

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Augusto Dias da Mota

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, FÍSICO QUÍMICAS
FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS DE NOVOS
COMPOSTOS DERIVADOS DE PIRAZOLINA**

Santa Maria, RS
2022

Augusto Dias da Mota

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, FÍSICO QUÍMICAS
FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS DE NOVOS COMPOSTOS
DERIVADOS DE PIRAZOLINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêutica**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosmari Hörner

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Mota, Augusto

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, FÍSICO QUÍMICAS
FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS DE NOVOS COMPOSTOS
DERIVADOS DE PIRAZOLINA / Augusto Mota.- 2022.
45 f.; 30 cm

Orientadora: Rosmari Hörner
Coorientadora: Daniela Fernandes Ramos
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2022

1. Pseudomonas aeruginosa 2. Atividade antimicrobiana
3. in silico 4. Pirazolininas 5. Resistência bacteriana I.
Hörner, Rosmari II. Fernandes Ramos, Daniela III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

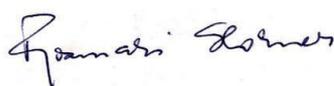
Declaro, AUGUSTO MOTA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Augusto Dias da Mota

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, FÍSICO QUÍMICAS
FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS DE NOVOS COMPOSTOS
DERIVADOS DE PIRAZOLINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêutica**.

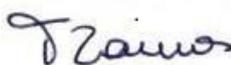
Aprovada em 24 de agosto de 2022.



Rosmari Hörner, Dr^a (UFSM)
(Orientadora) (Videoconferencia)



Aline Joana Rolina Wohlmuth Alves dos Santos, Dr^a (UFPel)
(Videoconferencia)



Daniela Fernandes Ramos, Dr^a (FURG)
(Videoconferencia)

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me iluminar e me proporcionar chegar até onde estou hoje com toda humildade.

A minha orientadora, Rosmari Hörner, por todo conhecimento que me passou neste tempo em que estive presente no seu grupo de estudo, acreditando no meu potencial e sempre me apoiando, incentivando e dando suas idéias gênias em todas as decisões que tínhamos que tomar.

Aos meus pais, Lucia e Luiz (cebinho), por me darem condições pra vivenciar tudo isso e todo apoio independente da situação. Muito obrigado mãe, por ser a mulher mais forte deste mundo e escutar tudo e sempre achar alguma solução para nossos problemas. Muito obrigado pai, por ser a pessoa do coração mais puro e gigante que conheço.

A minha irmã, Luisa Dias da Mota, um agradecimento em especial. Obrigado por me aturar quando me desesperava, por acreditar em mim mesmo quando eu queria desistir, por me ajudar independente da situação, nunca vou me esquecer disto. Saiba que tu é meu espelho como pessoa e profissional.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bacteriologia, pelo companheirismo, ensinamentos, auxílios e principalmente a amizade.

A minha namorada Carolina, pelo companheirismo, compreensão, carinho, amor e principalmente pela pessoa que és comigo e com minha família.

A Universidade Federal de Santa Maria, pela possibilidade de realizar diversos sonhos ao longo destes anos.

Ao Hospital Universitário de Santa Maria e aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas, que possibilitaram a realização deste trabalho através da cedência das amostras clínicas.

A CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria, pelo suporte financeiro e pela oportunidade de desenvolver e concretizar este estudo.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma foram essenciais para a realização deste trabalho.

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, FÍSICO QUÍMICAS FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS DE NOVOS COMPOSTOS DERIVADOS DE PIRAZOLINA

AUTOR: Augusto Dias da Mota
ORIENTADORA: Dr^a. Rosmari Hörner

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria oportunista que raramente causa infecção em pessoas saudáveis. Porém figura entre os principais agentes em infecções nosocomiais, com altas taxas de morbidade e mortalidade devido a sua resistência a múltiplos fármacos (MDR). Este microorganismo é capaz de desencadear infecções graves em indivíduos imunocomprometidos, sendo os mais susceptíveis aqueles internados em unidades de terapia intensiva, pacientes queimados e com fibrose cística. Apesar de existirem muitas classes de antibióticos disponíveis para o tratamento é cada vez mais comum a ocorrência de infecções por cepas multirresistentes, principalmente no ambiente hospitalar. Esses locais, além da circulação de indivíduos susceptíveis e imunocomprometidos, apresentam condições favoráveis para transmissão e pressão seletiva das cepas, favorecendo o surgimento de isolados multirresistentes. *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos foram incluídas na lista da Organização Mundial de Saúde (OMS) entre as três espécies de bactérias com necessidade crítica para o desenvolvimento de novos antibióticos. Compostos heterocíclicos derivados de pirazolinas vêm sendo sintetizados e utilizados em estudos pelas suas características e diversas propriedades farmacológicas. Ferramentas computacionais (*in silico*) têm sido propostas a fim de reduzir o tempo e altos custos envolvidos neste processo. Estas tecnologias permitem associar predições computacionais aos ensaios pré-clínicos laboratoriais (*in vitro e in vivo*), tornando estes modelos custo-efetivos na pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Tendo em vista, a urgente necessidade em descobrir novos antibióticos ou alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções multirresistentes por este patógeno o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de sete novos compostos derivados de pirazolinas em isolados clínicos multirresistentes de *P. aeruginosa* e estudar suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas utilizando ferramentas *in silico*. Para avaliar a atividade antibacteriana dos fármacos foi realizado a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A citotoxicidade dos compostos foi avaliada em ensaios com a linhagem celular de fibroblasto (VERO). Os compostos pirazolínicos que apresentaram atividade tiveram uma CIM de 0,2 mg/mL frente aos isolados clínicos e valores de IC₅₀ que variou em 0,0081mg/mL e 0,4577mg/mL. Em relação aos resultados farmacocinéticos e toxicológicos (*in silico*) os compostos analisados não violaram a regra dos cinco, instituída por Lipinski. Além desses parâmetros, o número de ligações rotacionais esteve menor que 10 (entre 3 e 4) e a TPSA esteve menor que 140 Å (65,79), o que ratificou uma boa biodisponibilidade oral dos compostos analisados. A previsão *in silico* e suas respectivas atividades antimicrobianas das moléculas aqui analisadas, com ressalvas e possíveis rearranjos moleculares nos permite sugeri-las como potenciais candidatas a fármacos a serem utilizados pela via oral com boa permeabilidade através de membranas biológicas e alta absorção por via gastrointestinal.

Palavras chaves: *Pseudomonas aeruginosa*. Atividade antibacteriana. *in silico*. Pirazolina.

STUDY OF ANTIBACTERIAL, PHYSICOCHEMICAL, PHARMACOKINETIC AND TOXICOLOGICAL ACTIVITY OF NEW PYRAZOLINE-DERIVED COMPOUNDS

AUTHOR: Augusto Dias da Mota

ADVISER: Dr^a. Rosmari Hörner

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic bacterium that rarely causes infection in healthy people. However, it is among the main agents in nosocomial infections, with high rates of morbidity and mortality due to its multidrug resistance (MDR). This microorganism is capable of triggering serious infections in immunocompromised individuals, the most susceptible being those hospitalized in intensive care units, burn patients and cystic fibrosis patients. Although there are many classes of antibiotics available for treatment, infections by multidrug-resistant strains are increasingly common, especially in the hospital environment. These sites, in addition to the circulation of susceptible and immunocompromised individuals, present favorable conditions for the transmission and selective pressure of the strains, favoring the emergence of multidrug-resistant isolates. Carbapenem-resistant *P. aeruginosa* were included in the World Health Organization (WHO) list of three species of bacteria in critical need for the development of new antibiotics. Heterocyclic compounds derived from pyrazolines have been synthesized and used in studies due to their characteristics and various pharmacological properties. Computational tools (*in silico*) have been proposed in order to reduce the time and high costs involved in this process. These technologies allow the association of computational predictions with pre-clinical laboratory tests (*in vitro* and *in vivo*), making these models cost-effective in drug research and development. In view of the urgent need to discover new antibiotics or therapeutic alternatives for the treatment of multidrug-resistant infections caused by this pathogen, the present study aimed to evaluate the antibacterial activity of seven new compounds derived from pyrazolines in multidrug-resistant clinical isolates of *P. aeruginosa* and to study their properties. physicochemical, pharmacokinetic and toxicological properties using *in silico* tools. To evaluate the antibacterial activity of the drugs, the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) was performed. The cytotoxicity of the compounds was evaluated in assays with the fibroblast cell line (VERO). The pyrazoline compounds that showed activity had a MIC of 0.2 mg/mL compared to clinical isolates and IC₅₀ values that ranged from 0.0081mg/mL to 0.4577mg/mL. Regarding the pharmacokinetic and toxicological results (*in silico*), the analyzed compounds did not violate the rule of five, established by Lipinski. In addition to these parameters, the number of rotational bonds was less than 10 (between 3 and 4) and the TPSA was less than 140 Å (65.79), which confirmed a good oral bioavailability of the analyzed compounds. The *in silico* prediction and their respective antimicrobial activities of the molecules analyzed here, with reservations and possible molecular rearrangements, allows us to suggest them as potential candidates for drugs to be used orally with good permeability through biological membranes and high absorption by the gastrointestinal route.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Antibacterial activity; *in silico*; Pyrazoline.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. REVISÃO DA LITERATURA	10
3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> E IMPORTÂNCIA CLÍNICA	10
3.2 PATOGENIA E MECANISMOS DE VIRULÊNCIA	12
3.3 TRATAMENTO E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	13
3.4 NOVOS ANTIMICROBIANOS	15
3.5 ANÁLISE <i>in silico</i>	18
4. PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	20
4.1 MANUSCRITO	20
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
6. REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa, apesar de geralmente não causar doença em indivíduos imunocompetentes, é considerada uma bactéria letal e oportunista. Possui uma série de defesas intrínsecas e adquiridas que facilitam o desenvolvimento de resistência ao atual espectro de antibióticos disponíveis (JENNY; KINGSBURY, 2018). Frequentemente é responsável por infecções nosocomiais, com altas taxas de mortalidade em pacientes críticos (GOMES et al., 2011; HIRSCH et al., 2012; TUMBARELLO et al., 2011). Essas características tornam o ambiente hospitalar um local favorável para sua colonização e pressão seletiva, facilitando o surgimento cepas multirresistentes (BASSETTI et al., 2018).

A complexidade de seus mecanismos de resistência dificultam a erradicação da infecção e elevam os índices de morbidade e mortalidade quando comparadas a outros patógenos (OSMON et al., 2004). Infecções causadas por cepas multirresistentes a *P. aeruginosa* limitam severamente as opções terapêuticas e estão associadas à hospitalizações prolongadas e infecções polimicrobianas (DE MATOS et al., 2016; ZAVASCKI et al., 2006).

