os antibióticos vêm sendo utilizados desde a década de 50 e sua descoberta foi imprescindível para a promoção da saúde da população, diminuindo palpavelmente as taxas de morbidade e mortalidade. Sem eles não conseguiríamos realizar cirurgias e transplantes, ou o tratamento citotóxico do câncer, nem mesmo salvar um bebê nascido prematuramente, sem falar que hospitais se tornariam uma fonte de doenças infecciosas (BRITO e CORDEIRO, 2012; FRANCO et al., 2015; VITERBO DE FARIA, PESSALACIA e DA SILVA, 2016).

Desde a década de 60, a *P. aeruginosa* já era reconhecida por sua resistência natural. De todas as classes de antimicrobianos da época, apresentava sensibilidade apenas à polimixinas. Após a descoberta de novas substâncias, essa bactéria conseguia ser combatida por alguns aminoglicosídeos (gentamicina,

amicacina, tobramicina e metilmicina), carboxipenicilinas e ureidopenicilinas, cefalosporinas (ceftazidima e cefepima), carbapenens (meropenem e imipenem), monobactams (aztreonam) e fluoroquinolonas (ciprofloxacino), porém esses medicamentos também se tornaram ineficazes frente a resistência adquirida por esse microrganismo (ANVISA, 2018; ARAUJO et al., 2010; FERREIRA, 2005).

Ainda hoje, encontrar um tratamento efetivo contra infecções pseudomonais é um desafio, as concentrações capazes de inibir a resistência e tornar-se ativas contra a bactéria são incompatíveis à exposição humana. O que se busca no momento são tratamentos distintos das monoterapias. Alguns estudos apontam a associação entre ceftolozamo e tazobactam como um tratamento eficaz e ainda a utilização de amicacina para diminuir a possibilidade de surgimento de resistência. Entretanto, a terapia continua sendo empírica, tornando-a paliativa e dificilmente erradicada (GOVAN e DERETIC, 1996; NOEL et al., 2018).

A Polimixina B utilizada no combate a bactérias multirresistentes, devido ao aumento da frequência de seu uso por falta de outras opções de tratamento, também já demonstrou-se ineficaz em alguns casos de infecções por *P. aeruginosa*. A capacidade potencial de resistência dessa bactéria revela mais uma vez o resultado do uso intenso indiscriminado desses medicamentos e a necessidade de racionalizar sua utilização (FERREIRA, 2005).

3.8 Novos antibióticos

O aumento de prescrições dos antibióticos “de reserva”, tais como os carbapenêmicos, usados em últimos casos para o tratamento de infecções graves de bactérias resistentes, além da administração de antibióticos de amplo espectro sem mesmo a pré definição de uma infecção, vem tornando essa classe de fármacos cada vez menos potencialmente ativos, limitando as opções de tratamento para as infecções, e com isso a crescente necessidade de desenvolvimento de novos fármacos e novas classes de antibióticos. (BRITO e CORDEIRO, 2012; QUIJADA-MARTÍNEZ et al., 2017; VITERBO DE FARIA, PESSALACIA e DA SILVA, 2016).

Além das *P. aeruginosas*, todos os agentes da ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, e espécies de *Enterobacter*) carecem de novos antibióticos com urgência, no entanto, a indústria farmacêutica não consegue acompanhar a evolução dessa

resistência (BRITO e CORDEIRO, 2012; VITERBO DE FARIA, PESSALACIA e DA SILVA, 2016).

Nos últimos 30 anos a síntese de novos antimicrobianos diminuiu drasticamente, para não se falar em totalidade, somente duas novas classes foram inseridas no quadro dos antibióticos neste período. Em vista disso, destaca-se a importância de investimentos em pesquisas e simultaneamente a conscientização de toda a sociedade dos riscos relacionados ao mau uso de antimicrobianos (BRITO e CORDEIRO, 2012; VITERBO DE FARIA, PESSALACIA e DA SILVA, 2016).

3.9 Modelagem molecular

A modelagem molecular tem se mostrado uma das ferramentas mais importantes na descoberta de novos fármacos. Apesar da evidente utilização para a descoberta de novos fármacos, é também utilizada para otimizar protótipos ou mesmo fármacos já existentes, melhorando propriedades para potencializar a ação, para dar uma nova função biológica, aumentar ou diminuir a seletividade dos alvos ou mesmo para combinar mais de uma atividade. Estas alterações estruturais propostas tem origem em estudos acerca da estrutura molecular através de programas computacionais (WERMUTH, 2008).

A utilização de modelagem molecular permite alcançar uma propriedade intrínseca da molécula que pode impactar diretamente na interação entre o ligante e o receptor alvo, por exemplo, como a densidade eletrônica, momento dipolar, energia dos orbitais de fronteira e polarizabilidade (BARREIRO e RODRIGUES, 1997; WERMUTH, 2008).

3.10 Triagem virtual

A utilização de modelos *in silico* está relacionada a obtenção e/ou análise de dados utilizando um computador ou um programa de computador. Esta prática cresceu bastante nos últimos anos aliada ao crescimento de bancos de dados confiáveis com milhares de compostos com alta diversidade e à disseminação de modelos matemáticos confiáveis por QSAR. Com essas ferramentas, a avaliação do potencial de atividade de um determinado fármaco pode ser realizada para determinação de compostos mais vantajosos para um posterior estudo *in vivo* ou *in vitro* (LEON e MARKEL, 2006; EKINS et al., 2016; WALKER, 2009).

Hoje em dia, a triagem virtual é largamente utilizada para identificação de novos padrões presentes em moléculas com uma determinada atividade e pode ser dividida em dois tipos: ligand-based virtual screening (LBVS) e structure-based virtual screening (SBVS). O primeiro deles, ligand-based virtual screening, é a triagem virtual baseada no ligante, que busca farmacóforos através da similaridade molecular ou QSAR para a escolha de moléculas com bom potencial de se ligarem ao alvo de interesse. O segundo tipo, structure-based virtual screening, é a triagem virtual baseada na estrutura, que tendo como base a estrutura tridimensional do alvo de interesse, seleciona ligantes com boa afinidade química a um determinado sítio da molécula alvo e alta complementariedade estrutural (EKINS et al., 2016; LIONTA et al., 2014).

3.11 Estudos de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR)

A atividade biológica de um fármaco está estreitamente relacionada à sua estrutura molecular. Um fármaco será ativo para um receptor biológico quando a estrutura deste fármaco é capaz de interagir e se ligar à estrutura do receptor biológico, caracterizando a atividade biológica do fármaco. Destas considerações surgiu a expressão “relação estrutura-atividade” e as interações entre fármaco e receptor podem se dar através de diferentes interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, interações de van der Waals, interações eletrostáticas, ligações coordenadas, e outras. Mas nem sempre as estruturas se complementam perfeitamente. Para que isso ocorra, o fármaco deve possuir uma estrutura química que possua geometria molecular complementar à molécula ou macromolécula receptora, como uma enzima, por exemplo. Mas além da geometria molecular, o fármaco deve possuir grupos capazes de interagir com os sítios existentes no receptor. Quanto melhor essa complementariedade química e geométrica, maior a tendência à atividade biológica, que pode ser vista como uma característica físico-química. Assim, a atividade de compostos um reflexo de suas propriedades físico-químicas, que podem ser descritas quantitativamente por descritores ou parâmetros físico químicos adequados (MOTIEJUNAS e WADE, 1994).

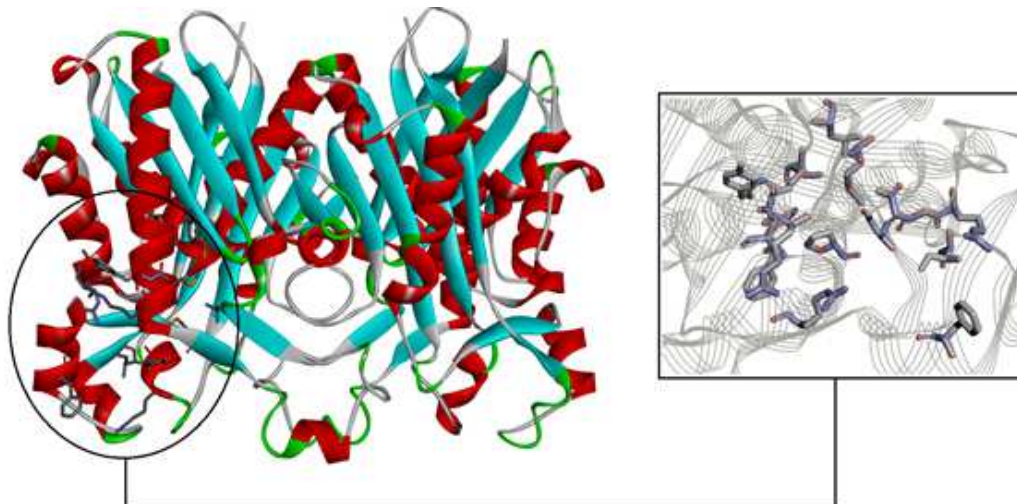
Os estudos de QSAR baseiam-se na hipótese de que modelos matemáticos multivariados podem descrever o comportamento de um grupo de compostos. A partir destes modelos pode-se calcular diversas propriedades físico-químicas com

elevada assertividade, tendo somente a estrutura molecular como base para os cálculos. Entretanto, cada propriedade analisada pode ser descrita por uma grande variedade de modelos matemáticos, e algum desses modelos pode ser bem ajustado para uma determinada classe de molécula sob estudo, enquanto outra classe terá melhor ajuste com um outro modelo, existindo ainda compostos que não se ajustam a modelo algum conhecido até o momento. Considerando uma estrutura molecular, os valores de propriedades quânticas podem ser calculados e estes podem estar associados a propriedades físico-químicas e à atividade de um fármaco. Uma vez conhecida a correlação entre estrutura e a atividade ou propriedade, define-se um modelo matemático a partir do qual pode-se avaliar diversos outros compostos. Estas propriedades quânticas podem ser avaliadas por descritores, que possibilitam a obtenção de características/informações das moléculas, tais descritores podem ser divididos em eletrônicos, topológicos, geométricos e constitucionais (ROY, KAR e DAS, 2015).

Os eletrônicos são derivados das cargas parciais, os topológicos estão relacionados às propriedades físico-químicas, os geométricos são provenientes da estrutura 3D e os constitucionais são obtidos levando em consideração a composição atômica do composto. Dentre eles temos como exemplo, média dos valores absolutos das cargas em todos os átomos, dureza absoluta, diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO, polarizabilidade molecular, momento de dipolo molecular, energia total, energia de ligação, entalpia de formação, potencial de ionização e afinidade eletrônica, índice de conteúdo de informação de ligação, volume molecular, área de superfície polar, peso molecular, número de átomos e ligações, entre inúmeros outros (ROY, KAR e DAS, 2015).

4 CAPÍTULO I

Graphical Abstract



PqsD, an important enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*, a bacterium that causes serious nosocomial infections, and its catalytic site.

IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS NOVOS AGENTES ANTI-*Pseudomonas aeruginosa* UTILIZANDO MÉTODOS *in silico*.

Cristiane Daniel ^{a,*} e Eduardo Borges de Melo ^a

^aCentro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), 85819-110 Cascavel-PR, Brasil.

IDENTIFICATION OF NEW ANTI-*Pseudomonas aeruginosa* AGENTES USING *in silico* METHODS

Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* is the third leading cause of nosocomial infections, affecting mainly patients with immunocompromise and with cystic fibrosis. Considering the need for efficient antibiotic agents against this microorganism, this article presents the results of *in silico* studies that aimed to identify new hit compounds structurally related to a set of 57 derivatives of benzamidobenzoic acid (all active against the enzyme PqsD) that may be useful in the development of these new drugs. In the virtual screening stage, it was possible to identify 12 compounds, and in the subsequent biological activity prediction stage using a 2D-QSAR model, 10 hits fell within the applicability domain and the range of biological activity variation, and it was concluded that this set presents the potential to become prototype compounds after confirmation of activity in experimental tests.

Keywords: Virtual screening; QSAR; Molecular modeling; *Pseudomonas aeruginosa*; PqsD.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas as infecções hospitalares passaram a ser uma grande preocupação. Estima-se que aproximadamente 10 % dos pacientes hospitalizados no mundo adquirem algum tipo de infecção relacionada à assistência à saúde. Nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) esse número é ainda maior, podendo chegar à 35 %.¹ Este problema já se tornou a quarta maior causa de mortes no mundo, ultrapassando os óbitos causados por acidente vascular cerebral (AVC) e infarto.^{2,3}

Geralmente a infecção hospitalar inicial é monomicrobiana, tendo como prevalência as *Enterobacteriaceae*, em sua maioria a *Escherichia coli*. Com o internamento prolongado essas infecções evoluem, envolvendo *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e/ou espécies de *Enterococcus* e *Candida* spp., o que dificulta o tratamento e leva ao desenvolvimento de microrganismos multirresistentes.^{4,5} A resistência surge através de fatores genéticos e, especialmente, mutações, principalmente devido ao uso irracional de antimicrobianos. A capacidade de reprodução acelerada e o surgimento de novas cepas multirresistentes faz com que este cenário se torne cada vez mais preocupante.^{3,6-8}

Neste cenário destacam-se as bactérias gram-negativas, que possuem uma membrana celular sofisticada, muito hidrofóbica e seletiva.^{4,9,10} Dentre estas, a *P. aeruginosa* apresenta a terceira maior frequência de resistência, sendo uma das principais responsáveis pelas infecções hospitalares que acometem imunocomprometidos, assim como pacientes com fibrose cística. Esta alta ocorrência deve-se a uma alta capacidade adaptativa ao ambiente, o que permite sua sobrevivência por longos períodos em equipamentos e utensílios hospitalares. Além disso, diversos fatores de virulência auxiliam neste processo: (i) formação de biofilmes; (ii) presença de porinas que alteram a permeabilidade celular ou bloqueiam a entrada de drogas; (iii) bombas de efluxo que facilitam a ejeção rápida, ativa e significativa de substâncias nocivas a célula; e (iv) presença de enzimas das classes das β -lactamases, carbapenemases e aminoglicosidases.^{2,3,11-16}

A PqsD é uma enzima fundamental da biossíntese de HHQ (2-heptil-4-hidroxiquinolina) e PQS (*Pseudomonas* quinolona), substâncias que fazem parte do sistema de sinalização *quorum sensing* (QS). Esse sistema corresponde à expressão de genes que desenvolvem alguns fatores de virulência, além de auxiliar na formação do biofilme. Esta enzima pode ser considerada um bom alvo para o desenvolvimento de novos agentes

antibióticos, A inibição deste sistema pode, em teoria, dificultar a comunicação entre as células, principalmente em relação à produção de fatores de virulência, podendo resultar na desativação de alguns deles, sem contudo causar a morte celular, o que resultaria em uma menor pressão seletiva, e conseqüentemente limitaria a possibilidade de desenvolvimento de resistência.^{15,17,18}

Neste contexto, este estudo teve como objetivo realizar uma série de estudos *in silico* de modelagem molecular e de relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR: *Quantitative Structure-Activity Relationships*) utilizando um conjunto de dados com 57 derivados do ácido benzamidobenzóico descritos como ativos contra a enzima PqsD, visando identificar novos compostos *hits* potencialmente ativos contra este alvo e, por consequência, que possam ser úteis para darem origem a novos antibióticos úteis para o tratamento de infecções causadas pela *P. aeruginosa*.

