



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DÉBORA FEITOSA MUNIZ

DERIVADOS SEMICARBAZÔNICOS E TIOSSEMICARBAZÔNICOS
ASSOCIADOS A ANTIBIÓTICOS INIBEM β -LACTAMASE E BOMBAS DE
EFLUXO EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus*

Recife
2022

DÉBORA FEITOSA MUNIZ

**DERIVADOS SEMICARBAZÔNICOS E TIOSSEMICARBAZÔNICOS
ASSOCIADOS A ANTIBIÓTICOS INIBEM β -LACTAMASE E BOMBAS DE
EFLUXO EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus***

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para a obtenção do título de Mestre (a) em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Teresinha Gonçalves da Silva

Recife

2022

M966d	Muniz, Débora Feitosa. Derivados semicarbazônicos e tiossemicarbazônicos associados a antibióticos inibem β-lactamase e bombas de efluxo em cepas de <i>staphylococcus aureus</i> / Débora Feitosa Muniz – 2023. 63 p. : il. Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2023. Inclui referências. 1. Antibacterianos. 2. Infecções. 3. <i>Staphylococcus aureus</i>. Silva, Teresinha Gonçalves da (orientadora). II. Título.
615	CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023 - 151)

DÉBORA FEITOSA MUNIZ

**DERIVADOS SEMICARBAZÔNICOS E TIOSSEMICARBAZÔNICOS
ASSOCIADOS A ANTIBIÓTICOS INIBEM β -LACTAMASE E BOMBAS DE
EFLUXO EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus***

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para a obtenção do título de Mestre (a) em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

APROVADA EM: 14/12/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Teresinha Gonçalves da Silva (Presidente/Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Cícera Datiane de Moraes Oliveira Tintino (Co-orientadora)

Universidade Regional do Cariri (URCA)

Prof.^a Dr.^a Gláucia Manoella de Souza Lima (Titular interna)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino (Titular externo)

Universidade Regional do Cariri (URCA)

Prof.^a Dra.^a Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba (Suplente interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes (Suplente interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho a minha mãe (Ana Maria), as minhas irmãs (Dara, Daniela, Gabriela e Larissa) e ao meu filho (João Miguel).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus por me conceder força e determinação em todos os momentos e por ter chegado até aqui.

A minha mãe, Ana Maria, agradeço por todo amor e por me encorajar a estudar sempre e me ensinar a ser uma pessoa boa e justa.

As minhas irmãs Dara, Daniela, Gabriela e Ana Larissa, por toda ajuda quando precisei e por estarem sempre comigo.

Ao meu filho, João Miguel, por trazer alegria para minha vida e ser o motivo principal de cada objetivo alcançado. E a minha sobrinha Bella. Amo vocês!

Aos meus amigos Isabel, Lucas e Renata, por terem tido toda paciência do mundo durante os experimentos de gastroproteção. Principalmente a minha duplinha, Isabel, por toda ajuda durante o mestrado, foi muito importante nessa etapa, não sei como teria sido sem você.

Ao professor Dr. Irwin, por ter disponibilizado o laboratório e por toda ajuda dos seus alunos. Muito obrigada!

Aos meus amigos do LMBM, Raimundo por ter tomado a frente e coordenado os testes, você foi essencial. E também a Priscilla e Carol, obrigada por toda ajuda.

Aos professores Dr. Henrique Douglas e Dr. Saulo, por terem disponibilizado o laboratório e por todo conhecimento compartilhado. Vocês sempre fazendo parte da minha vida acadêmica, sou muito grata por tudo e por sempre me acolherem tão bem. Obrigada!

A minha co-orientadora Dra. Datiane, que sempre contribuiu com o seu conhecimento desde a graduação. Um ser de muita luz, de uma paciência enorme e sempre tão disposta a ensinar, te agradeço por tudo e espero que a gente possa trabalhar ainda mais em um futuro próximo. A melhor co-orientadora!

A minha orientadora prof. Dra. Teresinha que sempre foi maravilhosa comigo, que me acolheu mesmo de longe e sem nos conhecermos. Não foi uma caminhada fácil, desde o início foi complicado desenvolver nosso projeto, muitas mudanças aconteceram, em meio a isso tive bebê e a senhora me ajudou muito nessa fase. O que importa é que no final deu tudo certo, tivemos bons resultados e no futuro espero que possamos trabalhar ainda mais. Peço desculpas se houve alguma falha minha e muito obrigada por fazer parte do Biofarmatox.