Apesar da diversidade de opções farmacológicas disponíveis, *P. aeruginosa* é capaz de desenvolver resistência a maioria dos fármacos. Nas últimas décadas, os estudos vêm demonstrando uma crescente resistência às cefalosporinas e carbapenêmicos (fármacos de última escolha no tratamento de infecções) (HIRSCH et al., 2012; HONG et al., 2015). Isso evidência a necessidade urgente de pesquisas que tenham como objetivo descobrir novas alternativas para o tratamento de bactérias multirresistentes (BASSETTI et al., 2018). Corroborando essa necessidade, a Organização Mundial de Saúde elaborou uma lista de patógenos prioritários para o descobrimento de novos antibióticos. Entre estes, *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos foi elencada como uma prioridade crítica, junto com *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos e Enterobacterias resistente a carbapenêmicos e a cefalosporinas de 3ª geração (WHO, 2017).

Nas últimas décadas, os compostos heterocíclicos vêm sendo estudados devido a descobertas de suas numerosas aplicações farmacêuticas. Entre esses compostos, as pirazolinás demonstraram atividade antimicrobiana, o que as torna promissoras candidatas a novos fármacos contra infecções, como por exemplo, frente a *P. aeruginosa* (KUMAR et al., 2009; ASAD et al., 2020).

A descoberta e o desenvolvimento de fármacos envolvem diversas etapas que além de onerosas financeiramente, podem levar muito tempo até que um novo fármaco seja introduzido no mercado. Frente a isso, diversas ferramentas computacionais (*in silico*) têm

sido propostas a fim de reduzir o tempo e os altos custos envolvidos neste processo. Estas tecnologias permitem associar predições computacionais aos ensaios pré-clínicos laboratoriais (*in vitro* e *in vivo*), tornando estes modelos custo-efetivos na pesquisa e desenvolvimento de fármacos (MACHIUS, 2003). Embora estejam disponíveis a bastante tempo, esse tipo de metodologia ainda é considerado como ferramenta essencial ao estudar potenciais novos fármacos. Como exemplo, cita-se o cenário da pandemia Covid-19, em que o uso de estudos *in silico* possibilitaram a triagem rápida de compostos com potencial atividade contra o SARS-CoV-2 (BIEMBENGUT; DE SOUZA, 2020). A indústria farmacêutica reconhece a importância e faz uso dessas ferramentas computacionais nos estágios iniciais do desenvolvimento de um medicamento (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Assim, este estudo apresentou a avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica de compostos pirazolínicos sintéticos em isolados clínicos multirresistentes de *P.aeruginosa* obtidos de pacientes atendidos no hospital universitário da Universidade Federal de Santa Maria (HUSM-UFSM) e suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas utilizando ferramentas *in silico*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana de sete novos compostos derivados de pirazolinas em isolados clínicos multirresistentes de *P. aeruginosa* e estudar suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas utilizando ferramentas *in silico*.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Mínima Inibitória das pirazolinas frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM);
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos pirazolínicos na linhagem celular de fibroblasto (VERO);
- Avaliar as características teóricas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção (ADME), físico-químicas, farmacocinéticas e efeitos toxicológicos dos compostos e do meropenem através da análise *in silico*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Pseudomonas aeruginosa* E IMPORTÂNCIA CLÍNICA

P. aeruginosa é um bastonete Gram-negativo, reto ou ligeiramente curvo, aeróbio restrito, com mobilidade através de um único flagelo. São bactérias não esporuladas que se caracterizam principalmente pela incapacidade de utilizar glicose e carboidratos como fonte de energia através da fermentação, degradando-os pela via oxidativa. Na grande maioria, são citocromo-oxidase positivas e produzem pigmentos hidrossolúveis que se difundem em meios de cultura. Desenvolvem-se bem entre 37 e 42°C e não toleram pH ácido (HILL, E.B.; HENRY, D.A.; SPEERT, 2007).

Este microrganismo faz parte da família *Pseudomonaceae*, que na sua maioria são microrganismos de vida livre. Podem infectar diversas espécies de plantas e animais, sendo somente algumas espécies patogênicas para o ser humano (CDC, 2014).

É comum a sua presença em unidades hospitalares, principalmente em equipamentos e utensílios médico-hospitalares como respiradores, nebulizadores, cateteres, sondas, soluções antissépticas, desinfetantes de uso terapêutico, entre outros. Assim, dependendo do procedimento realizado, das boas práticas do profissional de saúde e da condição imunológica do paciente a disseminação deste patógeno no ambiente hospitalar pode ser facilitada, podendo causar pneumonias, infecções do trato urinário, infecções da corrente sanguínea, infecções do sítio cirúrgico, infecções de pele principalmente nas lesões por queimaduras, entre outros (LYCZAK; CANNON; PIER, 2000). Qualquer paciente que esteja imunodeprimido ou tenha sido exposto a qualquer tipo de trauma está em risco para a colonização desta bactéria (JENNY; KINGSBURY, 2018).

Um estudo de metanálise observou que as infecções por *P. aeruginosa* multirresistente resultam em altas taxas de mortalidade em comparação com aquelas não multirresistentes. A maioria dos estudos analisados citou a corrente sanguínea como o principal local de infecção por *P. aeruginosa*, principalmente em unidades de terapia intensiva (UTIs). Observaram ainda que as infecções aumentaram os custos para os hospitais, a complexidade dos casos e prolongaram o tempo de hospitalização (DE MATOS et al., 2018). Um estudo brasileiro realizado no hospital universitário do estado do Pará também identificou a rota sanguínea de infecção como a mais frequente entre pacientes internados em UTIs (DE MATOS et al., 2016). Geralmente, as cepas de *P. aeruginosa* isoladas nestes locais apresentam percentuais de resistência mais elevados em relação a outras unidades, possivelmente devido a

transmissão destas entre os pacientes (FERREIRA, 2005).

A pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM) é a infecção mais comum em UTIs e o principal motivo de prescrição de antibióticos nesses locais. *P. aeruginosa* é uma das bactérias que mais causam esta complicação (RAMÍREZ-ESTRADA; BORGATTA; RELLO, 2016). Em um estudo que avaliou os microrganismos causadores de PAVM em UTIs foi observado que *P. aeruginosa* foi um dos patógenos mais frequentes, sendo que as cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes foram um fator dependente de morte hospitalar (TUMBARELLO et al., 2013).

P. aeruginosa também é capaz de causar infecções graves em pacientes queimados através da sua colonização em feridas de queimaduras. É considerada o agente infeccioso mais frequente em unidades de queimados (EROL et al., 2004; LARI; ALAGHEHBANDAN, 2000). O comprometimento da pele deixa o paciente suscetível a invasão de microrganismos. Nestes casos é bastante frequente uma infecção oportunista pela *P. aeruginosa* (REMPEL; TIZZOT; VASCO, 2011).

Pacientes com fibrose cística (FC) também estão mais suscetíveis a infecção pela *P. aeruginosa*. A fibrose cística é uma doença genética de caráter autossômico recessivo, crônica e progressiva, que atinge vários órgãos e sistemas do organismo. Esta deficiência genética altera o transporte de eletrólitos e cloretos que ocorre através da membrana plasmática das células epiteliais. Isso resulta principalmente em camadas de muco espessas, desidratadas e pegajosas no pulmão (MORADALI; GHODS; REHM, 2017). A alteração do ambiente pulmonar favorece a adaptação e persistência da *P. aeruginosa* nas vias aéreas, podendo permanecer até o fim da vida em quase 70% dos pacientes adultos. Esta infecção pode lesionar o epitélio pulmonar, bloquear progressivamente as vias aéreas, reduzir a função pulmonar e até mesmo causar insuficiência respiratória (PEREZ et al., 2012).

O microorganismo do estudo, se caracteriza principalmente pela múltipla resistência aos antimicrobianos existentes, o que dificulta a erradicação das infecções e elevam os índices morbidade e mortalidade quando comparadas a outros patógenos (OSMON et al., 2004). Devido a uma grande variedade nos mecanismos de adaptação, sobrevivência e resistência a múltiplas classes de antibióticos as infecções por cepas de *P. aeruginosa* podem ser fatais e estão surgindo em todo o mundo como uma ameaça à saúde pública. Uma perspectiva futura enfatiza a necessidade de esforços multidisciplinares internacionais colaborativos para traduzir o conhecimento atual em estratégias para prevenir e tratar infecções causadas por este patógeno, reduzir a taxa de resistência a antibióticos e evitar a disseminação de cepas resistentes (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

3.2 PATOGENIA E MECANISMOS DE VIRULÊNCIA

A produção de fatores de virulência é uma estratégia de sobrevivência dos patógenos para evitar a defesa imunológica do hospedeiro e progredir com a sua patogênese, geralmente na fase inicial da infecção aguda. A produção desses fatores é destrutiva para as células e tecidos do hospedeiro com uma piora no curso clínico das infecções. Durante a infecção aguda, uma variedade de moléculas citotóxicas é produzida pelas bactérias que prejudicam nos processos celulares do hospedeiro. Em contrapartida, as bactérias encontram respostas do sistema imunológico, como produção de compostos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio bem como um aumento da fagocitose (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

P. aeruginosa possui todas as grandes classes de fatores de virulência bacterianos. As fímbrias ou *pili*, promovem a aderência da bactéria aos receptores presentes na superfície das células do hospedeiro (IRVIN et al., 1989). A sua motilidade através do flagelo e espasmos através do *pili* estão associados a características virulentas (WINSTANLEY; O'BRIEN; BROCKHURST, 2016). Uma célula móvel é prontamente detectável pelo sistema imune do hospedeiro, seja pelos seus flagelos ou outros componentes de motilidade. Após serem reconhecidas, desencadeiam respostas inflamatórias e a fagocitose por macrófagos humanos (AMIEL et al., 2010).

O alginato ou cápsula mucoide é secretado pela *P. aeruginosa* atuando como mediador da aderência, além de dificultar os mecanismos de defesa do indivíduo. Este polímero de polissacarídeos confere a *P. aeruginosa* a capacidade de inibir a ligação de anticorpos, a fagocitose, a quimiotaxia por neutrófilos e a sua morte intracelular por leucócitos. Alguns isolados produzem em excesso deste polímero deixando as culturas com uma aparência mucoide (MAI et al., 1993).

Posterior a infecção inicial, a mudança para a menor virulência é uma estratégia de sobrevivência pela qual muitas bactérias patogênicas evitam estresses e condições adversas. Elas perdem a motilidade, se ligam a superfícies e formam agregados celulares ou microcolônias que são incorporadas em substâncias poliméricas extracelulares protegendo as bactérias do ambiente ao seu redor. Essas estruturas são chamadas de biofilmes (WEI e MA, 2013).

O biofilme é uma complexa estrutura de proteínas, polissacarídeos e DNA em uma matriz polimérica extracelular que confere aos patógenos uma extrema capacidade de persistência contra a fagocitose, estresse oxidativo, restrição de nutrientes/oxigênio, acúmulo de resíduos metabólicos, competições interespecíficas e agentes antimicrobianos convencionais

(OLSEN, 2015).

A formação de biofilme mucóide pela *P. aeruginosa* é a marca registrada de infecções crônicas e indicativo de progressão da doença e persistência a longo prazo, principalmente em pacientes com FC (MCDANIEL; PANMANEE; HASSETT, 2015). Além disso, bactérias formadoras de biofilme apresentam características diferentes de suas formas planctônicas de vida livre, como alta resistência ao sistema imunológico e aos antibióticos, o que tornam o biofilme uma fonte de infecções crônicas e persistentes (WEI ; MA, 2013).