PARTE EXPERIMENTAL

Conjunto de dados

O conjunto de dados selecionado para este estudo consistiu em 57 derivados de ácido benzamidobenzóico^{17,18} (Material Suplementar, Tabela S1), que apresentaram capacidade de inibir em pelo menos 50% a PqsD. Os valores das atividades descritas (em μM) foram convertidos para seus respectivos $-\log \text{IC}_{50}$ (ou pIC_{50}), gerando uma faixa logarítmica de 1,56 (4,36 a 5,92) unidades com distribuição tendendo a normalidade.

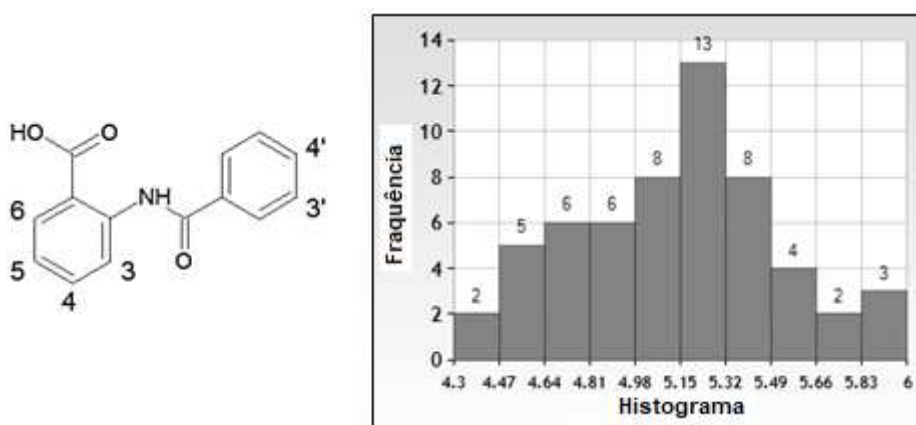


Figura 1. Estrutura básica dos compostos do conjunto de treinamento e histograma de distribuição dos compostos conforme seus valores de pIC_{50} .

As estruturas dos derivados foram construídas no programa HyperChem 7 (Hyper Co.)¹⁹ por modificações de uma estrutura cristalográfica relacionada obtida no Crystallographic Open Database²⁰ (code 2004472). Cada geometria foi otimizada utilizando mecânica molecular (MM+) com ciclos alternados de dinâmica molecular (1 ps, 300 K) até que não houvesse mais variação da energia obtida. Em seguida, utilizando o programa Gaussian 09,²¹ as estruturas foram otimizadas utilizando mecânica quântica, inicialmente ao nível semi-empírico (AM1), seguindo-se por otimizações *ab initio* em Hartree-Fock (HF/6-31Gd,p) e, finalmente, pela Teoria Funcional da Densidade (DFT/B3LYP/6-311G++d,p). As geometrias obtidas foram utilizadas para os estudos realizados nas etapas de triagem virtual²² e de QSAR-2D.²³

Para o estudo QSAR-2D foi necessário dividir o conjunto de dados em dois menores: conjunto de treinamento (para construção dos modelos) e de teste (para a validação externa). Este segundo conjunto foi formado por doze compostos: **4, 8, 11, 17, 23, 27, 29, 38, 40, 46, 48 e 53**, e representa 21% do total do conjunto de dados original. Esta seleção foi realizada considerando o pIC₅₀ real, através da construção de um histograma que expõe a distribuição de frequências das moléculas dentro do intervalo de cada valor de atividade biológica, em faixas logarítmicas de 0,17 unidades. Foram desconsideradas as amostras com menor e maior atividade (primeira e última barras do histograma). Para as demais faixas, foram consideradas compostos aleatórios de cada uma delas.

Triagem virtual

O servidor PharmaGist²⁴ foi utilizado para construção do modelo farmacofórico. Este é utilizado como um modelo em forma 3D para a triagem virtual, e é gerado a partir de grupos ligantes pré-determinados. O derivado mais ativo do conjunto, **25**, foi selecionado como a molécula referência, pois se considera que este apresenta as propriedades geométricas de maior interesse para presença de atividade. Para a escolha do melhor modelo foi avaliada a pontuação obtida para cada score e a presença das características similares às interações do ácido benzamidobenzóico com a enzima PqsD.

O modelo farmacofórico obtido foi utilizado para realizar a triagem virtual no programa Pharnit,²⁵ que disponibiliza um grande banco de dados composto por diferentes bibliotecas (ZINC, NCI Database, PubChem e MCule). Este servidor também permite o uso de diversos filtros moleculares para auxiliar a reduzir a dimensão dos dados. Durante o processo, os valores destas propriedades foram otimizados para as seguintes faixas: (i) 300 a 350 para o peso molecular; (ii) número de ligações rotacionáveis ≤ 7 ; (iii) $\log P \leq 5$; número

de grupos aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) ≤ 8 ; e (iv) número de grupos doadores de ligações de hidrogênio (HBD) ≤ 4 . Estes valores foram definidos pelos autores, mas tendo como ponto de partida sugestões da literatura.^{26,27} Como complemento, uma nova redução pós-triagem foi realizada, inicialmente por remoção dos compostos duplicados e, na sequência, foram removidos aqueles potencialmente tóxicos. Para este último passo, foi utilizado o programa VEGA QSAR²⁸ para predição do potencial mutagênico e a carcinogênico de cada composto.

O conjunto reduzido foi avaliado por ancoramento molecular de cada composto no sítio de ligação da PqsD, formado principalmente pelos resíduos Phe32, Cys112, Arg153, Asn154, Ile157, Leu193, Met220, Arg223, Met225, Phe226, His257, Pro259, Arg262, Asn287, Ala289 e Tyr315. O uso desta abordagem visou selecionar dentre aqueles obtidos na triagem baseada em ligante que apresentassem maior afinidade pelo alvo de interesse e, conseqüentemente, apresentem maior probabilidade de apresentar atividade biológica em futuros ensaios *in vitro*. A estrutura tridimensional da PqsD sem mutações (PDB 3H76, Figura 2) foi obtida no Protein Data Bank.²⁹ Como esta estrutura não possui ligante co-cristalizado no sítio de ligação, o mesmo foi definido com base em dados provenientes do PDB 3H78 (mutante C112A), que apresenta o ácido antranílico co-cristalizado.

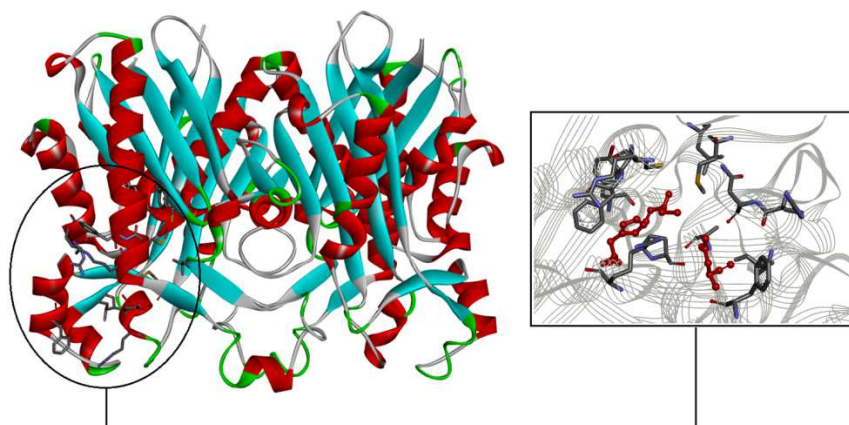


Figura 2. Estrutura tridimensional da PqsD (PDB 3H76), subunidades A e B, com destaque para o sítio de ligação da subunidade A. A tríade catalítica (resíduos Cys112 e His257 e Asn87) está destacada em vermelho.

A preparação da enzima e dos ligantes, assim como parte da etapa de pós-análise, foram realizadas no programa Discovery Studio Visualizer 17.2,³⁰ enquanto o estudo de ancoramento foi realizado utilizando o programa Autodock Vina,³¹ através da interface PyRx.³² Uma caixa virtual com dimensões de 20x20x20 Angstrom delimitou o sítio de ligação utilizando como referência o resíduo Ala289. Este método foi validado pelo

ancoramento do ácido antranílico, visando identificar uma ligação semelhante àquela observada em PDB 3H78. A interpretação dos resultados foi realizada pela construção de um complexo entre o sítio ativo da enzima e as melhores poses de cada composto utilizando o programa PyMol³³ para gerar um arquivo com o ancoramento das estruturas na respectiva cavidade de ligação.

Estudo QSAR-2D

Para o estudo QSAR-2D, inicialmente foram calculados os descritores moleculares, representações numéricas mensuráveis das propriedades físico-químicas dos compostos em estudo, visando uma consequente avaliação da presença de correlação multivariada entre eles e a variáveis dependente (pIC₅₀) em estudo. Deste modo, ainda no programa Gaussian 09 foram obtidos os seguintes descritores eletrônicos: cargas parciais (Q) dos átomos da estrutura básica calculadas pela teoria *Natural Bond Orders* (NBO), energia total (ET), momento dipolar total (D) e seus componentes nos eixos x (D_x), y (D_y) e z (D_z), e as energias dos orbitais moleculares de valência ocupados e desocupados (E_{HOMO-1} , E_{HOMO} , E_{LUMO} , E_{LUMO+1}). Com base nos valores das energias dos orbitais moleculares, foram utilizadas as equações descritas por Todeschini e Consonni³⁴ para obter outros dez descritores relacionados a reatividade molecular: diferença de energia entre E_{HOMO} e E_{LUMO} (GAP), índice de energia de ativação (AEI), fração da energia HOMO/LUMO ($f_{H/L}$), dureza (n) e moleza (S) moleculares, potencial de ionização (IP), afinidade eletrônica (EA), índice de eletrofilia no estado fundamental, ($IEEF$), eletrofilicidade ($ELETROF$) e eletronegatividade molecular ($ELETRON$).

As geometrias otimizadas também foram utilizadas como dados de entrada para obtenção de diversas classes de descritores constitucionais, topológicos, geométricos e moleculares no programa Dragon 6.³⁵ Neste mesmo programa foi realizada a primeira etapa de redução de variáveis, visando remover: (i) descritores de baixa relevância, com valores constantes ou quase constantes; (ii) descritores com alto grau de correlação entre si ($r < 0,9$), onde um deles é eliminado de modo arbitrário pelo algoritmo; e (iii) variáveis com desvio padrão menor que 0,001, pois considerou-se que neste caso não haveria informação relevante para uso em modelo. No final desta etapa, foi obtida uma matriz com 380 descritores.

Uma última etapa de redução de variáveis foi realizada no programa gratuito QSAR Modeling³⁶ (download: <http://lqta.iqm.unicamp.br>), ainda com o objetivo de eliminar do estudo outras variáveis que, mesmo tendo persistido após as etapas anteriores de filtragem, também não apresentassem informação relevante suficiente para compor bons modelos.