Ao professor Dalci José Brondani por ter fornecido as moléculas para este trabalho.

A Rilvan do PPGCF, por toda ajuda e orientações.

A Fundação de Amparo à Pesquisa (FACEPE), pelo apoio financeiro.

Gratidão!!!

“Qualquer coisa é possível se você tiver coragem.”

(ROWLING, 2012)

RESUMO

Bombas de efluxo presentes em *Staphylococcus aureus* é um dos principais mecanismos causadores de resistência a antibióticos. Este micro-organismo é responsável por muitas infecções hospitalares e devido a sua facilidade em causar doenças e até morte do hospedeiro, é tido como um problema de saúde pública a nível mundial. Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de um fármaco que seja eficaz contra bactérias multirresistentes e que tenha poucos efeitos colaterais. No presente estudo, foram testados seis compostos derivados semicarbazônicos e tiosemicarbazônicos, VH10, VH01, VH26, LS04, LS14 e LS26 frente às cepas K4414, K4100 e K2068 com sistemas de efluxo, QacA/B, QacC e MepA respectivamente, sendo K4414 produtora de β -lactamase. Para avaliar a atividade antibacteriana direta e a inibição de β -lactamase, foi realizado o método de microdiluição em caldo e verificada a concentração inibitória mínima (CIM). Para avaliação da capacidade de inibição de bomba de efluxo foi utilizada a CIM das substâncias em concentração sub-inibitória, associadas aos antibióticos ampicilina, oxacilina e ciprofloxacina e brometo de etídio. Todos os compostos apresentaram valores de CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ quando testada sua atividade antibacteriana direta. Porém, em associação com o antibiótico, pode-se observar que houve atividade potencializadora significativa, principalmente do composto VH01 e VH10. Frente à cepa K4414 de *S. aureus*, esses derivados conseguiram reduzir a CIM para 32 e 406 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, quando associados ao antibiótico. Frente à cepa K4100, o VH01 e VH10 apresentaram CIM de 203,2 $\mu\text{g/mL}$ associados ao antibiótico. Frente à cepa K2068, o VH10 destacou-se por apresentar CIM de 64 $\mu\text{g/mL}$ associado ao antibiótico e brometo. As substâncias VH01 e VH10 demonstraram que podem atuar como componentes potencializadores de antibióticos. Estudos posteriores podem ser realizados a fim de determinar seu mecanismo de ação específico, podendo vir a ser uma alternativa para a indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Antibacterianos; Bomba de efluxo; Infecções; Resistência bacteriana; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Efflux pumps present in *Staphylococcus aureus* is one of the main mechanisms causing antibiotic resistance. This microorganism is responsible for many nosocomial infections and due to its ability to cause disease and even death of the host, it is considered a public health problem worldwide. Therefore, it is necessary to develop a drug that is effective against multidrug-resistant bacteria and has few side effects. In the present study, six compounds derived from semicarbazonic and thiosemicarbazonic acid were used, namely: VH10, VH01, VH26, LS04, LS14 and LS26 against strains K4414, K4100 and K2068 with efflux systems, QacA/B, QacC and MepA respectively, K4414 being a β -lactamase producer. To evaluate the direct antibacterial activity and the inhibition of β -lactamase, the broth microdilution method was performed and the minimum inhibitory concentration (MIC) was verified. In order to evaluate the ability to inhibit the efflux pump, the MIC of the substances in sub-inhibitory concentration was used, associated with the antibiotics ampicillin, oxacillin and ciprofloxacin and ethidium bromide. All compounds showed MIC values $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ when tested for their direct antibacterial activity. Already in association with the antibiotic, it can be observed that there was a significant potentiating activity mainly by the compound VH01 and VH10. Against the K4414 strain of *S. aureus*, these derivatives managed to reduce the MIC to 32 and 406 $\mu\text{g/mL}$, respectively, when associated with the antibiotic. Against the K4100 strain, they had a MIC of 203.2 $\mu\text{g/mL}$ associated with the antibiotic. Against the K2068 strain, VH10 stood out for reducing the MIC to 64 $\mu\text{g/mL}$ associated with the antibiotic and bromide. Substances VH01 and VH10 demonstrated that they can act as potentiating components of antibiotics. Further studies can be carried out in order to determine its specific mechanism of action and may become an alternative for the pharmaceutical industry.