Também existem fatores de virulência extracelulares secretados pela *P. aeruginosa* que facilitam o rompimento da membrana celular do hospedeiro, sendo elas: elastases, protease alcalina, fosfolipase C, neuraminidase, exoenzima S, lectina, endotoxinas e proteases como hemolisinas e exotoxinas. As exotoxinas compreendem proteínas efetoras que atuam diretamente na célula epitelial, resultando em respostas imune alteradas, lesão e morte da célula hospedeira (DRISCOLL; BRODY; KOLLEF, 2007).

3.3 TRATAMENTO E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

O tratamento para infecção por *P. aeruginosa* incluem a monoterapia ou a terapia combinada (PARK et al., 2012). Para isso, oito categorias de antibióticos podem ser utilizadas para o seu tratamento, sendo eles: aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, amicacina, netilmicina), carbapenêmicos (imipenem, meropenem), cefalosporinas (ceftazidima, cefepima), fluorquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina), penicilina com inibidores de β -lactamase (ticarcilina e piperacilina em combinação com ácido clavulânico ou tazobactam), monobactamas (aztreonam), fosfomicina e polimixinas (colistina, polimixina B). Os carbapenêmicos são considerados os fármacos de reserva, ou seja, são empregados como último recurso no tratamento de infecções hospitalares causadas por bactérias Gram-negativas resistentes aos β -lactâmicos ou a outros antibacterianos (STRATEVA; YORDANOV, 2009).

A resistência a múltiplas drogas (MDR) é definida como resistência a pelo menos três classes diferentes de antimicrobianos, incluindo carbapenêmicos (imipenem, meropenem), cefalosporinas antipseudomonais (ceftazidima e cefepima), quinolonas (ciprofloxacina), aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina) e inibidores de β -lactamase (piperacilina-tazobactam) (DE MATOS et al., 2018). Quando presente, essa resistência irá impactar diretamente na gravidade da infecção e no sucesso da antibioticoterapia selecionada (TUMBARELLO et al., 2011).

Apesar da diversidade de opções farmacológicas a *P. aeruginosa* é capaz de

desenvolver resistência a qualquer um dos fármacos citados acima, até mesmo aos carbapenêmicos. (BASSETTI et al., 2018). O arsenal de mecanismos moleculares que este patógeno utiliza para adquirir resistência tornam as opções terapêuticas cada vez mais limitadas para o tratamento das infecções (MORADALI; GHODS; REHM, 2017). Isso fez a Organização Mundial de Saúde publicar um documento considerando os isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos como uma das três espécies bacterianas de necessidade crítica para o desenvolvimento de novos antibióticos (WHO., 2017).

O constante surgimento de cepas multirresistentes faz a escolha do tratamento adequado para infecções pela *P. aeruginosa* ser um desafio para os médicos. A situação é mais grave em hospitais, pois já foram encontradas cepas resistentes a todos os antimicrobianos (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015).

Os principais mecanismos de resistência da *P. aeruginosa* podem ser classificados em resistência intrínseca, adquirida e adaptativa. A resistência intrínseca é caracterizada pela capacidade inata de uma bactéria em diminuir a eficácia de um antibiótico específico através de características estruturais ou funcionais (BLAIR et al., 2015). *P. aeruginosa* é capaz de possuir um alto nível de resistência intrínseca à maioria dos antibióticos, através da permeabilidade restrita da membrana externa, sistemas de efluxo que bombeiam antibióticos para fora da célula e produção de enzimas inativadoras de antibióticos como as β -lactamases (BREIDENSTEIN et al., 2011).

Ao contrário dos mecanismos intrínsecos, a resistência adquirida está relacionada ao contato com os antibióticos. A presença de compostos antibióticos pode induzir a mutações gênicas. Essa vantagem seletiva gera uma população bacteriana irreversivelmente resistente. A bactéria também pode adquirir os genes de resistência através da transferência horizontal dos mesmos (MUNITA; ARIAS, 2016).

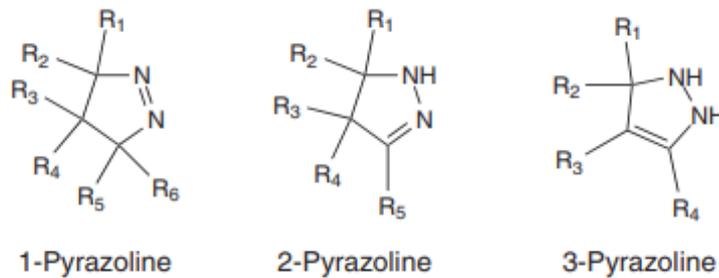
A resistência adaptativa envolve a formação de biofilme que servirá como uma barreira para limitar o acesso dos antibióticos às células bacterianas. O biofilme é formado após a infecção inicial no intuito de diminuir a virulência, escapar do sistema imune e permitir a persistência bacteriana no hospedeiro. Ele protege as bactérias do meio externo e as torna menos sensíveis a agentes antimicrobianos e a resposta imune do hospedeiro do que as bactérias cultivadas em suspensão aquosa livre (STEWART; COSTERTON, 2001).

Acredita-se que os tratamentos futuros provavelmente serão terapias combinadas, com a associação de novos compostos a fármacos tradicionais, resultando em uma maior eficácia e sucesso nos tratamentos contra este patógeno (PANG et al., 2019). Desta forma, é de extrema importância a descoberta de novos antibióticos ou alternativas terapêuticas para o tratamento

de infecções por *P. aeruginosa*.

Nas últimas décadas, os compostos heterocíclicos vêm sendo bastante estudados devido as descobertas de suas numerosas aplicações farmacêuticas (RAHMAN; SIDDIQUI, 2010; BOZOROV; ZHAO; AISA, 2019). Um destes compostos são os derivados de pirazolinas, que são caracterizados por apresentarem em sua estrutura um anel heterocíclico contendo cinco membros: dois átomos de nitrogênio e três carbonos adjacentes dentro do anel. Ainda mais, estes compostos apresentam apenas uma dupla ligação endocíclica e são de natureza básica (ELSHORA, 2000). Os compostos pirazolínicos fornecem um núcleo estrutural a molécula que possibilita a construção de uma enorme variedade de compostos biologicamente ativos (SHAABAN; MAYHOUB; FARAG, 2012). Existem três estruturas tautoméricas bem conhecidas para as pirazolinas: 1-pirazolina, 2-pirazolina (mais comum) e 3-pirazolina, conforme ilustrados na figura 1.

Figura 1: Estrutura tautomérica das pirazolinas



Fonte: (SHAABAN; MAYHOUB; FARAG, 2012).

Uma série propriedades farmacológicas dos compostos derivados de pirazolinas já foram descritas, entre elas, propriedades anticancerígenas, antifúngicas, antitumorais, antiepiléticas, antidepressivas, anti-inflamatórias e antimicrobianas. Devido a isso, pesquisas vêm sendo realizadas com compostos sintéticos derivados de pirazolinas na tentativa de descobrir novos fármacos com atividade antibacteriana (RAHMAN; SIDDIQUI, 2010; SHAABAN; MAYHOUB; FARAG, 2012; ASAD et al., 2020).

3.4 NOVOS ANTIMICROBIANOS

Desde a sua descoberta, os antibióticos revolucionaram a medicina no século passado e ajudaram a controlar a maioria das doenças bacterianas infecciosas. No entanto, o uso indevido e excessivo desses antibióticos levaram ao surgimento de fenômenos de resistência,

que agora são considerados pela OMS como uma das mais sérias ameaças à saúde global (WHO, 2017).

Entre os anos 1940-1960 vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias Gram positivas: b-lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, peptídeos, e outros (cloranfenicol, rifamicina B, clindamicina e polimixina B). Neste período apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado: isoniazida, trimetropim e metronidazol. Entre os anos 1960-1980 foram introduzidos os antibióticos semi-sintéticos eficazes para o tratamento de patógenos Gram positivos e Gram negativos, análogos aos antibióticos naturais já existentes. A maioria deles foi obtida a partir de protótipos naturais microbianos, como derivados b-lactâmicos (análogos de penicilina e cefalosporina, ácido clavulânico, aztreonam), análogos da tetraciclina, derivados aminoglicosídicos (gentamicina, tobramicina, amicacina). Entre os anos 1980-2000 as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos antibióticos foram a genômica e as triagens de coleções de compostos, em detrimento às triagens de produtos naturais microbianos. Porém, houve uma redução dramática na identificação de novos protótipos antibióticos, ao mesmo tempo em que ocorreu um aumento na incidência de resistência bacteriana (GUIMARÃES et al., 2010).

Após a “era de ouro dos antibióticos”, empresas farmacêuticas enfrentam grandes desafios na busca de novos antibióticos e compostos que tenham atividade antimicrobiana, especialmente frente às barreiras de penetração e mecanismos de efluxo em gram negativos, pois são bactérias que requerem altas doses de antibióticos, podendo trazer problemas de toxicidade (THEURETZBACHER et al., 2020). Além disso, desenvolver um novo antibiótico requer um custo muito elevado, com uma taxa de falha estimada de 95%, tornando pouco provável que a empresa tenha venha a ter lucratividade. Como os antibióticos mais antigos ainda são eficazes no tratamento da maioria das infecções, o principal uso dos novos antibióticos seria tratar infecções multirresistentes. Assim, seriam administrados como último recurso, o que resultaria em baixas vendas unitárias (ARDAL et al., 2020).

Os desafios do desenvolvimento clínico e comercialização de um medicamento de espectro estreito ou patógeno específico são grandes, como exemplificado pelo novo aminoglicosídeo plazomicina, que foi testado em pacientes com infecções por *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenem (principalmente *Klebsiella pneumoniae*). Foi extremamente difícil inscrever pacientes com os patógenos resistentes especificados, apesar de um grande número de pacientes serem rastreados (THEURETZBACHER et al., 2018). Consequentemente, novas opções de tratamento emergem como extremamente necessárias

para sair desse impasse, como terapias complementares que permitem aumentar o efeito dos antibióticos, visando a virulência ou regulação da expressão de genes de resistência, como o quorum-sensing (MULLER, 2022).

Assim, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para tratar infecções por *P. aeruginosa* ganhou mais atenção na última década, onde o FDA (Federal Drug Administration) aprovou alguns novos agentes antimicrobianos. Essas novas estratégias terapêuticas podem atuar isoladamente ou em combinação com terapias convencionais para combater infecções por *P. aeruginosa*, e incluem inibição de quorum sensing e lectinas bacterianas, bem como uso de quelação de ferro, terapia fágica, estratégia vacinal, uso de nanopartículas e peptídeos antimicrobianos (COYNE et al., 2022).