Assim, foram eliminados da matriz descritores com $|r|$ com pIC_{50} menores que 0,2, originando uma matriz com 256 descritores. Esta matriz foi submetida ao processo de Seleção de Preditores Ordenados (OPS),³⁷ um método de seleção de variáveis que utiliza regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) para definir a importância de cada descritor na totalidade do conjunto, para na sequência eliminar os de menor significância. Este método de regressão também foi utilizado para construção dos modelos. Tanto para a seleção de variáveis quanto para a construção dos modelos os descritores foram autoescalados: cada valor teve subtraído o valor médio do descritor correspondente, e o resultado foi dividido pelo desvio padrão também do descritor. Com isto, todas as colunas da matriz passam a apresentar média 1 e desvio-padrão igual a zero. Este processo, o mais comum para estudos QSAR, deve ser realizado porque o conjunto de dados geralmente consiste em variáveis com diferentes unidades e grandes faixas de variação. Assim, evita-se influência dos descritores que apresentam ordens de valores maiores sobre aqueles menores transformando todos na mesma escala de variação numérica, porém sem perder informação.³⁸

Os modelos obtidos foram submetidos a validações interna e externa. A primeira etapa visa testar o poder de previsão de modelos para os mesmos compostos utilizados em sua construção, conjunto este denominado conjunto de treinamento. Já a validação externa avalia o modelo obtido e já aprovado na validação interna em prever a atividade de um conjunto de amostras que não foram utilizados na construção do mesmo, sendo este geralmente um subconjunto menor do conjunto de dados selecionado para o estudo.^{38,39}

A validação interna foi realizada para o conjunto de treinamento, através da obtenção dos seguintes parâmetros estatísticos: (i) coeficiente de determinação múltipla (R^2); (ii) erro quadrático médio de calibração ($RMSEC$); (iii) significância da regressão, através do teste F ($\alpha=0,05$); (iv) coeficiente de determinação da validação cruzada *leave-one-out* (Q^2_{LOO}); (v) erro quadrático médio da validação cruzada ($RMSECV$); (vi) estatísticas *RmSquare*; (vii) validação cruzada *leave-N-out* (LNO); e (viii) randomização do vetor y (ou *y-randomization*). Os cálculos dos parâmetros estatísticos adotados nesta etapa de validação foram realizados através do software QSAR Modeling, e manualmente no caso do Teste F . Já para a validação externa, o conjunto teste foi empregado para avaliar o potencial de predição da atividade biológica para compostos não utilizados na construção do modelo. A qualidade de previsão foi avaliada através dos parâmetros: (i) coeficiente de determinação da validação externa (R^2_{pred}); (ii) erro quadrático médio da validação externa ($RMSEP$); (iii) as estatísticas de Golbraikh e Tropsha (k , k' , $|R^2_0 - R'^2_0|$);⁴⁰ e (iv) as métricas *RmSquare*

aplicadas à validação externa (Average $r^2_{\text{m}}(\text{pred})$ -scaled e $\Delta r^2_{\text{m}}(\text{pred})$ -scaled).⁴¹ Estes parâmetros foram calculados utilizando o programa gratuito *Xternal Validation* 1.0.⁴²

O modelo obtido foi usado para previsão da atividade dos compostos *hits* selecionados na etapa de triagem virtual. Porém, considerando diferenças estruturais presentes entre os compostos selecionados e os que foram usados para construção do modelo, foi necessário verificar se estes compostos se adequavam ao domínio de aplicabilidade. Este pode ser definido como uma região teórica no espaço químico que abrange tanto os descritores do modelo quanto a resposta modelada que permite estimar a incerteza na predição de um composto particular com base em quão semelhante é aos compostos de treinamento empregados no desenvolvimento do modelo definido como o espaço químico.⁴³ Para esta viabilizar esta medida, foi utilizado o programa *Euclidean Applicabilty Domain* 1.0.⁴⁴

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Triagem virtual

O melhor modelo farmacofórico obtido no PharmaGist é apresentado na Figura 3. Este modelo apresentou um escore de 82,082 em relação a molécula referência e é formado por 8 grupos farmacofóricos que descrevem a estrutura básica dos compostos estudados: duas regiões aromáticas, uma correspondente ao um grupo carregado negativamente (ânion), três grupos aceptores de ligação de hidrogênio e um grupo doador de ligação de hidrogênio.

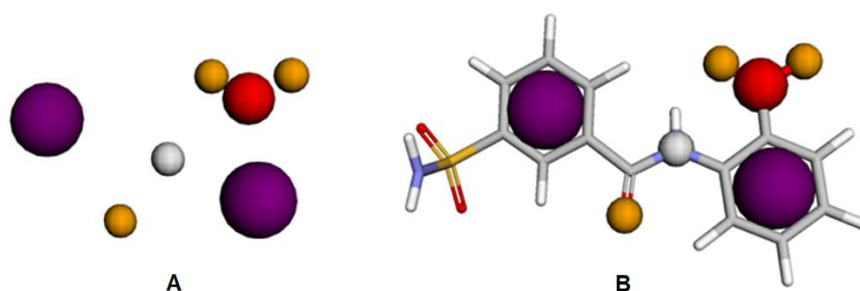


Figura 3. A. Modelo farmacofórico selecionado. Roxo: grupo aromático; vermelho: grupo íon negativo; amarelo: grupo aceptor de ligação de hidrogênio; branco: grupo doador de ligação de hidrogênio. B. Representação do farmacóforo sobre a molécula referência do estudo (25), a mais potente do conjunto de dados.

A triagem realizada com base neste farmacóforo, utilizando filtros moleculares para redução do tamanho do conjunto, resultou em 7.000 compostos *hits* (já com as duplicatas removidas). Na sequência, a avaliação da toxicidade *in silico* no programa VEGA QSAR

mostrou que a grande maioria destes compostos apresentava algum grau de potencial para causar efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Assim, o conjunto final foi de apenas 12 compostos *hits* (Figura 4).

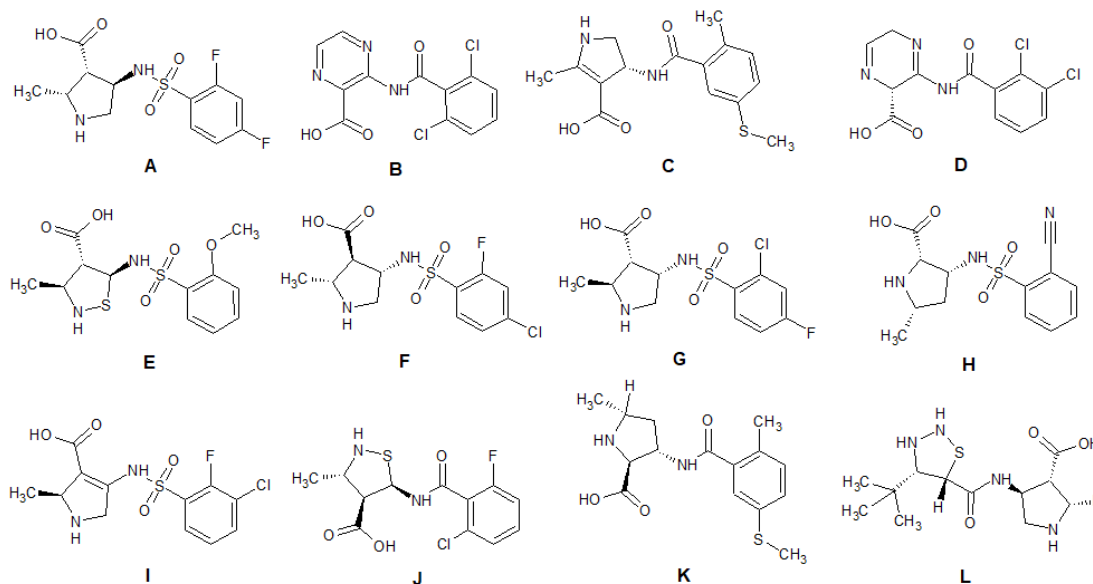


Figura 4. Compostos selecionados através de triagem baseada em ligante utilizando modelo farmacofórico selecionado e os processos de redução do conjunto de dados baseado em propriedades físico-químicas e toxicológicas.

Como esperado, todos os compostos apresentam um bom grau de similaridade estrutural com o conjunto de dados utilizado, em especial com uma ponte amida ou sulfonamida ligando os dois grupos cíclicos, sendo um destes grupos sempre aromático (com exceção do composto **L**). Um resultado similar era esperado, já que o farmacóforo (Figura 3) apresenta pontos que fazem uma boa descrição da estrutura básica de interesse (Figura 1). Apesar do pequeno número, os *hits* selecionados foram avaliados por ancoramento molecular. Os resultados são apresentados na Tabela 1, na Figura 5, e no material suplementar, Figuras S1 e S2. É interessante observar que, apesar de nenhum dos compostos selecionados apresentarem uma afinidade pelo sítio de ligação maior do que o composto **25** (7,3 kcal/mol) ou menor que o composto menos ativo do conjunto, **22** (0,3 kcal/mol), todos os compostos apresentam ligação com os Cys112 e His257, e a maioria apresentou ligação com Asn287. Estes resíduos formam a tríade catalítica da PqsD,⁴⁵ e a interação com os mesmos aumenta as chances de um compostos apresentar algum grau de inibição contra o alvo em estudo, sendo que futuros estudos de otimização estrutural podem auxiliar no aprimoramento da potência destes compostos.

Tabela 1. Resultados gerais dos estudos de ancoramento molecular com o conjunto <i>hit</i>													
Aminoácido	Resíduo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
LEU	81												
CYS	112*												
LEU	142												
LEU	155												
LEU	158												
LEU	159												
LEU	193												
PHE	218												
MET	220												
MET	225												
HIS	257*												
PRO	259												
ASN	260												
ASN	287*												
ALA	289												
TYR	315												
GLY	316												
SER	317												
Energia de interação (Kcal/mol)		6,2	5,2	3,3	6,7	6,3	5,8	6,6	5,9	6,2	6,5	5,8	3,8
Tipos de interações**	<i>pi-cation</i>	<i>pi-pi t-shaped</i>	<i>carbon hydrogen bond</i>	<i>conventional hydrogen bond</i>	<i>alkyl</i>	<i>halogen (fluorine)</i>	<i>pi-sigma</i>	<i>pi-donor hydrogen bond</i>					
	<i>pi-sulfur</i>	<i>pi-pi stacked</i>											

*Tríade catalítica; ** as definições foram mantidas como apresentadas pelo *Discovery Studio Visualizer 17.2*

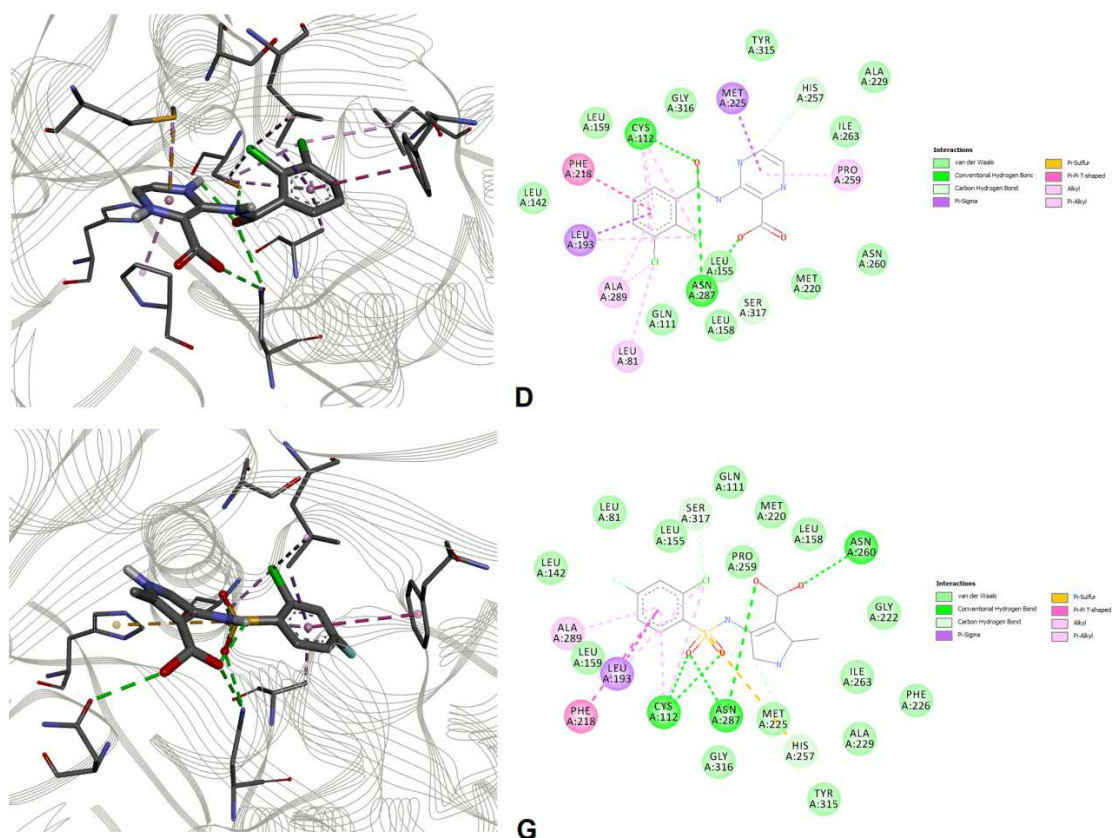


Figura 5. Resultados do ancoramento molecular (representações 2D e 3D) dos compostos hits **D** e **G**, que apresentaram as maiores afinidades de ligação com o sítio de ligação da PqsD (PDB 3H76). Figura construída no Discovery Studio Visualizer 17.2.

O resíduo Cys112 é considerado de alta relevância para a atividade catalítica da PqsD. A interação com este resíduo ocorre com um oxigênio dos grupos amida ou sulfonamida, de forma semelhante ao que ocorre com o substrato para a produção de HHQ. A interação com os resíduos Phe218 e Leu81, 142, 155, 159 e 193 também foi muito observada para os compostos ancorados, graças ao grupo aromático presente na maioria dos *hits*, com exceção do composto **J**, o explica o motivo deste *hit* ser aquele com menor energia de interação entre os 12 selecionados. Realmente existem dados que indicam que a manutenção de grupos aromáticos favorece a atividade inibitória, levando a resultados mais vantajosos do que quando estão presentes os anéis tiofeno e furano.⁴⁶

Outra interação que se mostra importante é a ligação hidrogênio entre a hidroxila, também presente na maioria dos compostos, e Asn287. Estudos prévios realmente indicaram que a introdução desta função química leva a um aumento da inibição devido a formação de mais ligações hidrogênio com os resíduos de aminoácidos no sítio de ligação. Antranilatos que tiveram a adição de um grupo cloro na posição 3 apresentaram uma melhora na atividade

inibitória da PqsD,¹⁸ enquanto os compostos ancorados com a presença de cloro em sua estrutura apresentaram maior energia de interação (Figura 5).