Keywords: Antibacterials; efflux pump; Infections; Bacterial resistance; *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Mecanismos de resistência bacteriana.
- Figura 2** Estrutura geral das semicarbazonas (X = O) e das tiosemicarbazonas (X = S); R1, R2, R3 e R4 = H, grupos alquila ou arila.
- Figura 3** Padronização dos inóculos e preenchimento das placas de microdiluição.
- Figura 4** Microdiluição seriada com os compostos.
- Figura 5** Microdiluição com antibióticos e placa controle.
- Figura 6** Avaliação da capacidade sinérgica e de inibição de β -lactamase pelos compostos VH10 ao LS14 frente a cepa de *S. aureus* SA K4414, associadas à ampicilina.
- Figura 7** Avaliação da capacidade de inibição da bomba de efluxo QacA/B pelos compostos VH10 ao LS14 frente a cepa de *S. aureus* SA K4414, em comparação ao controle brometo de etídio.
- Figura 8** Avaliação da capacidade sinérgica e de inibição de bomba de efluxo pelos compostos VH10 ao LS14 frente a cepa de *S. aureus* SA K4100, associadas à oxacilina.
- Figura 9** Avaliação da capacidade de inibição da bomba de efluxo QacC pelos compostos VH10 ao LS14 frente a cepa de *S. aureus* SA K4100, em comparação ao controle brometo de etídio.
- Figura 10** Avaliação da capacidade sinérgica e de inibição de bomba de efluxo pelos compostos VH10 ao LS14 frente a cepa de *S. aureus* K2068, associadas à ciprofloxacina.

Figura 11 Avaliação da capacidade de inibição da bomba de efluxo MepA pelos compostos VH10 ao LS14 frente a cepa de *S. aureus* SA K2068, em comparação ao controle brometo de etídio.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Estrutura dos derivados semicarbazônicos e tiosemicarbazônicos sintetizados pelo LABSINFA – UFPE.
- Tabela 2** Atividade antibacteriana direta dos compostos e antibióticos em cepas de *Staphylococcus aureus* portadora de bomba de efluxo (µg/mL).

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABC: *ATP-binding cassette*

BHI: *Brain Heart Infusion Broth*

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CCCP: Carbonilcianeto 3-clorofenil-hidrazina

CPZ: Clorpromazina

DMSO: Dimetilsulfóxido

EPs: *Efflux Pump Inhibitors*

EtBr: Brometo de Etídio

HIA: *Heart Infusion Ágar*

MATE: *Multidrug and Toxic Compound Extrusion*

MDR: *Multiple Drug Resistance*

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

MFS: *Major Facilitator Superfamily*

NorA: Proteína de efluxo para fluoroquinolonas.

OMS: Organização Mundial da Saúde

RND: *Resistance-Nodulation-cell Division*

SMR: *Small Multidrug Resistance*

TetA: Proteína de efluxo ativo para Tetraciclina

TetK: Proteína de efluxo ativo para Tetraciclina

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.2	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	21
2.3	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA POR BOMBA DE EFLUXO.....	22
2.4	BOMBAS DE EFLUXO.....	25
2.4.1	<i>Bomba de efluxo QacA/B</i>	25
2.4.2	<i>Bomba de efluxo QacC</i>	26
2.4.3	<i>Bomba de efluxo MepA</i>	27
2.5	β -LACTAMASE.....	27
2.6	SEMICARBAZONAS E TIOSSEMICARBAZONA.....	28
2.6.1	<i>Atividades biológicas das semicarbazonas</i>	29
2.6.2	<i>Atividades biológicas das tiossemicarbazonas</i>	30
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS DERIVADOS SEMICARBAZÔNICOS E TIOSSEMICARBAZÔNICOS.....	32
4.2	CEPAS BACTERIANAS.....	33
4.3	SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS.....	33
4.4	MEIOS DE CULTURA.....	34
4.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	34