Entre esses, em 2007 o Doripenem foi aprovado para casos de infecção intra-abdominal complicada e infecção do trato urinário. Pertence a classe já conhecida dos carbapenêmicos (GREER, 2008; PATERSON, DEPESTEL, 2009). Em 2014, foi aprovada o ceftolozane-tazobactam (C/T) que é uma cefalosporina de geração avançada (ceftolozano) combinada com um inibidor de b-lactamase (tazobactam), projetado para superar os mecanismos de resistência de *P. aeruginosa* (CHO et al., 2015). Em 2015, a ceftazidima-avibactam (CZA), a qual combina uma cefalosporina antipseudomonas (ceftazidima) com o novo inibidor de diazabiciclooctano não-lactâmico/b-lactamase, (avibactam). Embora o avibactam sozinho não tenha atividade intrínseca, ele estende a atividade *in vitro* da ceftazidima para incluir mecanismos de resistência à *P. aeruginosa* (HIDALGO et al., 2016). Em 2016, outro novo tratamento contra *P. aeruginosa* MDR foi desenvolvido. Trata-se da combinação de imipenem, carbapenem, cilastatina e um inibidor da desidropeptidase renal, com o relebactam (I/R). O relebactam é um inibidor bicíclico da diazabiciclooctano b-lactamase de muitas b-lactamases classe A e classe C. Este novo antibiótico retém atividade contra *P. aeruginosa* com bomba de efluxo e mutações de perda de porina. Como resultado da inibição dessas b-lactamases, cepas de *P. aeruginosa* que não são suscetíveis ao imipenem podem se tornar suscetíveis ao I/R (ZHANEL et al., 2018). Em 2018 a Plazomicina foi aprovada pelo FDA, trata-se de um antibiótico aminoglicosídeo semi-sintético de última geração derivado sinteticamente do produto natural sisomicina. A plazomicina demonstra potente atividade *in vitro* contra patógenos bacterianos Gram-negativos e Gram-positivos e tem atividade semelhante à amicacina contra cepas de *P. aeruginosa* MDR (PANG et al., 2019). O cefiderocol é atualmente aprovado pela FDA para infecções do trato urinário complicadas em pacientes adultos com bactérias Gram-negativas suscetíveis, como uma opção de tratamento de última linha. É uma nova cefalosporina sideróforo, demonstra

cobertura Gram-negativa de amplo espectro e foi desenvolvido para combater Gram-negativos MDR, como *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a carbapenem. Seu novo mecanismo de ação envolve quelação com ferro férrico para utilizar sistemas de transporte de ferro bacteriano, aumentando as concentrações periplasmáticas em bactérias Gram-negativas (YAMANO, 2021).

O aumento do arsenal antipseudomonas pode ajudar a garantir a administração precoce de terapia apropriada, minimizando o desenvolvimento de resistência. No entanto, embora esses agentes tenham demonstrado alta atividade *in vitro* contra cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes, os estudos de vigilância demonstram a existência de uma grande variabilidade entre as cepas, provavelmente devido à variação regional dos mecanismos de resistência e fenótipos (COYNE 2022). Desta forma, mesmo com essas novas opções farmacológicas citadas acima, o surgimento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* MDR segue emergente, o que ratifica a necessidade de mais estudos para descobrir novas moléculas com potencial antimicrobiano.

3.5 ANÁLISE *in silico*

Durante os longos processos de descoberta e desenvolvimento de medicamentos, as estruturas moleculares são avaliadas de acordo com parâmetros muito diversos, orientando a seleção de quais produtos ou compostos químicos sintetizar, testar e promover, identificando e avaliando aqueles que apresentam a melhor chance de se tornar um medicamento promissor e eficaz para os pacientes. Contudo, esses processos trazem desvantagens quando comparados a análise *in silico*, como um alto custo para o desenvolvimento das pesquisas, uso de animais, tempo muito longo para conseguir obter um possível potencial antimicrobiano, entre outras desvantagens das análises *in vivo*. Parâmetros ADME (para Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) podem ser avaliados separadamente por métodos dedicados. A estimativa precoce de ADME na fase inicial de descoberta, reduz drasticamente as falhas relacionadas a farmacocinética nas fases clínicas. (HAY et al., 2014). Modelos realizados e avaliados computacionalmente têm sido reconhecidos como uma alternativa muito válida aos procedimentos experimentais para predição, especialmente nas etapas iniciais. (DAHLIN; INGLESE; WALTERS, 2015.) Para a investigação de novas moléculas ativas, estudos *in silico* vêm tendo cada vez mais importância por parte da indústria farmacêutica na predição de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção (ADME), toxicidade e

predições de alvos de moléculas que podem ter grande probabilidade de serem candidatas nas fases de desenvolvimento clínico. Existe uma gama de propriedades que é possível ser analisada, dentre elas a absorção oral, biodisponibilidade, penetração na barreira hematoencefálica, depuração e volume de distribuição, essas e outras propriedades do estudo *in silico* reduz o risco de problemas nos estágios finais, otimizando a triagem e testando moléculas de maneira mais clara e objetiva. (VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003.)

O trabalho pioneiro de Lipinski et al. onde examinaram compostos oralmente ativos definindo intervalos físico-químicos para alta probabilidade de ser um medicamento oral (ou seja, a semelhança com o medicamento). Essa chamada Regra de cinco delineou a relação entre os parâmetros farmacocinéticos e físico-químicos. (LIPINSKI et al., 2001). Os parâmetros relacionados a Regra dos cinco de Lipinski e colaboradores, preconiza que os valores das propriedades físico-químicas de peso molecular (P_m) ≤ 500 ; coeficiente de partição octanol/água (LogP) ≤ 5 ; número de átomos doadores de ligação de hidrogênio (Doa-H) ≤ 5 , número de átomos receptores de ligação de hidrogênio (Rec-H) ≤ 10 estão associados a 90% dos fármacos nos quais há a manutenção das atividades após administração por via oral. Além disso, as variáveis de número de ligações rotacionais (Rote^-) em valores menores que 10 e a área de superfície polar (TPSA) menor que 140 \AA^2 também são preditoras de boa biodisponibilidade pela via oral (RODRIGUES e COSTA, 2021).

4. PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

4.1 MANUSCRITO

O manuscrito foi submetido ao “BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES”, classificado de acordo com o Qualis Capes como periódico B2.



Novos compostos pirazolínicos com atividade frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes

Resumo

Pseudomonas aeruginosa, apesar de geralmente não causar doença em indivíduos imunocompetentes, é considerada uma bactéria letal e oportunista. Principalmente no ambiente hospitalar são isoladas cepas resistentes a todos os antibióticos disponíveis comercialmente, tornando o seu tratamento um desafio para os clínicos. *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos foram incluídas na lista da Organização Mundial de Saúde (OMS) entre as três espécies de bactérias com necessidade crítica para o desenvolvimento de novos antibióticos. Tendo em vista, a urgente necessidade em descobrir novos antibióticos ou alternativas terapêuticas para o tratamento dessas infecções multirresistentes por este patógeno este estudo avaliou a atividade antibacteriana de sete novos compostos derivados de pirazolinas em isolados clínicos multirresistentes de *P. aeruginosa* e estudou suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas através de ferramentas *in silico*. Foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima, citotoxicidade e através de análise *in silico*, foram determinadas propriedades teóricas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. O presente estudo relata sete compostos pirazolínicos como potenciais candidatos a novos antibacterianos frente a *P. aeruginosa*, principalmente as resistentes aos antibióticos carbapenêmicos. Os compostos foram relacionados a uma boa administração pela via oral e alta capacidade em ultrapassar a BHE, uma vez que a maioria dos fármacos disponíveis atualmente apresentam dificuldades em alcançar o SNC em concentrações suficientes para sucesso terapêutico. Mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de ação e a relação estrutura atividade dos compostos pirazolínicos e um possível sinergismo com antimicrobianos de primeira escolha no tratamento frente a isolados MDR de *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: Atividade Antimicrobiana; Derivados Pirazolínicos; Resistência; *Pseudomonas aeruginosa*.

Introdução

Pseudomonas aeruginosa, apesar de geralmente não causar doença em indivíduos imunocompetentes, é considerada uma bactéria letal e oportunista. Este bacilo Gram-negativo não fermentador (BGN-NF), ao longo de sua evolução e pela pressão seletiva ocasionada pelos antimicrobianos, foi aperfeiçoando seus fatores de virulência o que gerou a sua inclusão como microrganismo resistente a múltiplas drogas (do inglês *multidrug resistant* - MDR). (VARELA et al., 2021).

No ambiente hospitalar são isoladas cepas resistentes a todos os antibióticos disponíveis comercialmente, tornando o seu tratamento um desafio para os clínicos. (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015). *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos foram incluídas na lista da Organização Mundial de Saúde (OMS) entre as três espécies de bactérias com necessidade crítica para o desenvolvimento de novos antibióticos (WHO, 2017). Ela também faz parte do grupo ESKAPE que é um acrônimo empregado para agrupar os microrganismos que possuem alta resistência aos antibióticos e envolvidos frequentemente em infecções hospitalares, dos quais fazem parte: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp (ROSA et al., 2020).

Compostos heterocíclicos derivados de pirazolinias vêm sendo sintetizados pelas suas características de estabilidade, facilidade em realizar combinações químicas e arranjos moleculares e diversificadas atividades biológicas. Entre as propriedades farmacológicas já descritas desse tipo de moléculas figuram as antifúngicas, antitumorais, antiepiléticas, antidepressivas, anti-inflamatórias e antibacterianas (ASAD et al., 2020; KUMAR et al., 2009; RAHMAN; SIDDIQUI, 2010; SHAABAN; MAYHOUB; FARAG, 2012).

A descoberta e o desenvolvimento de fármacos envolvem diversas etapas que além de onerosas financeiramente, podem levar muito tempo até que um novo fármaco seja introduzido no mercado. Frente a isso, diversas ferramentas computacionais (*in silico*) têm sido propostas a fim de reduzir o tempo e os altos custos envolvidos neste processo. Estas tecnologias permitem associar predições computacionais aos ensaios pré-clínicos laboratoriais (*in vitro* e *in vivo*), tornando estes modelos custo-efetivos na pesquisa e desenvolvimento de fármacos (MACHIUS, 2003). Além disso, alguns pontos demonstram ainda mais as vantagens de associar essas análises *in silico* aos ensaios pré-clínicos: redução na quantidade de compostos a serem testados nas etapas de triagem, uma vez que as análises permitem inferir compostos promissores para o prosseguimento das etapas; exclusão da necessidade de

novos processos de síntese, os quais podem ser delineados a partir de análises de estruturalidade *in silico*; desenho racional de novos compostos, através da avaliação racional das estruturas moleculares de maneira a potencializar a atividade biológica e/ou reduzir efeitos indesejados. Embora estejam disponíveis a bastante tempo, esse tipo de metodologia ainda é considerado como ferramenta essencial ao estudar potenciais novos fármacos. Como exemplo, cita-se o cenário da pandemia Covid-19, em que o uso de estudos *in silico* possibilitaram a triagem rápida de compostos com potencial atividade contra o SARS-CoV-2 (BIEMBENGUT; DE SOUZA, 2020). A indústria farmacêutica reconhece a importância e faz uso dessas ferramentas computacionais nos estágios iniciais do desenvolvimento de um medicamento (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017a).