Estudo QSAR-2D

Utilizando a seleção de variáveis com o algoritmo OPS, foi possível obter um modelo com 42 compostos (três compostos, **18**, **20** e **52**) foram identificados como *outliers* e removidos do conjunto) e oito descritores moleculares que originaram três variáveis latentes (LVs), que acumularam 48,776% de informação (LV1: 19,238%; LV2: 19,625%; LV3: 9,913%).

$$pIC_{50} = -1.916 + 0.650x(\text{SM05_AEA(dm)}) + 0.009x(\text{RDF150s}) + 4.038x(\text{GATS1s}) + 0.539x(\text{R6m}) + 0.306x(\text{CATS2D_04_DA}) + 0.989x(\text{SpMax5_Bh(m)}) - 0.059x(\text{F10[C-N]})$$

Os resultados das análises estatísticas, tanto da validação interna quanto externa ($n_{\text{test}} = 12$), são apresentados na Tabela 2. Os valores dos descritores selecionados para todos os compostos do conjunto de dados (incluindo conjunto de treinamento e outliers) estão disponíveis no Material Suplementar, Tabela S2. É possível observar que o modelo obtido é capaz de explicar e prever informação acima dos parâmetros mínimos exigidos pela literatura. Considerando os valores obtidos para R^2 e Q^2_{LOO} , pode-se dizer que o modelo pode explicar 82% e prever 72,7% de informação de modo confiável. Isto é fortalecido quando associamos esta conclusão ao alto valor para o teste F obtido, muito acima do seu valor crítico tabelado (2,852, para $p=3$ e $n-p-1= 38$). A diferença entre os valores de R^2 e Q^2_{LOO} de apenas 0,092, muito abaixo do limite de 0,3, indica que os dados não se apresentam sobreajustados.^{38,47} Finalmente, os resultados obtidos para os parâmetros $\Delta r^2_m(\text{LOO})\text{-scaled}$ (0,085) e $\text{Average}_r^2_m(\text{LOO})\text{-scaled}$ (0,637) indicam que as atividades previstas estão realmente próximas aos valores observados, ou seja, equação realmente consegue representar a previsão interna.⁴⁸

	Parâmetros	Modelo	Especificação
	n	42	
Validação	R^2	0,820	≥ 0.6
	$RMSEC$	0,156	Menor possível
	F ($\alpha = 0,05$)	57,608	Maior que F tabelado
	Q^2_{LOO}	0,727	≥ 0.5

Validação Externa	$RMSECV$	0,183	Menor possível
	$Average r^2_m(LOO)\text{-scaled}$	0,637	≥ 0.5
	$\Delta r^2_m(LOO)\text{-scaled}$	0,085	≤ 0.2
	$R^2 - Q^2_{LOO}$	0,093	≤ 0.3
	R^2_{pred}	0,636	≥ 0.6
	$RMSEP$	0,207	Menor possível
	k	0,986	$0.85 \leq k \leq 1.15$
	k'	1,013	$0.85 \leq k \leq 1.15$
	$ R^2_0 - R'^2_0 $	0,038	≤ 0.3
	$Average r^2_m(LOO)\text{-scaled}$	0,633	≥ 0.5
$\Delta r^2_m(LOO)\text{-scaled}$	0,043	≤ 0.2	

Na Figura 6 é possível verificar que o modelo, considerando sua qualidade interna, também é robusto e não apresenta correlações espúrias, e por isso os resultados que forem preditos por este modelo apresentam uma mínima confiabilidade para possível reprodução dos valores em testes experimentais. Na Figura 6A percebe-se uma boa estabilidade dos valores médios de cada ponto variam próximo do de Q^2_{LOO} , com uma média geral (Q^2_{LNO}) de 0,711, apenas 0.016 unidades. O maior desvio obtido foi para Q^2_{L70} (0,675).⁴² Já o resultado da randomização do y (Figura 6B) mostra a má qualidade dos modelos resultantes da aleatorização do vetor y quando comparado com o modelo original, o que é resultado desejado neste caso. A literatura traz valores recomendados de $R^2 < 0.3$ e $Q^2_{LOO} < 0.05$ para os interceptos de modelos de regressão baseados nestes resultados, o que indica que a variância observada no modelo não resulta de correlação casual.^{36,38,48}

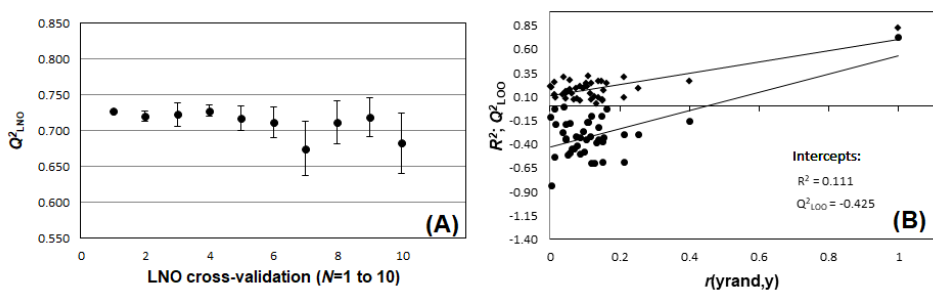


Figura 6. Resultados dos testes de robustez leave-N-out (LNO) (A) e correlação ao acaso (B).

Os resultados obtidos na validação externa (Tabela 2) demonstram aproximação das atividades biológicas real e predita, o que permite acreditar que o modelo é confiável em suas previsões, além de que seus parâmetros se enquadram aos limites estabelecidos. O modelo indica possuir uma boa capacidade de predição de informação externa (63,6%). Ou seja, compostos que sejam representados pelo espaço químico deste modelo possuem esta

chance de terem a atividade predita com sucesso. Tanto os valores de k quanto k' estão distantes dos limites, portanto próximos ao ideal ($k= 1$), da mesma forma que o valor do módulo da diferença entre os coeficientes de determinação centrados na origem, que apresentou valor muito abaixo do limite. Finalmente, os valores obtidos para de $Average_r^2_m(pred)-scaled$, e $\Delta_r^2_m(pred)-scaled$ ajudam na confirmação da capacidade de predição externa do modelo obtido.^{36,40,49}

O número de descritores não é um problema quando é utilizada a regressão por PLS, já que este método é baseado em LVs, onde cada descritor indicado retrata diferentes informações (Tabela 3) para cada uma destas novas variáveis. Estas também são mutuamente ortogonais entre si, o que elimina um problema clássico da regressão linear múltipla (MLR), que é o efeito de alta correlação entre dois descritores em um modelo, o que pode levar a modelos tendenciosos e com risco de sobreajuste de dados. O PLS avalia os dados de forma que os redimensiona para reduzir suas diferenças, incluindo a atividade biológica como forma de aumentar a covariância desta com os descritores.⁴⁹ Por fim, o uso dos descritores autoescalados também auxilia na interpretação do modelo, pois como deste modo os coeficientes apresentam-se na mesma escala, é possível dizer quais são as variáveis que apresentam uma maior ou menor influência na atividade predita, quando consideramos seus valores absolutos. Neste estudo, esta ordem mostrou-se como SM05_AEA(dm) (0.555) > GATS1s (0.399) > RDF150s (0.306) > SpMax5_Bh(m) (0.277) > R6m (0.212) > CATS2D_04_DA (0.186) > F10[C-N] (-0.150). Na Tabela 3 são apresentados os significados de cada descritor. Observa-se que, segundo o modelo, a atividade contra a PqsD é definida por propriedades topológicas (SM05_AEA(dm), CATS2D_04_DA, F10[C-N], R6m e SpMax5_Bh(m)), com menor dependência de propriedades geométricas (RDF150s e GATS1s).

Tabela 3. Definições dos descritores selecionados		
Símbolo	Descritor	Classe
SM05_AEA(dm)	<i>Spectral moment of order 5 from augmented edge adjacency mat. weighted by dipole moment</i>	<i>Edge adjacency indices</i>
RDF150s	<i>Radial Distribution Function - 150 / weighted by I-state</i>	<i>RDF descriptors</i>
GATS1s	<i>Geary autocorrelation of lag 1 weighted by I-state</i>	<i>2D autocorrelations</i>
R6m	<i>R autocorrelation of lag 6 / weighted by mass</i>	<i>GETAWAY descriptors</i>
CATS2D_04_DA	<i>CATS2D Donor-Acceptor at lag 04</i>	<i>CATS2D descriptors</i>
SpMax5_Bh(m)	<i>Largest eigenvalue n. 5 of Burden matrix weighted by mass</i>	<i>Burden eigenvalues</i>
F10[C-N]	<i>C-N frequency at topological distance 10</i>	<i>2D atoms pairs</i>

Previsão de atividade

O modelo QSAR foi utilizado para predição da atividade em potencial dos 12 *hits* obtidos. Para isto, as geometrias obtidas nos bancos de dados foram otimizadas pela mesma metodologia utilizada com o conjunto de dados, e na sequência os descritores selecionados foram obtidos no Dragon 6. Os valores correspondentes e os respectivos pIC_{50} preditos estão disponíveis na Tabela 4. Com os valores dos descritores, foi possível calcular o domínio de aplicabilidade Euclidiano do modelo. Esta abordagem é baseada na verificação do grau de semelhança estrutural dos compostos em teste em relação aos utilizados para a construção do modelo real, através dos descritores moleculares, sem necessidade de uso de valores de atividade biológica para comparação.⁴³ Assim, este método é adequado para o problema em análise. A Figura 7 apresenta os resultados deste teste, e é possível verificar que dois *hits* (**E** e **J**) encontram-se fora do domínio, com distâncias médias normalizadas acima do limite de 1 (2,242 e 1,121, respectivamente). Este fato provavelmente é explicado pelos valores do descritor RDF150s, que encontram-se em uma faixa muito acima da média dos valores para os compostos que formam o conjunto de treinamento (7,88). Este motivo pode-se dever a presença do anel tiazolidina em ambos os *hits*, sendo os únicos onde isso ocorre. Como complemento, o valor predito para o composto **E** também encontra-se fora da faixa de variação da atividade biológica, o pode ser considerado extrapolação. Sendo assim, a previsão para estes dois compostos, em especial **E**, não pode ser considerada confiável.

<i>Hit</i>	Descritores moleculares							pIC_{50} predito
	SM05_AEA(dm)	RDF150s	GATS1s	R6m	CATS2D_04_DA	SpMax5_Bh(m)	F10[C-N]	
A	0.618	0	0.681	0.423	1	3.34	1	5.014
B	1	0.002	0.667	0.341	1	3.34	2	5.102
C	0.618	2.363	0.653	0.306	1	3.324	3	4.725
D	1	23.636	0.669	0.286	1	3.341	1	5.354
E	1.092	88.735	0.705	0.306	1	3.343	1	6.157
F	1	0	0.646	0.316	1	3.236	1	4.960
G	1	0.189	0.668	0.45	1	3.273	3	5.042
H	1	5.812	0.699	0.26	2	3.254	1	5.520
I	1	9.782	0.681	0.231	1	3.274	0	5.240
J	1	50.638	0.66	0.375	1	3.254	0	5.581
K	1	6.153	0.681	0.283	1	3.273	0	5.235
L	0.73	0.747	0.668	0.24	1	3.188	0	4.851

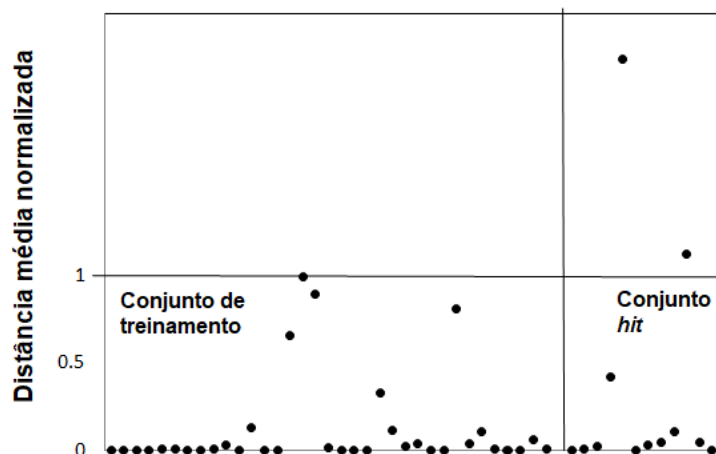


Figura 7. Domínio de aplicabilidade Euclideano obtido.

Considerados os 10 *hits* restantes (83,3% do conjunto), é interessante observar que, assim como no estudo de ancoramento molecular, todos apresentam valores preditos dentro da faixa linear de atividade e encontram-se dentro do domínio de aplicabilidade. Se compararmos com os valores de ΔG obtidos no estudo de ancoramento molecular, nenhum deles supera o valor do composto mais ativo do conjunto de treinamento (**25**) da mesma forma que ocorre com as energias de ligação obtidas. Além disso, é possível observar a presença de um bom grau de relação entre aumento da atividade predita e aumento do ΔG de ligação (Figura 8). Deste modo, ambos os estudos corroboram-se, fortalecendo a possibilidade de os compostos selecionados poderem apresentar uma atividade real dentro da faixa de pIC_{50} de 4,36 a 5,92 unidades logarítmicas.

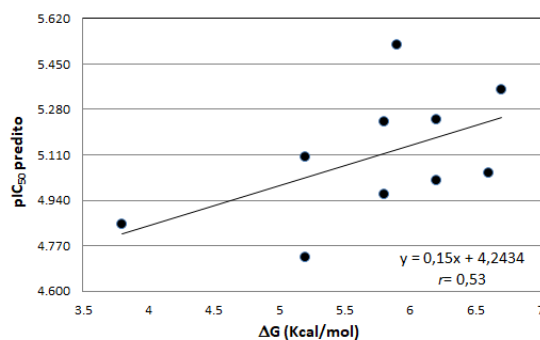


Figura 8. Tendência linear observada entre ΔG de ligação e a atividade predita dos 10 compostos *hits* localizados dentro do domínio de aplicabilidade.