4.6	VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE B-LACTAMASE E DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA.....	36
4.7	VERIFICAÇÃO DA INIBIÇÃO DE B-LACTAMASE EM QacA/B E DAS BOMBAS DE EFLUXO QacC E MepA PELA REDUÇÃO DA CIM DO ANTIBIÓTICO.....	36
4.8	VERIFICAÇÃO DA INIBIÇÃO DAS BOMBAS DE EFLUXO QacA/B, QacC E MepA PELA REDUÇÃO DA CIM DO BROMETO DE ETÍDIO.....	37
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1	ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	39
5.2	VERIFICAÇÃO DA INIBIÇÃO DE β -LACTAMASE E DAS BOMBAS DE EFLUXO QacA/B, QacC e MepA.....	40
6	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus*, apesar de ser encontrado na microbiota do corpo humano, está relacionado com aproximadamente 45% das infecções na população mundial, além de ser uma das principais causas de infecções hospitalares. Cepas desse microrganismo podem ser encontradas nas fossas nasais e pele, não prejudicando o organismo em homeostase, mas causa sérios problemas aos imunossuprimidos (OLIVEIRA; CAVALCANTE; RIBEIRO, 2021; OMS, 2017). A patogenicidade dessa bactéria é de difícil tratamento, visto que possuem mecanismos como bombas de efluxo que dificulta o tratamento e acaba desenvolvendo resistência a muitos antibióticos (PIECHOTA et al. 2018).

O gênero *Staphylococcus*, é responsável por uma série de doenças, possuindo facilidade em adquirir resistência a praticamente todos os antibióticos através de mutações em seus genes ou pela aquisição de genes resistentes de outras bactérias (HOLDEN et al., 2004; LIMA et al., 2015). Em geral, mutação no genoma bacteriano leva uma alteração no sítio alvo do antibiótico, enquanto a resistência por aquisição de genes de resistência envolve a destruição ou inativação do antibiótico (ALÓS, 2015; RODRÍGUEZ-NORIEGA et al., 2014).

S. aureus possui um amplo conjunto de fatores de evasão e manipulação do sistema imunológico, que podem promover adesão aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro e danificar suas células e proteger a bactéria do sistema imunológico, fato esse relacionado à aquisição de diversas formas de resistência (DE FREITAS et al., 2013; ZECCONI; SCALI, 2013).

A resistência antibacteriana contra fármacos disponíveis no mercado vem crescendo em todo o mundo, causando um grave problema para a saúde humana. Um dos fatores que contribuem para este problema é o uso indevido de antimicrobianos e isso tem preocupado os órgãos mundiais de saúde que buscam por medidas eficientes que diminuam essa resistência e assim solucionem o problema (OMS, 2017).

O crescente número de casos de resistência bacteriana não está ocorrendo de forma isolada no planeta, essa resistência tem ocorrido pelo uso inadequado de antibióticos pela população, sem o mínimo controle ou consulta prévia aos profissionais de saúde qualificados (DE VARGAS et al., 2004; VESTERGAARD; FREES; INGMER, 2019; WILLIANS; LEMKE, 2002).

O uso excessivo e incorreto dos antibióticos seleciona as cepas mais resistentes, que são responsáveis por diversos tipos de infecções como endocardite, bacteremia e até infecções mais severas (HOLDEN et al., 2004). A resistência bacteriana tem levado a comunidade

científica a investigar a corrida entre medicamento e microrganismos, pois desde a década de 1980 o número de antimicrobianos em fase de desenvolvimento diminuiu consideravelmente, enquanto a resistência dos microrganismos tem crescido de forma desenfreada (PIECHOTA et al., 2018).

As bactérias desenvolveram vários mecanismos para lidar com substâncias tóxicas e estresses metabólicos, incluindo os agentes antibacterianos. Entre esses mecanismos estão a expressão de bombas de efluxo (COSTA et al., 2013).

As bombas de efluxo são proteínas transmembranares capazes de conduzir antibióticos para fora da célula, mantendo as concentrações intracelulares em baixos níveis, proporcionando assim, sobrevivência ao microrganismo, podendo levar à resistência. Essas bombas de efluxo podem ser encontradas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e possuem capacidade de transportar diferentes substratos, podendo ser específicas para um determinado composto químico ou para diversos tipos de medicamentos e toxinas. Bactérias utilizam-se desse sistema de efluxo para facilitar sua colonização e sobrevivência do microrganismo no hospedeiro (TENOVER, 2006; THAMMAVONGSA et al., 2015).