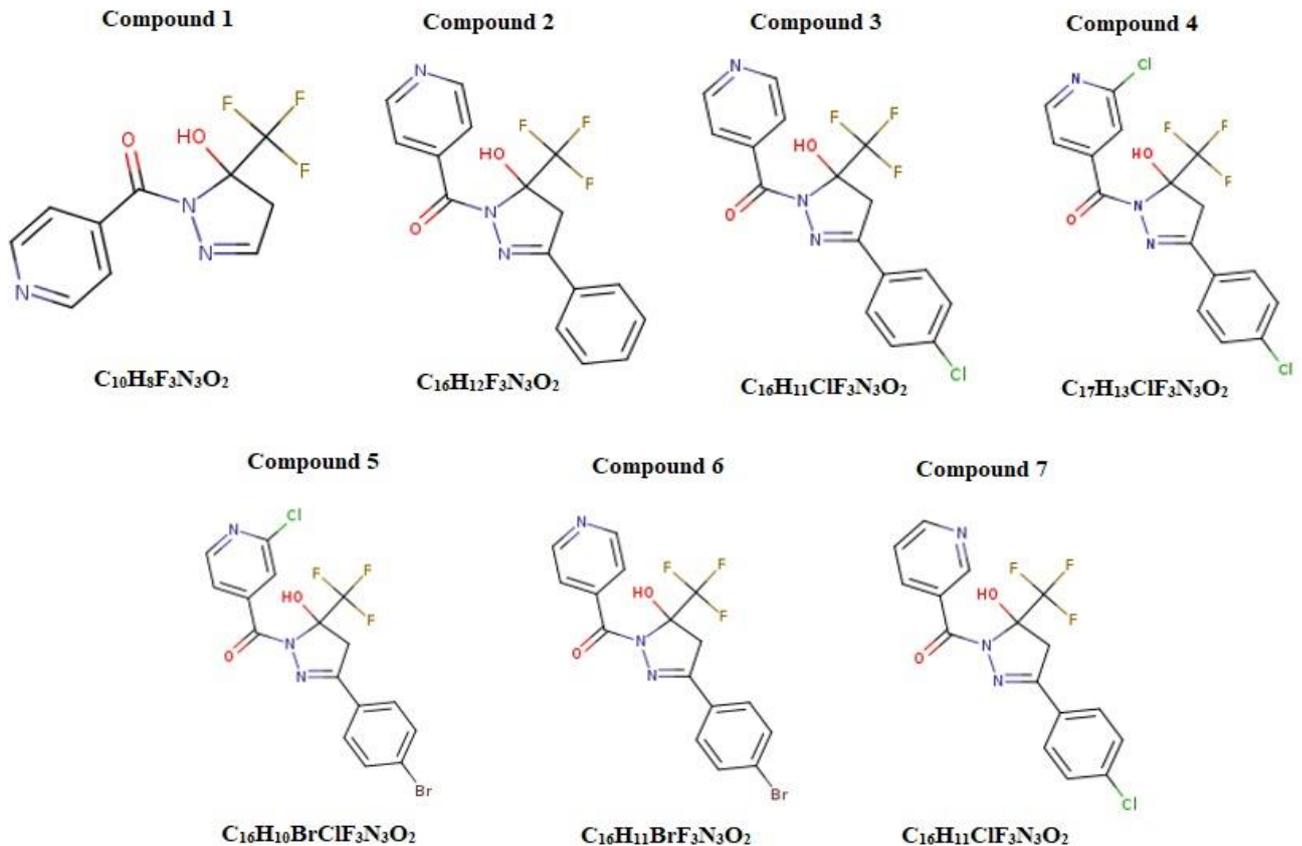
Frente ao exposto acima, este estudo teve como objetivo, avaliar a atividade antibacteriana de sete novos compostos derivados de pirazolininas em isolados clínicos multirresistentes de *P. aeruginosa* e estudar suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas utilizando ferramentas *in silico*.

Metodologia

Síntese dos compostos pirazolínicos

O presente artigo descreve a avaliação microbiológica frente a cepas de *P. aeruginosa* para sete compostos pirazolínicos inéditos trifluormetil-substituídos (1–7) (figura 1), os quais tem sido previamente obtidos sinteticamente pelo Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (BONACORSO et al, 2003; BONACORSO et al, 2005; NIVARINI, 2008). Compostos 1–7 foram purificados por recristalização em metanol ou acetona, caracterizados fisicamente como sólidos brancos, estáveis ao ar à condições normais de temperatura (CNTP), com pontos de fusão na faixa de 144°C–202 °C, e estruturalmente por meio de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C em DMSO-*d*₆ como solvente, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM); tendo sua pureza final comprovada por análise elementar CHN. As características moleculares de cada composto estão descritas na figura 1. Os compostos 1–7 foram armazenados sob refrigeração e ao abrigo da luz em solução de DMSO (10 mg/mL), sendo diluídos em água destilada estéril somente no momento da execução dos experimentos microbiológicos.

Figura1 - Caracterização dos compostos pirazolínicos



Fonte: obtido pelo próprio autor em <http://www.swissadme.ch/index.php>. **Composto 1:** 5-Hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(isonicotinoil) pirazol; **composto 2:** 5-Hidroxi-3-fenil-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(isonicotinoil) pirazol; **composto 3:** 5-Hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(isonicotinoil) pirazol; **composto 4:** 5-Hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(2-cloro isonicotinoil) pirazol; **composto 5:** 5-Hidroxi-3-(4-bromofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(2-cloro isonicotinoil) pirazol; **composto 6:** 5-Hidroxi-3-(4-bromofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(isonicotinoil) pirazol; **composto 7:** 5-Hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(nicotinoil) pirazol.

Identificação, seleção e armazenamento dos isolados clínicos

Foi utilizada uma cepa *American Type Culture Collection* (ATCC 15442) e isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes atendidos em um Hospital Universitário no período de janeiro de 2019 a janeiro de 2020, os quais foram identificados através do sistema automatizado Vitek® 2 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França). Entre estes, foram selecionados três, classificados como multirresistentes (MDR) por apresentar resistência a no mínimo quatro classes de antimicrobianos: carbapenêmicos, (meropenem e/ou imipenem),

aminoglicosídeos (gentamicina), quinolonas (ciprofloxacino) e cefalosporinas (ceftazidima, ceftriaxona, cefepime e/ou cefuroxima). (Tabela 1). Todos os isolados clínicos selecionados foram armazenados em *Tryptic Soy Broth* (TSB) contendo 15% de glicerol a -70°C e, para a execução dos experimentos *in vitro*, foram repicados em meio *Mueller Hinton* (MH) sólido e incubados por 24 horas para o preparo da suspensão bacteriana e inóculo bacteriano.

Tabela 1 - Perfil de susceptibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* utilizados no estudo.

Isolado	Origem	Pip/T	Ceft	Cefe	Imip	Mero	Genta	Cipro	Norf	Amp	Am/S	Cefu	Cefo	Ceftr	Nitro
ATCC 15442 ^a	-	S	-	-	-	S	-	S	-	-	-	-	-	-	-
36 ^b	Urina	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-
79 ^b	Urina	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	R	R	-	R
94 ^b	Sangue	-	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R	-

Legendas: Pip/T: piperacilina/tazobactam; Ceft: ceftazidima; Cefe: cefepima; Imip: imipenem; Mero: meropenem; Genta: gentamicina; Cipro: ciprofloxacino; Norf: norfloxacino; Amp: ampicilina; Am/S: ampicilina/sulbactam; Cefu: cefuroxima; Cefo: cefoxetina; Ceftr: ceftriaxona; Nitro: nitrofurantoina; S: sensível; R: resistente.

O perfil de susceptibilidade foi determinado pelo sistema automatizado Vitek® 2 (bioMérieux, France) no laboratório de análises clínicas do HUSM.

Os isolados clínicos foram obtidos de pacientes atendidos no HUSM.

^aCepa padrão de *P. aeruginosa*.

^b Código do isolado clínico MDR.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular (adaptado de CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI, 2016). Para a determinação da atividade bacteriana o inóculo foi preparado em uma proporção de 1:100 em caldo *Mueller Hinton*, com concentração da suspensão bacteriana de acordo com a escala *McFarland* 0,5 ou seja, $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços contendo caldo *Mueller Hinton*. Os compostos (concentrações variaram 0,2 a 0,00156 mg/mL) e o inóculo bacteriano na concentração de $0,5 \times 10^6$ UFC/mL, com incubação a 35 ± 2 °C por 24 horas em aerobiose, foi adicionado 15 µL do indicador de viabilidade celular e incubado por cerca de 90 minutos. A CIM (definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano) foi determinada através da oxirredução da resazurina, onde visualmente é possível determinar a viabilidade bacteriana (coloração rosa) ou inibição do crescimento microbiano (manutenção da coloração azul). Os experimentos foram conduzidos em triplicata e controles de esterilidade dos compostos, do meio de cultura e viabilidade de cada isolado avaliado foi incluído em todos os experimentos.

Ensaio de Citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada em ensaios com a linhagem celular de fibroblasto (VERO). Em uma placa de 96 poços, 200µL de suspensão celular (na concentração de $3,4 \times 10^5$ células/mL) foram cultivados em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubado, para adesão das células, por 24 h à 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ (SNEWIN et al., 1999). Após esse período, as células aderidas foram expostas a diferentes concentrações de compostos pirazolínicos (0,2 a 0,08 mg/mL) e a placa foi novamente incubada a 37°C com 5% de CO₂. Para determinar a concentração do composto capaz de manter a viabilidade de 50% das células (IC₅₀) foram adicionados 30µL de resazurina 0,01% e após 6 h de incubação, a fluorescência foi medida utilizando o aparelho Thermo Plate TP-Reader BioTek™ ELx800™ a 620nm e realizado o cálculo do IC₅₀ (% Inibição = $100 - (\text{DO das células expostas} / \text{DO das células não expostas}) \times 100$) (ANSAR AHMED et al., 1994). Os experimentos foram conduzidos em triplicata e controles de esterilidade e viabilidade celular foram adicionados em cada replica experimental.

Propriedades teóricas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME)

As características teóricas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção (ADME), físico-químicas, farmacocinéticas e efeitos toxicológicos dos compostos (1-7) e do meropenem (antimicrobiano controle) foram determinadas através da análise *in silico*, usando os softwares livres: Molinspiration, Swiss ADME (Daina et al., 2017) e OSIRIS Property Explorer. Esses modelos permitem avaliar os parâmetros relacionados a Regra dos cinco de Lipinski e colaboradores (1997), a qual preconiza que os valores das propriedades físico-químicas de peso molecular (P_m) ≤ 500 ; coeficiente de partição octanol/água (LogP) ≤ 5 ; número de átomos doadores de ligação de hidrogênio (Doa-H) ≤ 5 , número de átomos receptores de ligação de hidrogênio (Rec-H) ≤ 10 estão associados a 90% dos fármacos nos quais há a manutenção das atividades após administração por via oral. Além disso, as variáveis de número de ligações rotacionais (Rote°) em valores menores que 10 e a área de superfície polar (TPSA) menor que 140 Å também foram preditoras de boa biodisponibilidade pela via oral (RODRIGUES e COSTA, 2021)

Também foram observadas características farmacocinéticas de absorção gastrointestinal, capacidade de penetrar na barreira hematoencefálica e capacidade inibitória das cinco isoformas do citocromo P450 (CYP450): CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19, CYP1A2 CYP2C9. Em relação à toxicidade, foram avaliados os riscos de efeitos tumorigênicos mutagênicos, carcinogênicos, irritantes e no sistema reprodutivo (DAINA et al., 2017).