CONCLUSÃO

Utilizando métodos de planejamento de fármacos auxiliado por computador baseados tanto no alvo biológico (*structure-based*) quanto em inibidores testados experimentalmente (*ligand-based*), foi possível utilizar um conjunto de derivados do ácido benzamidobenzóico para identificar dez interessantes compostos *hits*. Estes compostos, apesar de apresentarem características farmacofóricas semelhantes ao conjunto de dados, nunca antes haviam sido descritos como potenciais agentes antibióticos, em especial contra a *P. aeruginosa*. Utilizando um modelo de QSAR-2D adequadamente validado, estes compostos apresentaram previsões dentro da faixa de variação de atividade do conjunto de dados e foram classificados no domínio de aplicabilidade do modelo. Além disso, os de pIC₅₀ preditos apresentaram um bom grau de correlação com os valores de ΔG obtidos na etapa de ancoramento molecular para os mesmos compostos, e assim as duas etapas não se contrariam. Neste contexto, os *hits* selecionados mostram-se como potenciais futuros compostos-protótipos úteis para o planejamento de novos inibidores da PqsD de *P. aeruginosa*, passo inicial para o desenvolvimento de novos agentes antibióticos úteis para o tratamento de pacientes acometidos por infecções causadas por este microrganismo.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Encontram-se disponíveis no material suplementar: (i) tabela com as estruturas, atividades reais e preditas nas validações interna e externa do conjunto de dados original; (ii) tabela com os valores dos descritores moleculares selecionados para construção do modelo 2D-QSAR; e (iii) figuras das estruturas *hits* ancoradas no sítio de ligação da 3H76 (exceto compostos **D** e **G**). Estes dados estão disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Araucária, ao CNPq (pela bolsa produtividade de E.B. de Melo), a CAPES (pelo programa PROAP) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIOESTE.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho apresentou resultados de estudos de QSAR-2D para um conjunto de derivados do ácido benzamidobenzóico com capacidade de inibição *in vitro* da atividade da enzima PqsD da *P. aeruginosa*. O modelo obtido no estudo QSAR foi aprovado nos testes de validação, tanto interna quanto externamente, indicando capacidade confiável de predição e robustez, já que a atividade predita se aproximou consideravelmente da atividade real no conjunto teste, também mostrando-se significativo, e que não possui correlação ao acaso,

Quanto a triagem virtual, foi possível obter uma quantidade considerável de compostos com o modelo farmacofórico definido, e após a filtragem levando em consideração as suas toxicidades *in silico*, foram alcançados 12 compostos. Destes todos apresentaram um bom grau de similaridade estrutural com o conjunto de dados utilizado e afinidade pelo sítio de ligação da enzima, confirmada através do estudo de ancoramento molecular.

Por fim, os *hits* obtidos se mostram promissores compostos-protótipos para o planejamento de novos inibidores da PqsD de *P. aeruginosa*, passo inicial para o desenvolvimento de novos agentes antibióticos úteis para o tratamento de pacientes acometidos por infecções causadas por este microrganismo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como recomendação para trabalhos futuros, se dá a aquisição destes compostos promissores, para análise *in vitro* e a confirmação de suas atividades antimicrobianas, tendo em vista a necessidade de avaliação de sua capacidade inibitória para com a enzima PqsD.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.1 Fundamentação teórica

ARAÚJO, M. Q., et al. Perfil de resistência bacteriana em fômites de UTI em hospital público do estado do Tocantins. **Revista Cereus**, Gurupi, v. 9, n. 2, p. 126–141, 2010.

ARDON, C. B. et al. Biofilm production and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from Hidradenitis Suppurativa lesions. **Jornal da Academia Europeia de Dermatologia e Venereologia**, Copenhagen, v. 33, n. 1, p. 170-177, 2018.

ASCOM/ANVISA. Quer se proteger da infecção hospitalar? Leia isto. Brasília, 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/quer-se-proteger-da-infeccao-hospitalar-leia-isto>>. Acesso em: Ago 2018.

BAPTISTA, M. G. D. F. M. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. Lisboa, p.51. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias da Saúde).

BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 1–11, 1997.

BASSETTI, M.; GINOCCHIO, F.; MIKULSKA, M. New treatment options against gram-negative organisms. **Critical care**, London, v. 15, p. 215, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de vigilância Sanitária. ANTIMICROBIANOS - BASES TEÓRICAS E USO CLÍNICO. Brasília: Ministério da saúde. 2018. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/ops_web/modulo1/cefaloporinas8.htm>. Acesso em: Ago 2018.

BRASIL. Agência Nacional de vigilância Sanitária. PORTARIA Nº 2.616, DE 12 DE MAIO DE 1998. Brasília, 1998. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/item/portaria-n-2-616-de-12-de-maio-de-1998>>. Acesso em: Ago 2018

BRITO, M. A. De; CORDEIRO, B. C. Necessidade de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 4, p. 247–249, 2012.

BUENAHORA, R. D. et al. *Acinetobacter baumannii*: patógeno multirresistente emergente. **Méd.UIS**, Santander, v. 29, n. 2, p. 113–135, 2016.

CHIU, S. N. et al. Severe bacterial infection in patients with heterotaxy syndrome. **Journal of Pediatrics**, Taiwan, v. 164, n. 1, p. 99–104, 2014.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, Houston, v. 1794, n. 5, p. 808–816, 2009.

EKINS, S. et al. Illustrating and homology modeling the proteins of the Zika virus. **F1000Research**, North Carolina, p. 5-275, 2016.

FERREIRA, L. L. Estrutura clonal e multirresistência em pseudomonas aeruginosa. Rio de Janeiro, p. 114. 2005. Dissertação (Vigilância Sanitária Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz).

FLORES-MEIRELES, A. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature reviews Microbiology**, Washington, v. 13, n. 5, p. 269–284, 2015.

FRANCO, J. M. P. L. et al. O papel do farmacêutico frente à resistência bacteriana ocasionada pelo uso irracional de antimicrobianos. **Rev e-ciência**, Fortaleza, v. 3, n. 2, p. 57–65, 2015.

GÓMEZ, M. I.; PRINCE, A. Opportunistic infections in lung disease: Pseudomonas infections in cystic fibrosis. **Current Opinion in Pharmacology**, New York, v. 7, n. 3, p. 244–251, 2007.

GOVAN, J. R. W.; DERETIC, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia. **Microbiological reviews**, San Antonio, v. 60, n. 3, p. 539–574, 1996.

HAKKI, M. et al. Invasive Pseudomonas aeruginosa infections: High rate of recurrence and mortality after hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, Seattle, v. 39, n. 11, p. 687–693, 2007.

HINSBERGER, S. et al. Benzamidobenzoic acids as potent PqsD inhibitors for the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 76, p. 343–351, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.014>>

JACOBSEN, S. M. et al. Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to Escherichia coli and Proteus mirabilis. **Clinical Microbiology Reviews**, Baltimore, v. 21, n. 1, p. 26–59, 2008.

JÁCOME, P. R. L. D. A. Caracterização fenotípica e molecular de isolados de Pseudomonas aeruginosa procedentes de pacientes internados em hospitais de Recife-PE. Recife, p.111 .2011. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical)

LEON, D.; MARKEL, S. In Silico Technologies in Drug Target Identification and Validation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50 , n. 9 , p. 2278-2279, 2017.

LIONTA, E. et al. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery : Principles, Applications and Recent Advances. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Athens, v.14, p. 1923–1938, 2014.

MARILIA, J. et al. Perfil da infecção bacteriana em ambiente hospitalar Profile of bacterial infection in a hospital environment. **Rev. Ciênc. Méd. Biol**, Campina Grande, v. 15, n. 2, p. 199–207, 2016.

MOTIEJUNAS, D.; WADE, R. Comprehensive Medicinal Chemistry II Volume 4 : Computer-Assisted Drug Design. **Triggle**, v. 4, p. 255–277, 1994.

NEVES, P. R. et al. Pseudomonas aeruginosa multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 409–420, 2011.

NOEL, A. R. et al. Antibacterial effect of ceftolozane/tazobactam in combination with amikacin against aerobic Gram-negative bacilli studied in an in vitro pharmacokinetic model of infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Bristol, v. 73, n. 9, p. 2411-2417, 2018.

OLIVEIRA, A. C. et al. Infecções relacionadas à assistência em saúde e gravidade clínica em uma unidade de terapia intensiva. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p. 89–96, 2012.

QUIJADA-MARTÍNEZ, P. et al. Estudio clínico y microbiológico de la infección urinaria asociada a catéter, en los servicios de medicina interna de un Hospital Universitario Venezolano. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, Mérida, v. 34, n. 1, p. 52–61, 2017.

RIBEIRO, M; CORTINA, M. As principais bactérias de importância clínica e os mecanismos de resistência no contexto das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). **Revista Científica UMC**, Mogi das Cruzes, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2016.

ROY, K.; KAR, S.; DAS, R. N. QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment. 1 ed. Elsevier Inc, 2015. 479 p.

STORZ, M. P. et al. Validation of PqsD as an anti-biofilm target in pseudomonas aeruginosa by development of small-molecule inhibitors. **Journal of the American Chemical Society**, Saarbrücken, v. 134, n. 39, p. 16143–16146, 2012.

VITERBO DE FARIA, T.; PESSALACIA, J. D. R.; DA SILVA, E. S. Fatores de risco no uso de antimicrobianos em uma instituição hospitalar: reflexões bioéticas. **Acta bioethica**, São João del Rei, v. 22, n. 2, p. 321–329, 2016.

WALKER, J. Target Identification and Validation in Drug Discovery: Methods and Protocols. **Life Sciences**, v. 531, p. 588, 2009.

WEIDEL, E. et al. Structure Optimization of 2-Benzamidobenzoic Acids as PqsD Inhibitors for *Pseudomonas aeruginosa* Infections and Elucidation of Binding Mode by SPR, STD NMR, and Molecular Docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6146–6155, 2013.

WERMUTH, C. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 4a Edição ed. Inglaterra. 2015. 902 p.

7.2 Artigo Científico

1. Oliveira, A. C.; Paula, A. O.; Iquiapaza, R. A.; Lacerda, A. C. de S.; *Rev. Gaúcha Enferm.* **2012**, *33*, 89.
2. Ferreira, L. L. Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa*, Fundação Oswaldo Cruz, 2005.
3. Ribeiro, M; Cortina, M.; *Rev. Científica UMC* **2016**, *1*, 1.
4. Quijada-Martínez, P.; Flores-Carrero, A.; Labrador, I.; Araque, M.; *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **2017**, *34*, 52.
5. Jacobsen, S. M.; Stickler, D. J.; Mobley, H. L. T.; Shirtliff, M. E. ;*Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 26.
6. Queren, A.M.; Carvalhaes, R. P.; Faria, S. O.; Marinho, M. F.; Santos, F. M.; Santos, T. G. Q. A.; Bessa, N. G. F.; *Rev. Cereus* **2010**, *9*, 126.
7. Marília, J.; Menezes, R.; Luísa, M.; Porto², S.; Lauise, C.; Pimenta, R. M. ;*Rev. Ciênc. Méd. Biol* **2016**, *15*, 199.
8. Viterbo de Faria, T.; Pessalacia, J. D. R.; da Silva, E. S. ;*Acta Bioeth.* **2016**, *22*, 321.
9. Delcour, A. H. ;*Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2009**, *1794*, 808.
10. Buenahora, R. D.; Bustillo Zarate, D. E.; Caicedo Sanchez, D. C.; Cadena Sarmiento, D. C.; Gomez, C. C. ; *Acinetobacter baumannii Emerg. multidrug-resistant Pathog.* **2016**, *29*, 113.
11. Chiu, S. N.; Shao, P. L.; Wang, J. K.; Chen, H. C.; Lin, M. T.; Chang, L. Y.; Lu, C. Y.; Lee, P. I.; Huang, L. M.; Wu, M. H. ;*J. Pediatr.* **2014**, *164*, 99.
12. Jácome, P. R. L. D. A. Dissertação de Mestrado, **2011**.
13. Neves, P. R.; Mamizuka, E. M.; Levy, C. E.; Lincopan, N. ;*J. Bras. Patol. e Med. Lab.* **2011**, *47*, 409.
14. Govan, J. R. W.; Deretic, V. ;*Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 539.
15. Storz, M. P.; Maurer, C. K.; Zimmer, C.; Wagner, N.; Brengel, C.; De Jong, J. C.; Lucas, S.; Müsken, M.; Häussler, S.; Steinbach, A.; Hartmann, R. W. ;*J. Am. Chem. Soc.*

2012, 134, 16143.

- 16, Gómez, M. I.; Prince, A. ;*Curr. Opin. Pharmacol.* **2007**, 7, 244.
17. Hinsberger, S.; De Jong, J. C.; Groh, M.; Hauptenthal, J.; Hartmann, R. W. ;*Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 76, 343.
18. Weidel, E.; de Jong, J. C.; Brengel, C.; Storz, M. P.; Braunshausen, A.; Negri, M.; Plaza, A.; Steinbach, A.; Müller, R.; Hartmann, R. W. ;*J. Med. Chem.* **2013**, 56, 6146.
19. <http://www.hyper.com/>. Acesso: 19 outubro 2020.
20. <http://www.crystallography.net/cod>. Acesso: 19 outubro 2020.
21. <http://www.gaussian.com>. Acesso: 19 outubro 2020
22. Rodrigues, R. P.; Mantoani, S. P.; de Almeida, J. R.; Pinsetta, F. R.; Semighini, E. P.; da Silva, V. B.; da Silva, C. H. P. *Rev. Virt. Quim.* **2012**, 4, 739.
23. Alves, V.M.; Braga, R.C.; Muratov, E.N.; Andrade, C.H. *Quim. Nova* **2018**, 41, 202.
24. <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist>. Acesso: 19 outubro 2020.
25. <http://pharmit.csb.pitt.edu>. Acesso: 19 outubro 2020.
26. Lipinski, C. A.; *Drug Disc. Today: Technologies* **2004**, 1, 337.
27. Veber D. F.; Johnson, S.R.; Cheng, H.Y.; Smith, B. R.; Ward, K.W.; Kopple, K.D.; *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2615.
28. <https://www.vegahub.eu/portfolio-item/vega-qsar/>. Acesso: 19 outubro 2020.
29. <https://www.rcsb.org/>. Acesso: 19 outubro 2020.
30. <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>. Acesso: 19 outubro 2020.
31. <http://vina.scripps.edu/>. Acesso: 19 outubro 2020.
32. <https://sourceforge.net/projects/pyrx/>. Acesso: 19 outubro 2020.
33. <https://sourceforge.net/projects/pymol>. Acesso: 19 outubro 2020.
34. Todeschini, R.; Consonni, V.; *Molecular Descriptors for Chemoinformatics*; R. Mannhold, H. K. e G. F., Ed.; volume I; Wiley-VCH, 2009.
35. <http://www.taletе.mi.it/index.htm>. Acesso: 19 outubro 2020.
36. Martins, J. P. A.; Ferreira, M. M. C.; *Quim. Nova* **2013**, 36, 554
37. Teófilo, R. F.; Martins, J. P. A.; Ferreira, M. M. C.; *J. Chemometr.* **2009**, 23, 32
38. Kiralj, R.; Ferreira, M. M. C. ;*J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, 20, 770
39. Roy, P. P.; Paul, S.; Mitra, I.; Roy, K. ;*Molecules* **2009**, 14, 1660.
40. Golbraikh, A.; Shen, M.; Xiao, Z.; Xiao, Y. De; Lee, K. H.; Tropsha, A. ;*J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2003**, 17, 241.
- 41, Ojha, P. K.; Mitra, I.; Das, R. N.; Roy, K.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2011**, 107, 194.

42. http://teqip.jdvu.ac.in/QSAR_Tools. Acesso: 19 outubro 2020.
43. Kar, S.; Roy, K.; Ambure, P.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2015**, *145*, 22.
44. http://teqip.jdvu.ac.in/QSAR_Tools. Acesso: 19 outubro 2020.
45. Bera, A. K.; Atanasova, V.; Robinson, H.; Eisenstein, E.; Coleman, J. P.; Pesci, E. C.; Parsons, J. F. ;*Biochemistry* **2009**, *48*, 8644.
46. Kamal, A.A.M.; Petrera, L.; Eberhard, J.; Hartmann, R.W.; *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 4620.
47. Eriksson, L.; Jaworska, J.; Worth, A. P.; Cronin, M. T. D.; McDowell, R. M.; Gramatica, P. ;*Environ. Health Perspect.* **2003**, *111*, 1361
48. Mitra, I.; Saha, A.; Roy, K. ;*Mol. Simul.* **2010**, *36*, 1067.
49. Wold, S.; Sjostrom, M.; Eriksson, L.; Sweden, S. ;*Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2001**, *58*, 2001

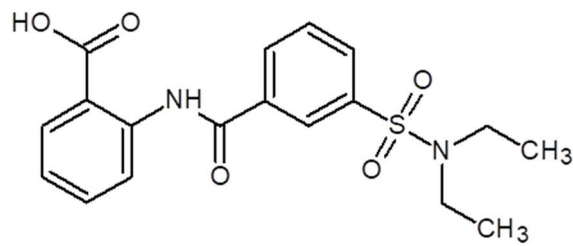
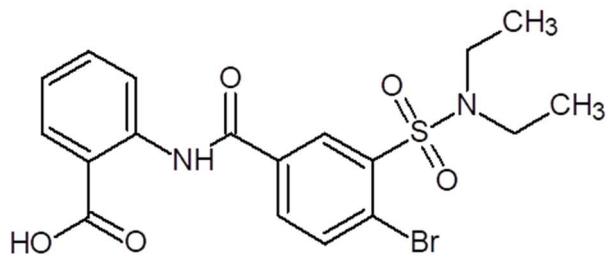
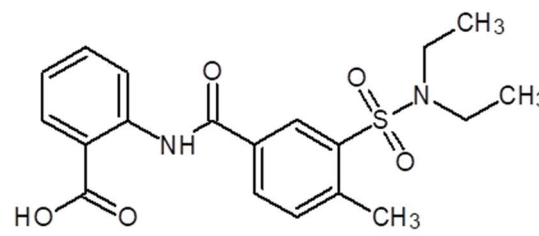
ANEXOS

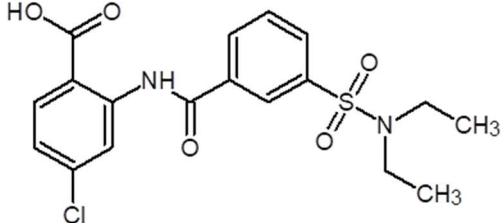
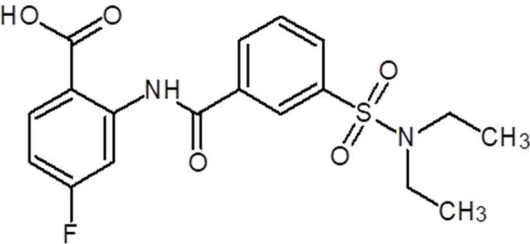
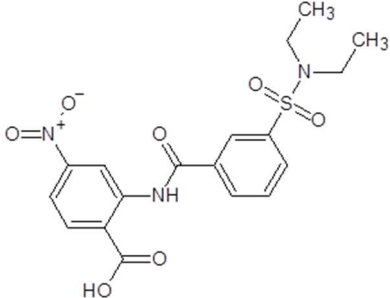
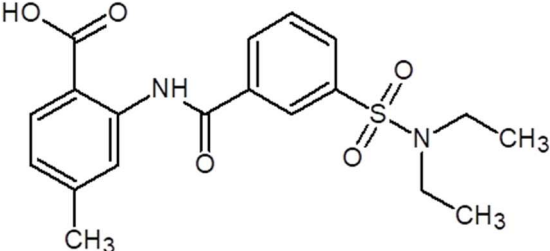
MATERIAL SUPLEMENTAR

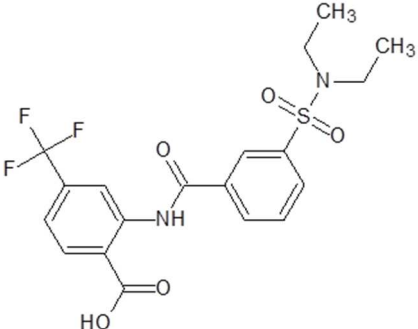
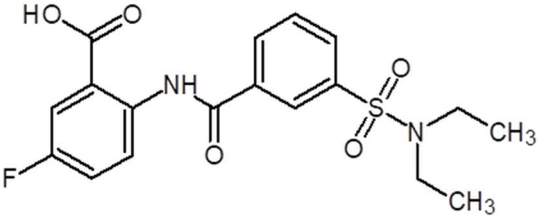
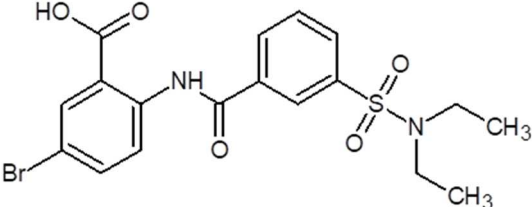
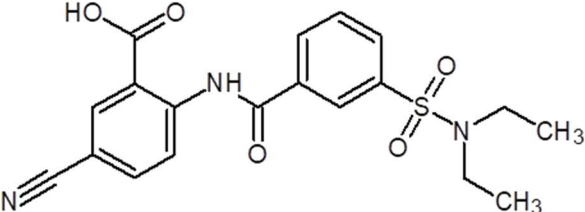
IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS NOVOS AGENTES ANTI-*Pseudomonas aeruginosa* UTILIZANDO MÉTODOS *in silico*.

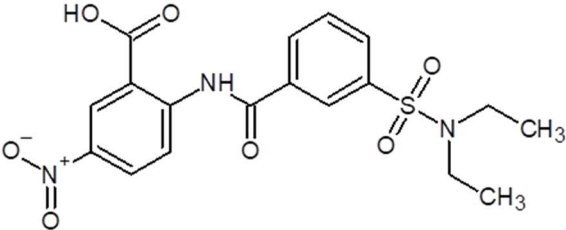
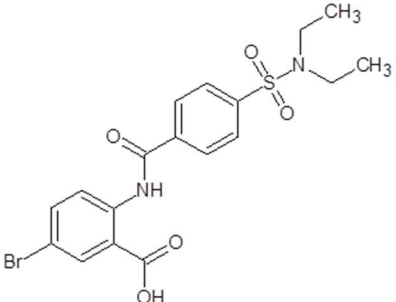
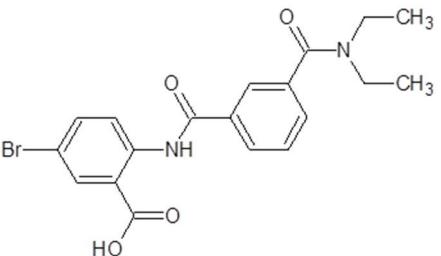
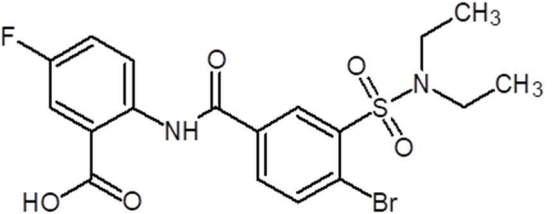
Cristiane Daniel ^{a,*} e Eduardo Borges de Melo ^a

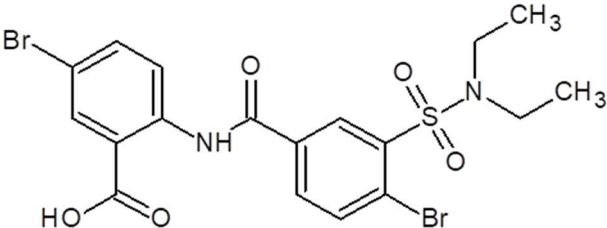
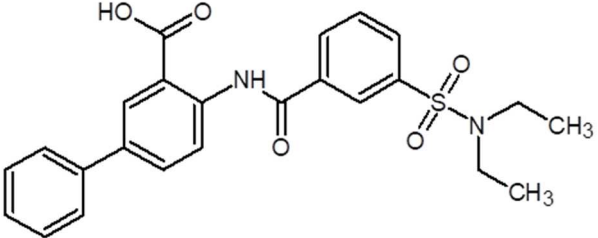
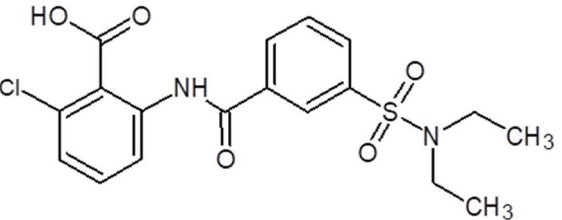
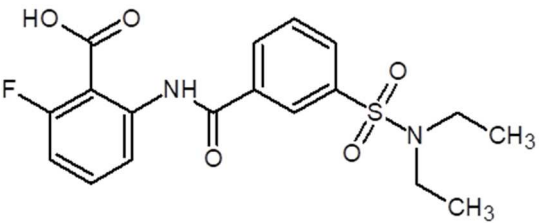
^aCentro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), 85819-110 Cascavel-PR, Brasil.

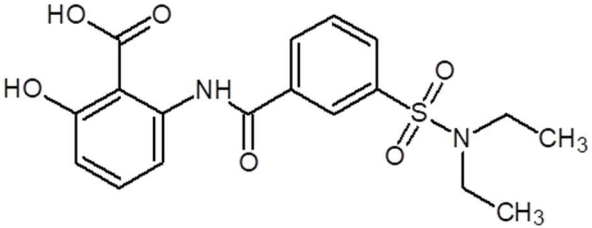
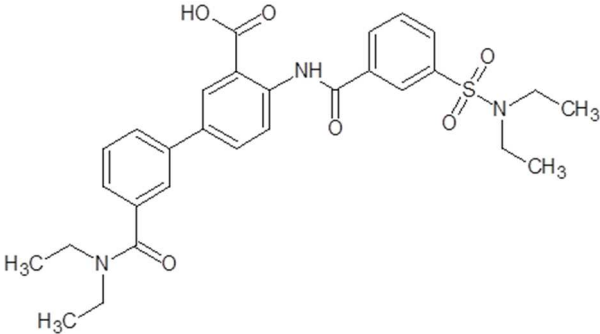
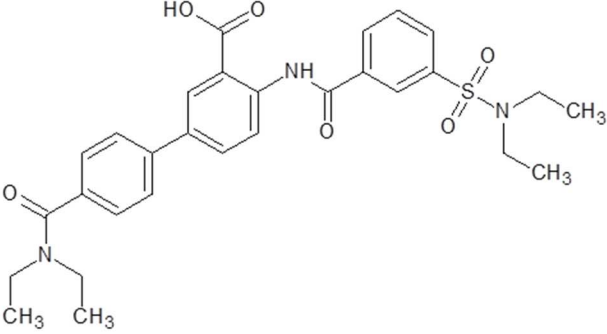
Tabela S1. Conjunto de dados selecionado para o estudo, e resultados das predições obtidas nas validações interna e externa					
SUBSTÂNCIA	ESTRUTURA	IC₅₀ (μM)	pIC₅₀ real	pIC₅₀ predito	Resíduos
1		19.8	4.703	4.833	-0.130
2		6.9	5.161	5.088	0.073
3		27.3	4.564	4.862	-0.298

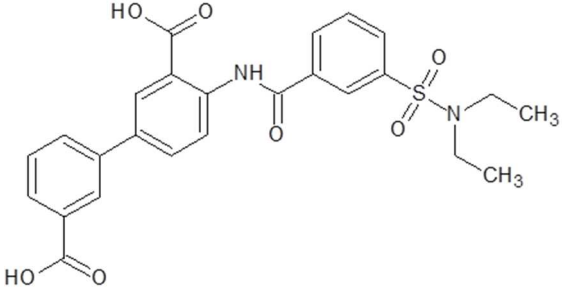
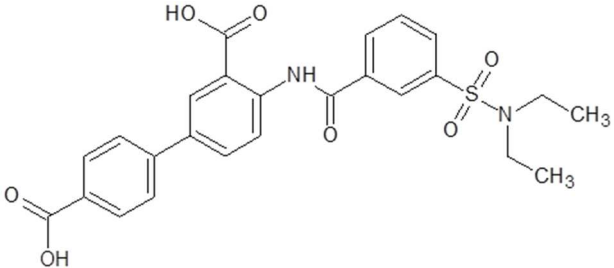
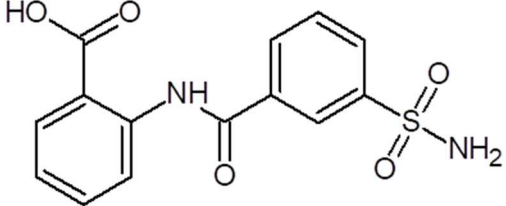
4*		9.4	5.027	5.014	0.013
5		8	5.097	4.787	0.310
6		6.3	5.201	5.559	-0.358
7		18.4	4.735	4.830	-0.095