Aspectos éticos

Esta pesquisa seguiu os preceitos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde referente à pesquisa com seres humanos e foi aprovada no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria sob número de CAAE 38850614.4.00005346.

Resultados

Todos os compostos pirazolínicos demonstraram atividade antimicrobiana a pelo menos um dos isolados de *P. aeruginosa* MDR testados (Tabela 2). Entretanto, nenhum dos compostos foi ativo contra a cepa padrão susceptível utilizada no estudo. Os valores de CIM dos compostos com atividade foram iguais a 0,2 mg/mL. Os compostos 1 e 5 apresentaram a

menor atividade antimicrobiana, contra 1/3 dos isolados. Os compostos 2, 4, 6 e 7 exerceram atividade antimicrobiana semelhantes entre si contra 2/3 dos isolados. Surpreendentemente o composto 3 apresentou atividade antimicrobiana a todos os isolados clínicos testados (tabela 2).

A IC_{50} variou de 0,0081mg/mL (composto 4) a 0,4577mg/mL (composto 5). O composto 3, embora tenha exercido atividade antimicrobiana frente a todos os isolados clínicos, teve a terceira maior toxicidade (0,0251 μ g/mL) quando comparado aos demais.

Tabela 2: Atividade dos compostos derivados de pirazolininas contra *P. aeruginosa* e IC_{50} na linhagem celular VERO (mg/mL)

Compostos	ATCC 15442 ^a	CIM ^c			IC ₅₀ ^d
		36 ^b	79 ^b	94 ^b	Linhagem Vero
1	> 0,2	> 0,2	> 0,2	= 0,2	0,088
2	> 0,2	= 0,2	> 0,2	= 0,2	0,0684
3	> 0,2	= 0,2	= 0,2	= 0,2	0,0251
4	> 0,2	= 0,2	> 0,2	= 0,2	0,0081
5	> 0,2	= 0,2	> 0,2	> 0,2	0,4577
6	> 0,2	= 0,2	> 0,2	= 0,2	0,161
7	> 0,2	= 0,2	> 0,2	= 0,2	0,0213

^aCepa padrão de *P. aeruginosa*.

^b Código do isolado MDR.

^cConcentração inibitória mínima do crescimento bacteriano em mg/mL.

^d Concentração inibitória de 50% das células em mg/mL.

A tabela 3 demonstra os resultados teóricos físico-químicos, farmacocinéticos e toxicológicos do meropenem (antibiótico utilizado no tratamento contra *P. aeruginosa* MDR) e dos compostos pirazolínicos estudados. Em relação ao perfil físico-químico, todas as substâncias avaliadas neste estudo estavam de acordo com a regra dos cinco de Lipinski (LIPINSKI, 2004). Na análise farmacocinética todos os compostos evidenciaram uma alta absorção pela via gastrointestinal e demonstraram capacidade em penetrar a barreira hematoencefálica, com exceção do meropenem, antimicrobiano testado que apresentou baixa absorção gastrointestinal e baixa capacidade em ultrapassar a barreira hematoencefálica. Em relação a capacidade inibitória das cinco isoformas do citocromo P450, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19, CYP1A2 e CYP2C9, os compostos 4 e 5 foram capazes de inibir a isoforma

CYP1A2. Os compostos 2-7 foram capazes de inibir a isoforma CYP2C19. Os compostos 4-6 inibiram a isoforma CYP2C9, enquanto que nenhum composto foi capaz de inibir as isoformas CYP2D6 e CYP3A4. O meropenem não apresentou capacidade de inibir qualquer isoforma. Nenhum dos compostos avaliados, incluindo o antimicrobiano controle, foram associados ao risco de mutagenicidade e de efeitos irritantes. Em contrapartida, a maioria das substâncias (2-6) apresentaram alto risco de tumorigênese, e alto risco de efeitos reprodutivos, com exceção do meropenem e do composto 7 que se apresentaram isentos de qualquer risco relacionado a toxicidade (Tabela 3).

Tabela 3: perfil físico-químico e farmacocinético obtidos pela plataforma swissADME e perfil toxicológico obtido pela plataforma OSIRIS (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>)

	Perfil físico-químico						Perfil farmacocinético									Perfil toxicológico			
	Pm	LogP	TPSA (Å ²)	Doa H	Ace H	Rote ⁻	AGi	BHE	Inibe CYP1A2	Inibe CYP2C19	Inibe CYP2C9	Inibe CYP2D6	Inibe CYP3A4	AS	Mutag	Tumorog	Efeitos irritantes	Efeitos Reprod	
M	383,46	1,82	135,48	3	6	6	Baixa	Não	Não	Não	Não	Não	Não	5,40	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	
1	259,18	1,03	65,79	1	7	3	Alto	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	3,10	Nenhum	Alto Risco	Nenhum	Alto Risco	
2	335,28	1,95	65,79	1	7	4	Alto	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	3,35	Nenhum	Alto Risco	Nenhum	Alto Risco	
3	369,73	2,22	65,79	1	7	4	Alto	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	3,35	Nenhum	Alto Risco	Nenhum	Alto Risco	
4	407,17	2,40	65,79	1	7	4	Alto	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	3,41	Nenhum	Alto Risco	Nenhum	Alto Risco	
5	448,62	2,34	65,79	1	7	4	Alto	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	3,43	Nenhum	Alto Risco	Nenhum	Alto Risco	
6	414,18	2,33	65,79	1	7	4	Alto	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	3,39	Nenhum	Alto Risco	Nenhum	Alto Risco	
7	369,73	2,18	65,79	1	7	4	Alto	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	3,32	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	

Legenda: compostos pirazolínicos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7), meropenem (M), massa molecular (Pm), coeficiente de partição octanol/água (LogP), área de superfície polar (TPSA), número de átomos doadores de ligação de hidrogênio (Doa H), número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio (Ace H), número de ligações rotativas (Rote⁻), absorção gastrointestinal (AGi), a penetração na barreira hematoencefálica (BHE), dados sobre a inibição das enzimas do citocromo P450 (CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19 e CYP1A2), mutagênese (Mutag), tumorigênese (Tumorog) e efeitos reprodutivos (Efeitos reprod).

Discussão

Este estudo demonstrou a atividade antimicrobiana de sete novos compostos derivados de pirazolinas contra cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, com diferentes valores de CIM. Compostos derivados de pirazolinas têm sido explorados e associados a diversas propriedades farmacológicas, dentre elas, antimicrobiana (ASAD et al., 2020; ISMAIL et al., 2019). A grande maioria desses estudos demonstrou atividade antimicrobiana em cepas padrão de *P. aeruginosa*, diferentemente deste grupo de pesquisa, que demonstrou atividade de compostos de pirazolina para isolados MDR de *P. aeruginosa*. A resistência a todos os antibióticos anti-pseudomonas atualmente disponíveis é frequente, justificando a inclusão de *P. aeruginosa* em uma lista de patógenos com necessidade crítica de descoberta de novas alternativas farmacológicas (PETITJEAN et al., 2021; WHO., 2017).

Considerando o atual cenário de pandemia, é recorrente que pacientes com Covid-19 sejam diagnosticados com coinfeções bacterianas pulmonares durante os períodos de internação, fato que tem aumentado consideravelmente o uso de antimicrobianos, consequentemente a resistência bacteriana. Os agentes causadores dessas infecções secundárias são muitas vezes bactérias multirresistentes que aproveitam a imunidade enfraquecida da infecção viral inicial. Esse fato favorece a seleção de cepas multirresistentes, além de causar piora no prognóstico do paciente, reduzindo ainda mais as alternativas farmacêuticas e enfatizando a necessidade de descoberta de novos medicamentos (RAWSON et al., 2020; MIRZAEI et al., 2020).

Curiosamente, os compostos testados não demonstraram atividade antimicrobiana contra a cepa padrão, exercendo ação somente nos isolados multirresistentes, o que nos faz suspeitar que o mecanismo de ação das moléculas possa estar direcionado aos mecanismos de resistência de *P. aeruginosa*. Com exceção da cepa padrão, o composto 3 demonstrou ação sobre todos os isolados MDR e os compostos 2, 4, 6 e 7 em 2/3 dessas, o que permite sugerir uma ação adjuvante, potencializando e aumentando o espectro de ação dos fármacos comumente disponíveis na clínica. Apesar do manejo de infecções por *P. aeruginosa* concentrar-se na prevenção quando possível e início imediato de terapia antimicrobiana, dependendo do cenário clínico se faz necessário uma terapia combinada para garantir atividade contra *P. aeruginosa*, principalmente nas formas MDR (REYNOLDS; KOLLEF, 2021).

Em relação a CIM, o composto 3 apresentou a maior atividade antimicrobiana e apresentou a terceira maior citotoxicidade e não ficou isento de efeitos toxicológicos (alto

risco para efeitos de tumorigênese e reprodutivos) enquanto que o composto 5 foi o menos ativo porém com a menor citotoxicidade. Quimicamente, o grupamento cloro-fenil presente no composto 3 parece estar relacionado a um aumento de atividade e citotoxicidade. Em contrapartida, o grupamento bromo-fenil parece diminuir a atividade e citotoxicidade. O rearranjo molecular unindo cloro e bromo ao grupamento fenil em uma mesma estrutura poderia diminuir a citotoxicidade mantendo a atividade, porém isso não foi determinado neste estudo.

Em relação aos resultados farmacocinéticos e toxicológicos os compostos analisados não violaram a regra dos cinco, instituída por Lipinski. Os parâmetros de Lipinski são frequentemente utilizados nesse tipo de estudo para prever a biodisponibilidade oral das moléculas (CHRISTOPHER A. LIPINSKI, FRANCO LOMBARDO, BERYL W. DOMINY, 1997). Além desses parâmetros, o número de ligações rotacionais esteve menor que 10 (entre 3 e 4) e a TPSA esteve menor que 140 Å (65,79), o que ratificou uma boa biodisponibilidade oral dos compostos analisados.

A previsão *in silico* das moléculas aqui analisadas, com ressalvas e possíveis rearranjos moleculares nos permite sugerir-las como potenciais candidatos a fármacos a serem utilizados pela via oral com boa permeabilidade através de membranas biológicas e alta absorção por via gastrintestinal. Os métodos computacionais são ferramentas amplamente utilizadas na triagem inicial quando buscamos um novo fármaco alvo-direcionado. A estratégia de modelagem molecular (*in silico*) permite abordar diferentes análises para chegar a níveis mais ideais referentes às propriedades que influenciam na administração de medicamentos, principalmente pela via oral (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017b). Considerando que os fármacos amplamente utilizados para cepas MDR são pela via injetável devido a sua pouca biodisponibilidade oral, a atividade antimicrobiana contra cepas MDR e a alta absorção pelo trato gastrointestinal das moléculas testadas neste estudo podem constituir uma alternativa pela via oral para melhorar a comodidade posológica de um candidato a fármaco para *P. aeruginosa* MDR, especialmente quando trata-se de uma infecção comunitária.