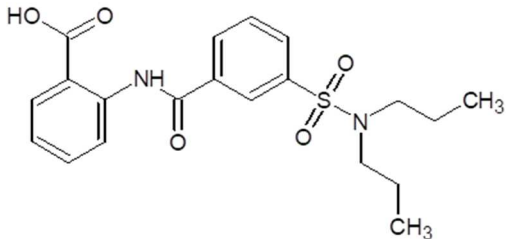
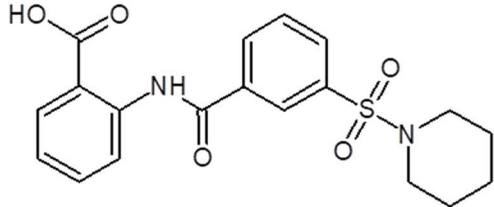
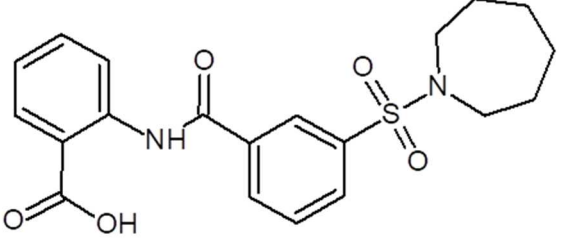
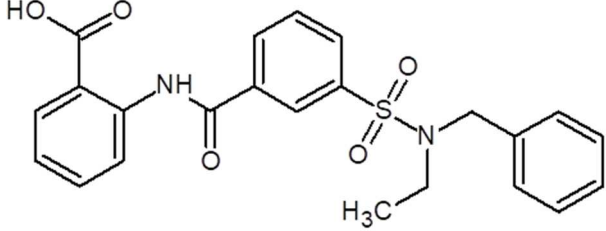
8*		12.4	4.907	5.102	-0.195
9		11.4	4.943	4.735	0.208
10		9.9	5.004	4.964	0.040
11*		26.2	4.582	4.740	-0.158

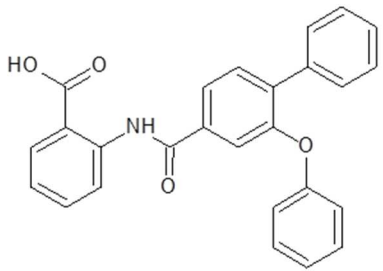
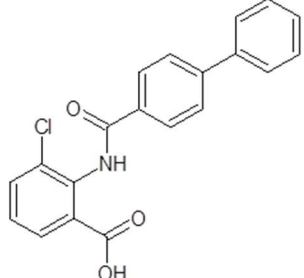
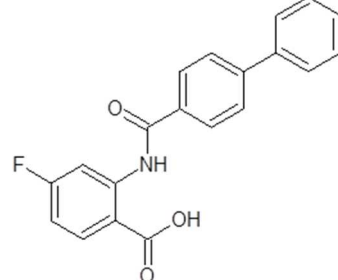
12		8.9	5.051	4.995	0.056
13		13	4.886	4.843	0.043
14		25.5	4.593	4.690	-0.097
15		6.6	5.180	5.132	0.049

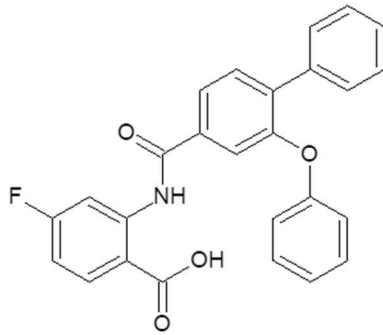
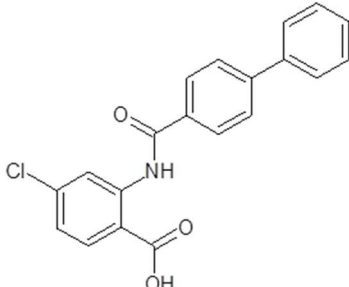
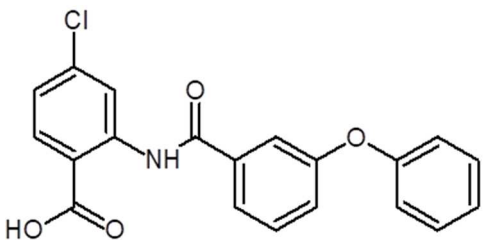
16		3.8	5.420	5.559	-0.139
17*		3	5.523	5.352	0.171
18		39	4.409	Outlier	
19		24.9	4.604	4.739	-0.135

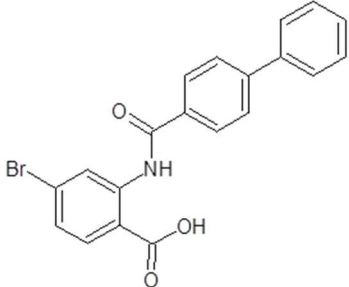
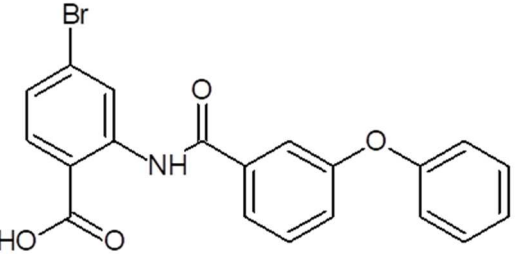
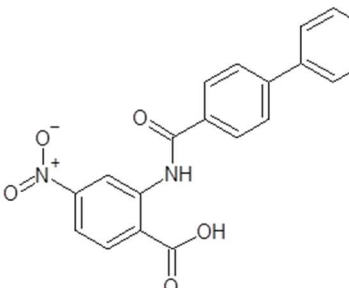
20		1.2	5.921	Outlier	
21		3.8	5.420	5.520	-0.100
22		1.9	5.721	5.712	0.009

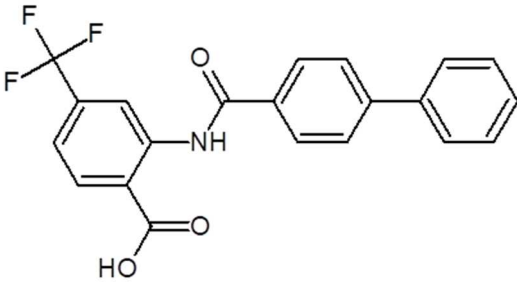
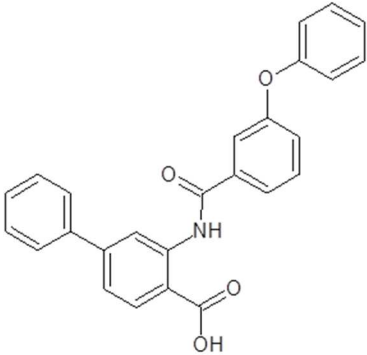
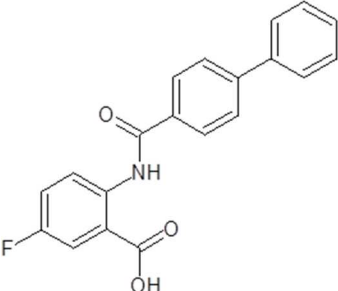
23*		1.5	5.824	6.153	-0.329
24		2.7	5.569	5.780	-0.211
25		43.6	4.361	4.202	0.159

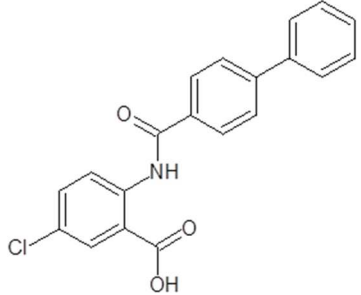
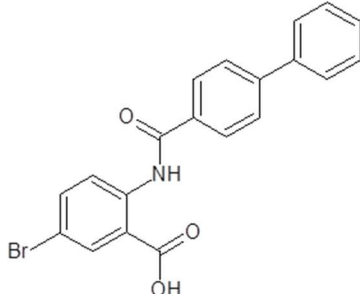
26		5.4	5.268	5.083	0.184
27*		14.4	4.842	4.960	-0.119
28		14.8	4.830	4.957	-0.127
29*		16.5	4.783	5.041	-0.258

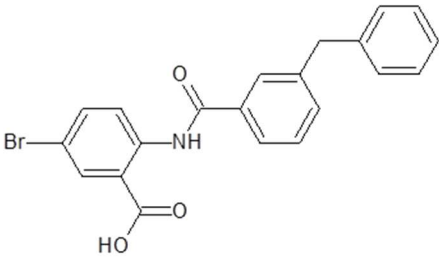
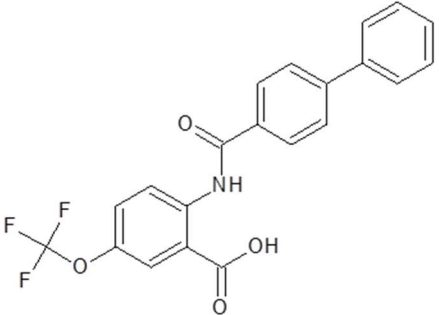
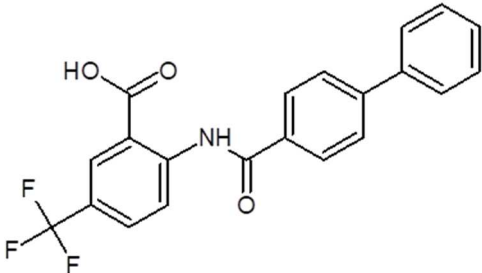
30		6.6	5.180	5.168	0.012
31		6.2	5.208	5.142	0.065
32		18.2	4.740	5.025	-0.285

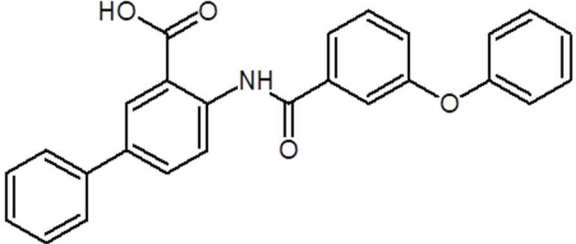
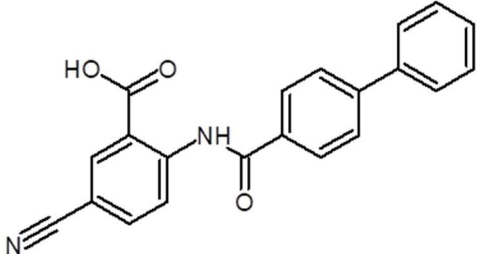
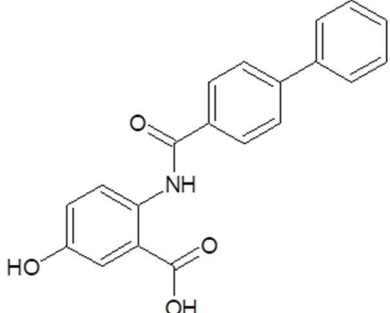
33		6	5.222	5.172	0.050
34		8.7	5.060	5.192	-0.132
35		5.7	5.244	5.274	-0.030

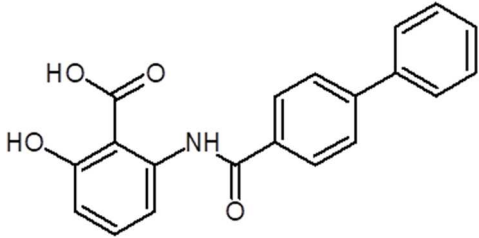
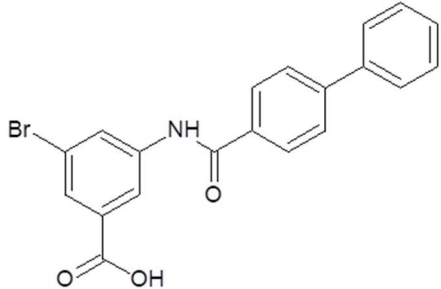
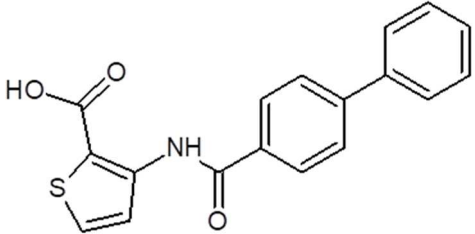
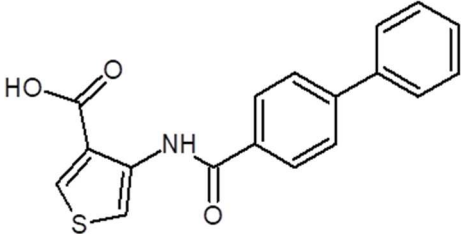
36	 <p>Chemical structure of 2-(4-bromophenyl)-3-(4-phenylphenyl)acrylamide. It features a central benzene ring with a bromine atom at the para position, an amide group (-NH-C(=O)-) at the 1-position, and a propenoic acid group (-CH=CH-COOH) at the 2-position. The amide nitrogen is further substituted with a 4-phenylphenyl group.</p>	3.2	5.495	5.350	0.145
37	 <p>Chemical structure of 2-(4-bromophenyl)-3-(4-phenoxyphenyl)acrylamide. It features a central benzene ring with a bromine atom at the para position, an amide group (-NH-C(=O)-) at the 1-position, and a propenoic acid group (-CH=CH-COOH) at the 2-position. The amide nitrogen is further substituted with a 4-phenoxyphenyl group.</p>	5.1	5.292	5.560	-0.267
38*	 <p>Chemical structure of 2-(4-nitrophenyl)-3-(4-phenylphenyl)acrylamide. It features a central benzene ring with a nitro group (-NO₂) at the para position, an amide group (-NH-C(=O)-) at the 1-position, and a propenoic acid group (-CH=CH-COOH) at the 2-position. The amide nitrogen is further substituted with a 4-phenylphenyl group.</p>	3.3	5.481	5.520	-0.039