Além da boa disponibilidade pela via oral e a boa permeabilidade em membranas biológicas, este estudo demonstrou que todos os compostos foram aptos a atravessar a barreira hematoencefálica. Os fármacos comumente utilizados para infecções do SNC por *P. aeruginosa* MDR são injetáveis, pouco ativos no sistema nervoso central (SNC) (MENSA et al., 2018). Apesar de rara, a meningite por *P. aeruginosa* está associada a altas taxas de mortalidade e ao aumento da utilização de recursos pelas instituições hospitalares. O

tratamento da meningite por *P. aeruginosa* representa um grande desafio devido ao escasso número de medicamentos disponíveis para seu tratamento e também pela má difusão da maioria dos agentes antimicrobianos no SNC através da barreira hematoencefálica (BHE) (KARAGOZ et al., 2014; RODRÍGUEZ-LUCAS et al., 2020). Geralmente, nesses casos se dispõe para o uso de medicamentos como cefalosporinas, quinolonas, carbapenêmicos, colistina ou aminoglicosídeos. No entanto, nos últimos anos, o surgimento e a disseminação de cepas multirresistentes (MDR) de *P. aeruginosa*, especialmente aquelas resistentes aos carbapenêmicos vem dificultando o sucesso terapêutico. Além da susceptibilidade das cepas, o tratamento eficaz irá depender da capacidade de atingir concentrações ativas de antibióticos no SNC em toxicidade aceitável (MAGIORAKOS et al., 2012). Assim, pode-se supor teoricamente que todos os compostos desse estudo poderiam ser uma alternativa pela via oral, com efeito sinérgico a outros antibióticos, pois teoricamente foram capazes de atravessar a BHE em concentrações suficientes para ação contra cepas de *P. aeruginosa* MDR (composto 3).

A inibição das isoenzimas do sistema citocromo P 450 (CYP450), é uma das principais causas de interações medicamentosas, efeitos adversos ou tóxicos devido à menor purificação e acúmulo do fármaco ou de seus metabólitos no organismo (KIRCHMAIR et al., 2015). Nesse estudo somente o composto 1 não inibiu nenhuma das isoformas avaliadas, porém com menor atividade em relação aos demais. O composto 3 demonstrou ter a maior atividade e inibiu somente a isoforma CYP2C19. Embora o sistema CYP450 tenha mais de 50 enzimas, seis delas (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 e CYP3A5) metabolizam 90% dos medicamentos sendo as duas enzimas mais significativas CYP3A4 e CYP2D6. É comum que fármacos disponíveis tenham ação sobre estas enzimas, porém, clinicamente devem ser avaliados quanto as reações significativas que podem causar reações adversas imprevistas ou falhas terapêuticas (LYNCH; PRICE, 2007).

Os potenciais riscos de toxicidade dos compostos analisados foram avaliados no programa Osiris. Somente o composto 7 esteve isento de qualquer risco, com atividade em 2/3 das cepas de *P. aeruginosa*. O composto 3, embora tenha apresentado a melhor atividade teve alto risco de tumorigênese e de efeitos reprodutivos. Embora a resposta clínica possa ser diferente, os estudos *in silico* são bastante úteis para avaliar os riscos de toxicidade e indicar quando uma estrutura desenhada pode ser prejudicial (RODRIGUES; COSTA, 2021).

Conclusão

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, acredita-se que os novos compostos derivados de pirazolininas analisados neste estudo e nunca antes testados em cepas de *P. aeruginosa* MDR podem servir como uma alternativa farmacêutica a ser considerada no tratamento dessas infecções. A boa administração pela via oral, assim como a alta capacidade em ultrapassar a BHE deve ser considerada, uma vez que a maioria dos fármacos disponíveis atualmente apresentam dificuldades em alcançar o SNC em concentrações suficientes para sucesso terapêutico. Assim, o presente estudo relata sete compostos pirazolínicos, com sua caracterização físico-química, farmacocinética e toxicológica, como potenciais candidatos a novos antibacterianos frente a *P. aeruginosa*, principalmente as resistentes aos antibióticos carbapenêmicos. Com respeito aos efeitos toxicológicos elevados das moléculas estudadas, modificações em sua estrutura química poderão ser planejadas para diminuir este efeito.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES) sob a bolsa 001.

Disponibilidade do código

Os conjuntos de dados gerados durante e/ou analisados durante o estudo atual estão disponíveis com o autor correspondente mediante solicitação razoável.

Conformidade com os padrões éticos

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

Referências

Asad M, Arshad MN, Oves M, Khalid M, Khan SA, Asiri AM, et al. N-Trifluoroacetylated pyrazolines: Synthesis, characterization and antimicrobial studies. *Bioorg Chem* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103842>.

Biembengut IVS BTAC. Coagulation modifiers targeting sars-cov-2 main protease mpro for covid-19 treatment: An in silico approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2020;115:1–4. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200179>.

Bonacorso HG, Oliveira MR, Costa MB, Da Silva LB, Wastowski AD, Zanatta N, et al. Regiospecific one-pot synthesis of new trifluoromethyl substituted heteroaryl pyrazolyl ketones. *J Heterocycl Chem* 2005. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570420424>.

Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. M100S Performance Standards for Antimicrobial. 2016.

Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* 2017;7:1–13.

Ismail AH, Abdula AM, Tomi IHR, Al-Daraji AHR, Baqi Y. Synthesis, Antimicrobial Evaluation and Docking Study of Novel 3,5-Disubstituted-2-Isoxazoline and 1,3,5-Trisubstituted-2-Pyrazoline Derivatives. *Med Chem (Los Angeles)* 2019;17:462–73. <https://doi.org/10.2174/1573406415666191107121757>.

Karagoz G, Kadanali A, Dede B, Sahin OT, Comoglu S, Altug SB, et al. Extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ventriculitis and meningitis treated with intrathecal colistin. *Int J Antimicrob Agents* 2014;43:93–4. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.09.007>.

Kirchmair J, Göller AH, Lang D, Kunze J, Testa B, Wilson ID, et al. Predicting drug metabolism: Experiment and/or computation? *Nat Rev Drug Discov* 2015;14:387–404. <https://doi.org/10.1038/nrd4581>.

Kumar S, Bawa S, Drabu S, Kumar R, Gupta H. Biological Activities of Pyrazoline Derivatives -A Recent Development. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2009. <https://doi.org/10.2174/157489109789318569>.

Lipinski, C. A. Lombardo, F. Dominy, B. W. Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;23:3–25.

Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician* 2007;76:391–6.

Machius M. Structural biology: A high-tech tool for biomedical research. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003;12:431–8. <https://doi.org/10.1097/00041552-200307000-00012>.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin*

Microbiol Infect 2012;18:268–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.

Mensa J, Barberán J, Soriano A, Llinares P, Marco F, Cantón R, et al. Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish society of chemotherapy. *Rev Esp Quimioter* 2018;31:78–100.

Mirzaei R, Goodarzi P, Asadi M, Soltani A, Aljanabi H ali abraham, Jeda AS, et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. *IUBMB Life* 2020;72:2097–111. <https://doi.org/10.1002/iub.2356>.

Petitjean M, Juarez P, Meunier A, Daguindau E, Puja H, Bertrand X, et al. The rise and the fall of a *Pseudomonas aeruginosa* endemic lineage in a hospital. *Microb Genomics* 2021;7. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000629>.

Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>.

Rahman MA, Siddiqui AA. Pyrazoline Derivatives: A worthy insight into the recent advances and potential pharmacological activities. *Int J Pharm Sci Drug Res* 2010.

Rawson TM, Zhu N, Ranganathan N, Gilchrist M, Satta G, Cooke G, et al. Bacterial and fungal co-infection in individuals with coronavirus: A rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing Timothy. *Clin Infect Dis* 2020;71:2459–68.

Reynolds D, Kollef M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs* 2021;81:2117–31. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>.

Rodrigues J; Costa ED. Previsão in silico ADME / T de novos inibidores potenciais contra o vírus da dengue In silico ADME / T prediction of novel potential inhibitors against dengue virus Predicción in silico ADME / T de nuevos inhibidores potenciales contra el virus del dengue 2021;2021:1–11.

Rodríguez-Lucas C, Fernández J, Martínez-Sela M, Álvarez-Vega M, Moran N, Garcia A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial meningitis in neurosurgical patients with intraventricular catheters: Therapeutic approach and review of the literature. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2020;38:54–8. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.04.003>.

Rosa TF da, Foletto VS, Serafin MB, Bottega A, Hörner R. Estratégias emergentes para tratamento de ESKAPE. *Saúde (Santa Maria)* 2020;46:1–5. <https://doi.org/10.5902/2236583443061>.

Shaaban MR, Mayhoub AS, Farag AM. Recent advances in the therapeutic applications of pyrazolines. *Expert Opin Ther Pat* 2012. <https://doi.org/10.1517/13543776.2012.667403>.

Snewin VA, Gares MP, Ó Gaora P, Hasan Z, Brown IN, Young DB. Assessment of immunity to mycobacterial infection with luciferase reporter constructs. *Infect Immun* 1999. <https://doi.org/10.1128/iai.67.9.4586-4593.1999>.

Varela MF, Stephen J, Lekshmi M, Ojha M, Wenzel N, Sanford LM, et al. BacVarela, M. F. et al. (2021) 'Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents'.terial Resistance to Antimicrobial Agents 2021.

WHO. Global Priority List Of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery And Development Of New Antibiotics. 2017. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70222-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70222-1)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho foram evidenciadas as vantagens dos compostos derivados de pirazolíνας frente à isolados clínicos multirresistente de *Pseudomonas aeruginosa*. No manuscrito intitulado “**Novos compostos pirazolínicos com atividade frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes**” foi relatado que os compostos apresentaram uma boa atividade antibacteriana, podendo serem considerados como uma promissora alternativa farmacêutica no tratamento das infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* MDR.

Em relação aos resultados farmacocinéticos e toxicológicos os compostos analisados não violaram a regra dos cinco, instituída por Lipinski. Além desses parâmetros, o número de ligações rotacionais esteve menor que 10 (entre 3 e 4) e a TPSA esteve menor que 140 Å (65,79), o que ratificou uma boa biodisponibilidade oral dos compostos analisados. Os fármacos disponíveis atualmente para cepas MDR, são utilizados pela via injetável devido sua pouca biodisponibilidade oral, apresentando dificuldade em alcançar o SNC, fazendo das moléculas testadas neste estudo uma alternativa pela via oral para melhorar a comodidade posológica de um candidato a fármaco para *P. aeruginosa* MDR.

Assim, o presente estudo demonstra que estes compostos derivados de pirazolíνας frente a microorganismos MDR de *Pseudomonas aeruginosa*, com sua avaliação antibacteriana, citotóxica, caracterização físico-química, farmacocinética e toxicológica, potenciais candidatos a novos antibacterianos frente a *P. aeruginosa*, principalmente as resistentes aos antibióticos carbapenêmicos.

6. REFERÊNCIAS

- AGGEN, J. B. *et al.* Synthesis and spectrum of the neoglycoside ACHN-490. **Antimicrob Agents Chemother** v. 54, p. 4636–4642, 2010.
- ALMEIDA DA SILVA, P. E. *et al.* Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of 3-substituted 5-hydroxy-5-trifluoro[chloro]methyl-4,5-dihydro-1H-1-(isonicotinoyl) pyrazoles. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 2, p. 139–144, 2008.
- AMIEL, E. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming motility and is independent of flagellum expression. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 7, p. 2937–2945, 2010.
- ÅRDAL, C. *et al.* Antibiotic development — economic, regulatory and societal challenges. **Microbiology**. v. 18, p. 267-274, 2020.
- ASAD, M. *et al.* N-Trifluoroacetylated pyrazolines: Synthesis, characterization and antimicrobial studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 99, p. 1-29, 2020.
- BASSETTI, M. *et al.* How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Drugs in Context**. v. 7, p. 1-18, 2018.
- BIEMBENGUT, I. V.; SOUZA T. A. Coagulation modifiers targeting sars-cov-2 main protease mpro for covid-19 treatment: An in silico approach. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 115, p. 1-4, 2020.
- BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**. v. 13, p. 42-51, 2015.
- BOZOROV, K.; ZHAO, J.; AISA, H. A. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 16 p. 3511-3531, 2019.
- BREIDENSTEIN, E. B. M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**. v. 19, n. 8, p. 419-426, 2011.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Health care associated Infections**. 2014. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/index.html>. Acesso em 20 mai. 2022.
- CHATTERJEE, M. *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. **Int J Med Microbiol**. v. 306, p. 48–58, 2016.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **M100S Performance Standards for Antimicrobial**. 2016. Disponível em: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>. Acesso em 01 mar. 2022.
- COYNE, A. J. K. *et al.* Therapeutic Strategies for Emerging Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Dis Ther**. v. 11, p. 661-662, 2022.

CHO, J. C.; FIORENZA, M. A.; ESTRADA, S. J. Ceftolozane/tazobactam: a novel cephalosporin/b-lactamase inhibitor combination. **Pharmacotherapy**. v. 35, n. 7, p. 701–715, 2015.

DAHLIN, J. L.; INGLESE, J.; WALTERS, M. A. Mitigação do risco na descoberta de drogas pré-clínicas acadêmicas. **Nature Rev. Drug Discov**. v. 14, p. 279-294, 2015.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci Rep**, v. 7, n. 42717, p. 1-13, 2017.

DE MATOS, E. C. O. *et al.* Clinical and microbiological features of infections caused by pseudomonas aeruginosa in patients hospitalized in intensive care units. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 49, n. 3, p. 305-311, 2016.

DE MATOS, E. C. O. *et al.* Mortality in patients with multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infections: A meta-analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 51, n. 4, p. 415-420, 2018.

DRISCOLL, J. A.; BRODY, S. L.; KOLLEF, M. H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. **Drugs**. v. 67, n. 3, p. 351-368, 2007.

ELSHORA, A. I. Crystal and Molecular Structure of 3-Hydrazino-1- Hydrazinothio-Carbonyl Pyrazoline (TNT3). **Egypt. J. Sol**. v. 23, n. 2, p. 251–258, 2000.

EROL, S. *et al.* Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. **Burns**. v. 30, n. 4, p. 357-361, 2004.

FERREIRA, L. L. Estrutura clonal e multirresistência em Pseudomonas aeruginosa. 113 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2005.

GOMES, M. Z. R. *et al.* Outbreaks, persistence, and high mortality rates of multiresistant Pseudomonas aeruginosa infections in a hospital with AIDS-predominant admissions. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 15, n. 4, p. 312-322, 2011.

GREER, N.D. Doripenem (Doribax): the newest addition to the carbapenems. **Proc (Bayl Univ Med Cent)**. v. 21, n. 3, p. 337–341, 2008.

GUIMARAES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**. v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HAY, M. *et al.* Taxas de sucesso de desenvolvimento clínico para drogas experimentais. **Biotecnologia da Natureza**. v. 32, p. 40-51, 2014.

HIDALGO, J. A.; VINLUAN, C. M.; ANTONY, N. Ceftazidime/avibactam: a novel cephalosporin/nonbeta-lactam beta-lactamase inhibitor for the treatment of complicated urinary tract infections and complicated intra-abdominal infections. **Drug Des Devel Ther**. v 10, p. 2379–2386, 2016.

HILL, E. B.; HENRY, D. A.; SPEERT, D. P. Pseudomonas. **Manual of Clinical Microbiology**. v. 1, p. 34-748. 2007.

HIRSCH, E. B. *et al.* A model to predict mortality following Pseudomonas aeruginosa bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 72, p. 97-102, 2012.

HONG, D. J. *et al.* Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa. **Infection and Chemotherapy**. v. 47, p. 81-97, 2015.

IRVIN, R. T. *et al.* Characterization of the Pseudomonas aeruginosa pilus adhesin: confirmation that the pilin structural protein subunit contains a human epithelial cell-binding domain. **Infection and immunity**. v. 57, p. 3720-3726, 1989.

JENNY, M.; KINGSBURY, J. Properties and Prevention: A Review of Pseudomonas aeruginosa. **Journal of Biology and Medical Research**, v. 2, n. 3, p. 1-8, 2018.

KUMAR, S. *et al.* Biological Activities of Pyrazoline Derivatives - A Recent Development. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**. v. 4, p. 154-163, 2009.

LARI, A. R.; ALAGHEHBANDAN, R. Nosocomial infections in an Iranian burn care center. **Burns**. v. 26, p. 737-740, 2000.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Abordagens experimentais e computacionais para estimar a solubilidade e permeabilidade na descoberta de drogas e configurações de desenvolvimento. **Av. Medicamento. Entrega Rev.** v. 46, p. 3-26, 2001.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: Lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**. v. 2, p. 1051-1060, 2000.

MACHIUS M. Structural biology: A high-tech tool for biomedical research. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. v. 12, p. 431-438, 2003.

MAI, G. T. *et al.* Suppression of lymphocyte and neutrophil functions by Pseudomonas aeruginosa mucoid exopolysaccharide (alginate): Reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. **Infection and Immunity**. v. 61, p. 559-564, 1993.

MCDANIEL, C. T.; PANMANEE, W.; HASSETT, D. J. An Overview of Infections in Cystic Fibrosis Airways and the Role of Environmental Conditions on Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation and Viability. **Cystic Fibrosis in the Light of New Research**, 2015.

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. Pseudomonas aeruginosa Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Frontiers in cellular and infection microbiology**. v. 7, n. 39, p. 1-29, 2017.

MORROW, C. S. Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1) Mediates Resistance to Mitoxantrone via Glutathione-Dependent Drug Efflux. **Molecular Pharmacology**. v. 69, n. 4, p. 1499-1505, 2006.

MULLER, C. Antibiotics and Antimicrobials Resistance: Mechanisms and New Strategies to Fight Resistant Bacteria. **Antibiotics**. v.11, 1-3, 2022.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance Clinical Microbiology. v. 4, n. 2, p. 1-37, 2016.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 34, p. 877-886, 2015.

OSMON, S. *et al.* Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. **Chest**. v. 125, n. 2, p. 607-601, 2004.

PANG, Z. *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**. v. 137, p. 177-192, 2019.

PATERSON, D. L.; DEPESTEL, D. D. Doripenem. **Clin Infect Dis**. v. 49, p. 291–298, 2009.

PARK, S. Y. *et al.* Impact of adequate empirical combination therapy on mortality from bacteremic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **BMC Infectious Diseases**. v. 12, n. 308, p. 1-6, 2012.

PAVAN, F. R. *et al.* Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti - *Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, n. 5, p. 1898-1905, 2010.

PEREZ, L. R. R. *et al.* When the resistance gets clingy: *Pseudomonas aeruginosa* harboring metallo- β -lactamase gene shows high ability to produce biofilm. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 31, n. 5, p. 711-714, 2012.

PILLAI, S. K.; MOELLERING, J. R. C.; ELIOPOULOS, G. M. Antimicrobial combinations. In: LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 5th. ed. Philadelphia, PA. p. 365–440, 2005.

POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 45, n. 6, p. 568-585, 2015.

RAHMAN, M. A.; SIDDIQUI, A. A. Pyrazoline Derivatives: A worthy insight into the recent advances and potential pharmacological activities. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**. v. 2, n. 3, p. 165-175, 2010.

RAMÍREZ-ESTRADA, S.; BORGATTA, B.; RELLO, J. *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management. **Infection and Drug Resistance**. v. 9, p. 7-18, 2016.

REMPEL, L. C. T.; TIZZOT, M. R. P. A; VASCO, J. F. M. Incidência de infecções bacterianas em pacientes queimados sob tratamento em hospital universitário de Curitiba. **Revista Bras. Queimaduras**. v. 10, n. 1, p. 3-9, 2011.

RODRIGUES J; COSTA E. D. Previsão in silico ADME / T de novos inibidores potenciais contra o vírus da dengue. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 4, p. 1-11, 2021.

- SHAABAN, M. R.; MAYHOUB, A. S.; FARAG, A. M. Recent advances in the therapeutic applications of pyrazolines. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 22, n. 3, p. 253-291, 2012.
- STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**. v. 358, n. 9276, p. 135-138, 2001.
- STRATEVA, T.; YORDANOV, D. Pseudomonas aeruginosa - A phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 1133-1148, 2009.
- THEURETZBACHER, U.; PAUL, M. Developing a new antibiotic for extensively drug-resistant pathogens: the case of plazomicin. **Clin. Microbiol.** v. 24, p. 1231–1233, 2018.
- THEURETZBACHER, U. *et al.* The global preclinical antibacterial pipeline. **Microbiology**. v. 18, p. 275-285, 2020.
- TUMBARELLO, M. *et al.* Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa bloodstream infections: risk factors and mortality. **Epidemiology and Infection**. v. 139, n. 11, p. 1740-1749, 2011.
- TUMBARELLO, M. *et al.* Clinical outcomes of Pseudomonas aeruginosa pneumonia in intensive care unit patients. **Intensive Care Medicine**. v. 38, n. 4, p. 682-692, 2013.
- VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nat Rev Drug Discov**. v. 2, p. 192-204, 2003.
- WEI, Q.; MA, L. Z. Biofilm matrix and its regulation in Pseudomonas aeruginosa. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, n. 10, p. 20983-21005, 2013.
- WHO. **Global Priority List Of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery And Development Of New Antibiotics World Health Organization (WHO) 2017**.
- WINSTANLEY, C.; O'BRIEN, S.; BROCKHURST, M. A. Pseudomonas aeruginosa Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. **Trends in Microbiology**. v. 24, n. 5, p. 327-337, 2016.
- ZAVASCKI, A. P. *et al.* The influence of metallo- β -lactamase production on mortality in nosocomial Pseudomonas aeruginosa infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 58, n. 2, p. 387-392, 2006.
- ZHANEL, G. G. *et al.* Imipenem-relebactam and meropenem-vaborbactam: two novel carbapenem-b-lactamase inhibitor combinations. **Drugs**. v. 78, n. 1, p. 65–98, 2018.
- YAMANO, Y. *In vitro* activity of cefiderocol against a broad range of clinically important gram-negative bacteria. **Clin Infect Dis**. v. 69, p. S544–51, 2021.