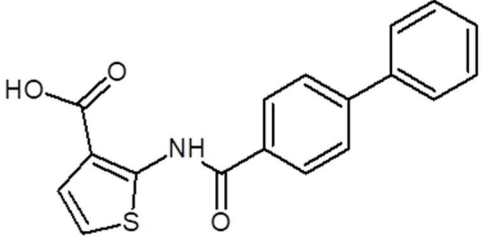
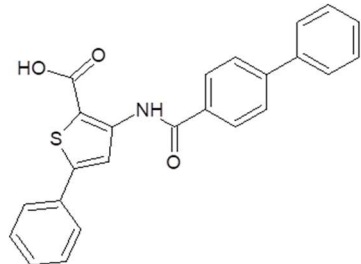
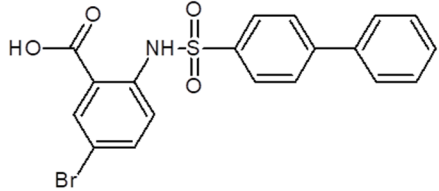
39		4.9	5.310	5.191	0.119
40*		6.6	5.180	5.240	-0.060
41		15.2	4.818	5.011	-0.193

42	 <p>Chemical structure of 2-(4-(benzylideneamino)phenyl)acetic acid. It consists of a central benzene ring with a carboxylic acid group (-COOH) at the 1-position and an amide group (-NH-CO-) at the 2-position. The amide nitrogen is bonded to a benzylidene group (-CH=CH₂), which is further attached to a phenyl ring.</p>	3.8	5.420	5.109	0.311
43	 <p>Chemical structure of 2-(4-(benzylideneamino)phenyl)acetic acid. It consists of a central benzene ring with a carboxylic acid group (-COOH) at the 1-position and an amide group (-NH-CO-) at the 2-position. The amide nitrogen is bonded to a benzylidene group (-CH=CH₂), which is further attached to a phenyl ring.</p>	3.2	5.495	5.154	0.341
44	 <p>Chemical structure of 2-(4-(benzylideneamino)phenyl)acetic acid. It consists of a central benzene ring with a carboxylic acid group (-COOH) at the 1-position and an amide group (-NH-CO-) at the 2-position. The amide nitrogen is bonded to a benzylidene group (-CH=CH₂), which is further attached to a phenyl ring.</p>	4.4	5.357	5.207	0.150

45		5	5.301	5.116	0.185
46*		4	5.398	5.579	-0.181
47		3.4	5.469	5.438	0.031

48*		7.7	5.114	5.235	-0.121
49		8.6	5.066	4.801	0.265
50		4.2	5.377	5.611	-0.235

51		1.3	5.886	5.553	0.333
52		32.6	4.487	Outlier	
53*		5.2	5.284	4.851	0.433
54		19.5	4.710	4.923	-0.213

55		15.7	4.804	4.892	-0.088
56		9.8	5.009	5.157	-0.148
57		1.3	5.886	5.852	0.034

* Compostos selecionados como conjunto teste do estudo QSAR. Os resultados das predições apresentadas também correspondem a resultados da validação externa.

Tabela S2. Descritores selecionados para o modelo 2D-QSAR.							
Composto	SM05_AEA(dm)	RDF150s	GATS1s	R6m	CATS2D_04_DA	SpMax5_Bh(m)	F10[C-N]
1	0.618	0	0.68	0.277	1	3.234	1
2	0.618	0	0.682	0.569	1	3.339	1
3	0.618	0	0.679	0.244	1	3.275	1
4	0.618	0	0.681	0.423	1	3.34	1
5	0.618	0	0.655	0.357	1	3.271	1
6	1	0	0.637	0.333	2	3.341	1
7	0.618	0	0.679	0.278	1	3.293	2
8	1	0.002	0.667	0.341	1	3.34	2
9	0.618	0	0.655	0.283	1	3.254	1
10	0.618	0	0.683	0.321	1	3.34	1
11	0.618	2.363	0.653	0.306	1	3.324	3
12	1	0.308	0.637	0.377	1	3.339	2
13	0.618	0.097	0.683	0.333	1	3.343	3
14	0.618	0	0.64	0.25	1	3.265	1
15	0.618	10.619	0.658	0.646	1	3.34	1
16	0.618	0	0.686	0.599	1	3.683	1
17	1	23.636	0.669	0.286	1	3.341	1
18	0.618	5.397	0.68	0.315	1	3.328	1
19	0.618	0	0.654	0.291	1	3.235	1
20	0.618	0	0.744	0.28	2	3.234	1
21	1.151	33.34	0.645	0.306	1	3.53	4
22	1.107	46.404	0.645	0.296	1	3.53	1
23	1.092	88.735	0.705	0.306	1	3.343	1
24	1.088	42.851	0.705	0.272	1	3.345	1
25	-0.656	0	0.778	0.272	1	3.206	1

26	1	0	0.667	0.331	1	3.279	1
27	1	0	0.646	0.316	1	3.236	1
28	1	0	0.641	0.33	1	3.237	1
29	1	0.189	0.668	0.45	1	3.273	3
30	1	0.212	0.68	0.277	1	3.268	0
31	1	0.149	0.667	0.368	1	3.248	0
32	1	4.11	0.625	0.332	1	3.254	0
33	1.141	4.4	0.63	0.416	1	3.272	0
34	1	0.514	0.668	0.414	1	3.255	0
35	1	0	0.688	0.399	1	3.274	0
36	1	0.091	0.673	0.753	1	3.255	0
37	1	1.337	0.693	0.732	1	3.274	0
38	1	5.812	0.699	0.26	2	3.254	1
39	1	19.683	0.643	0.317	1	3.255	0
40	1	9.782	0.681	0.231	1	3.274	0
41	1	10.084	0.625	0.223	1	3.251	0
42	1	4.619	0.668	0.245	1	3.254	0
43	1	5.607	0.673	0.272	1	3.254	0
44	1	0	0.693	0.273	1	3.271	0
45	1	1.135	0.664	0.277	1	3.283	0
46	1	50.638	0.66	0.375	1	3.254	0
47	1	39.437	0.643	0.436	1	3.254	0
48	1	6.153	0.681	0.283	1	3.273	0
49	1	4.955	0.622	0.269	1	3.254	2
50	1	9.642	0.763	0.23	1	3.246	0
51	1	0.223	0.762	0.263	2	3.222	0
52	1	5.607	0.673	0.272	1	3.254	0

53	0.73	0.747	0.668	0.24	1	3.188	0
54	0.73	0.022	0.669	0.245	1	3.245	0
55	0.73	0.315	0.668	0.228	1	3.233	0
56	1	7.25	0.662	0.246	1	3.273	0
57	1	2.69	0.719	0.658	1	3.564	0

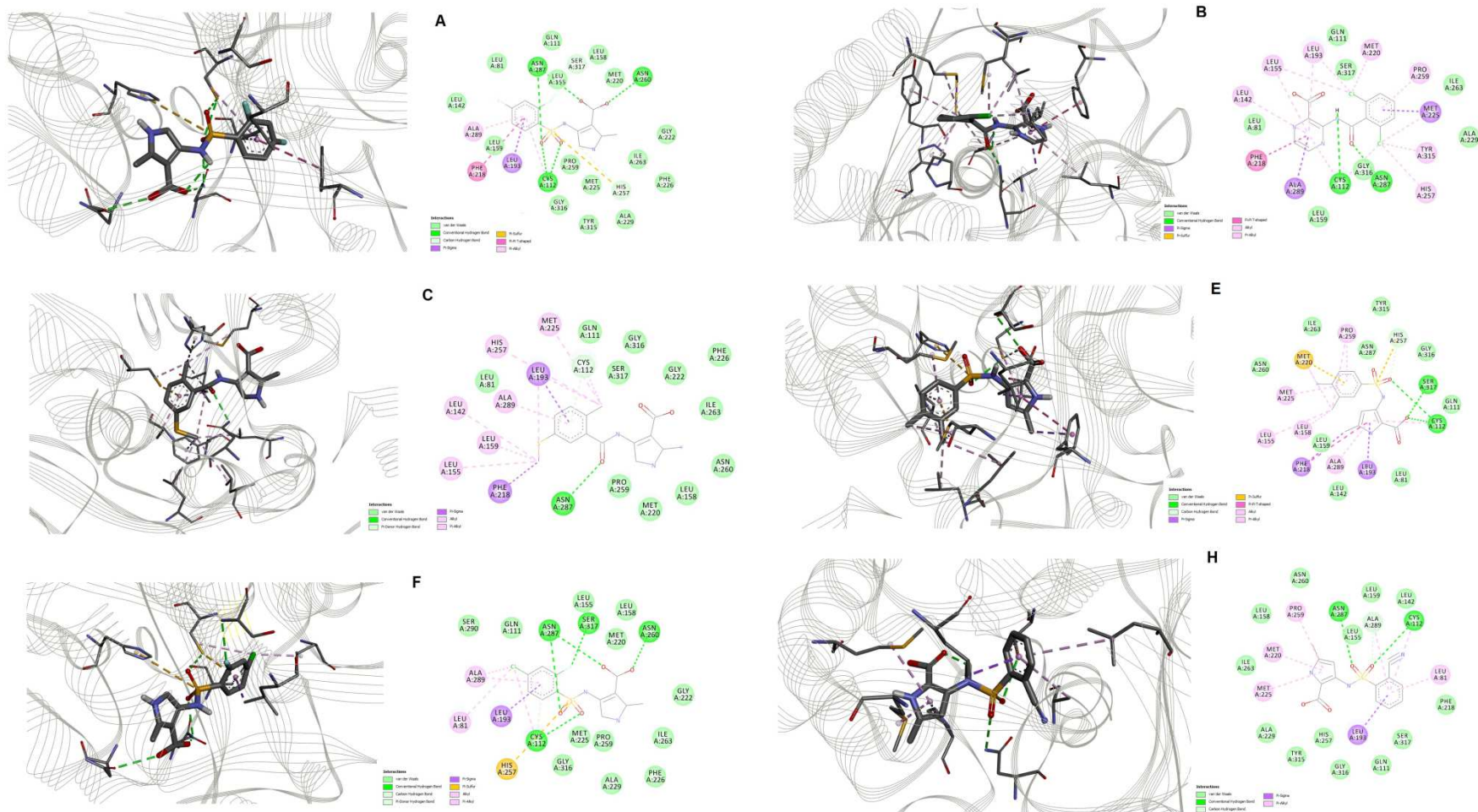


Figura S1. Resultados do ancoramento molecular (representações 2D e 3D) dos compostos hits **A**, **B**, **C**, **E**, **F** e **H** no sítio de ligação da *PqsD* (PDB 3H76). Figura construída no Discovery Studio Visualizer 17.2.

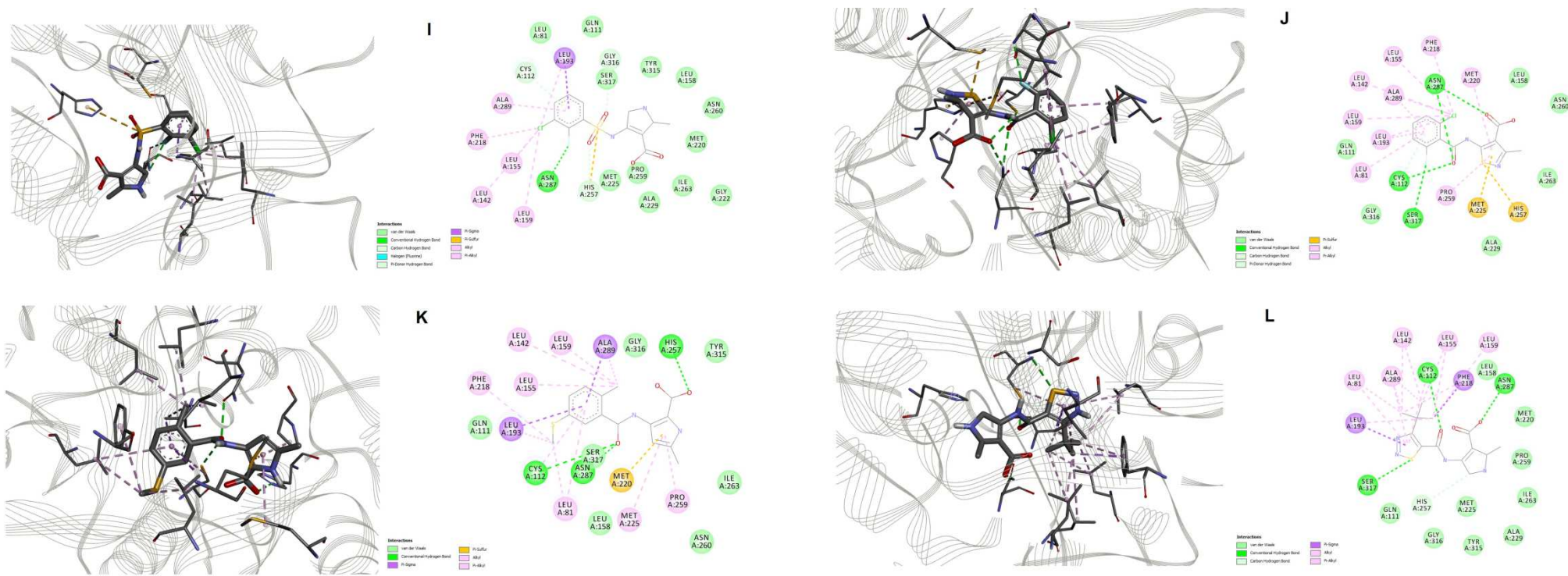


Figura S2. Resultados do ancoramento molecular (representações 2D e 3D) dos compostos hits **I**, **J**, **K** e **L** no sítio de ligação da PqsD (PDB 3H76). Figura construída no Discovery Studio Visualizer 17.