Outro mecanismo de resistência é a produção de enzimas β -lactamases, relatadas como importante mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, que hidrolisam o anel β -lactâmico através da quebra da ligação amida, perdendo a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (ALFEI; ZUCCARI, 2022). Para superar a resistência dos β -lactâmicos à β -lactamase, têm sido usadas duas estratégias bacterianas, podendo ocorrer pela modificação da estrutura do antibiótico de forma que não tenha mais substrato para a enzima hidrolisar ou pela inibição da enzima por uma substância que seja estruturalmente relacionado ao substrato β -lactâmico (PROCOP et al, 2018). O sulbactam tem sido utilizado como inibidor de β -lactamase, onde ele se liga irreversivelmente às β -lactamases como substratos suicidas e mantendo-as inativas (ALFEI; ZUCCARI, 2022). A associação de um agente β -lactâmico e um inibidor de β -lactamase tem mostrado ser promissor, visto que essa associação diminui a CIM do antibiótico.

Muitos antibióticos existentes no mercado apresentam algum efeito colateral ou podem estimular a resistência bacteriana pela seleção das bactérias mais adaptadas, principalmente em indivíduos imunodeprimidos. As opções de fármacos antibacterianos disponíveis muitas vezes têm desenvolvido algum tipo de resistência, principalmente para bactérias multirresistentes, estes podem apresentar elevada toxicidade ou um alto custo. Com isso, o aumento da resistência e a incidência de infecções levaram a comunidade científica a buscar novos compostos que fossem eficazes e que tratassem esses microrganismos multirresistentes

(KHAN; AHMAD; CAMEOTRA, 2013).

Os compostos químicos sintetizados a partir de semicarbazonas vêm se destacando nas pesquisas por apresentar amplo perfil farmacológico, sendo conhecidos como compostos com capacidade quelante em que heteroátomos que estão presentes na cadeia agem como sítios de coordenação e estes podem se ligar a vários metais de transição (JOSHI et al., 2004). As semicarbazonas sofrem uma diminuição de atividade biológica quando ocorre à substituição do enxofre por oxigênio, quando comparadas com o análogo tiossemicarbazonas, entretanto, as semicarbazonas demonstram boa atividade como agentes antichagásicos, hipnóticos, anticonvulsivantes, herbicidas e pesticidas (BERALDO, 2004).

Portanto, este trabalho visa o estudo de derivados semicarbazônicos e tiossemicarbazônicos como possível atividade antimicrobiana e/ou inibidoras de bombas de efluxo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* possui cerca de 33 espécies, dentre elas 17 podem ser encontradas em estipes de amostras biológicas humanas (DOS SANTOS et al., 2007). Esse gênero está entre as principais causa de infecções com manifestações clínicas, sendo conhecido por sua virulência e por sua capacidade em desenvolver resistência a vários compostos antibacterianos (BAGNOLI; RAPPUOLI; GRANDI, 2017; TRACEV; UNAKAL, 2020).

Muitas infecções humanas estão associadas bactérias e dentre elas *S. aureus* é a espécie que mais se destaca devido a sua alta taxa de virulência. *S. aureus* pertencente à família Staphylococcaceae (SCHLEIFER; BELL, 2009), consegue sobreviver em ambientes com temperaturas entre -20 e 46 °C, porém sua temperatura ideal para crescimento está entre 30 e 37 °C e tolera altas concentrações de cloreto de sódio (KLOOS; MUSSELWHITE, 1975; ONDUSKO; NOLT, 2018; ASAE, 2021). Esses microrganismos possuem formato esférico de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, e são catalase positivos, não se locomovem por não possuírem flagelos, são organismos anaeróbicos facultativos, suas colônias crescem de forma semelhante a um cacho de uvas e seu cultivo em meio sólido apresenta coloração dourada (KLOOS; MUSSELWHITE, 1975).

A parede celular de *S. aureus* encontra-se logo abaixo da cápsula polissacarídica. Essa cápsula protege as bactérias da fagocitose ao inibir a quimiotaxia e facilita a aderência celular a materiais sintéticos atuando, portanto, como um fator de virulência (ALMEIDA et al., 2017). A parede celular é rica em peptidoglicano, confere maior rigidez, é essencial na preservação da integridade celular e tem papel importante nas interações microrganismo-hospedeiro (ALMEIDA et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2007). *S. aureus* apresenta moléculas que são antigênicas, induzindo a resposta do sistema imune, como o ácido teicóico e lipoteicóico, adesinas e proteína A (LUTZ et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2001).

S. aureus pode estar presente em várias partes do corpo, como na pele, nas fossas nasais, garganta e trato intestinal. Caso estas áreas sejam comprometidas por traumas ou procedimentos cirúrgicos, *S. aureus* pode alojar-se dando início ao processo infeccioso, promovendo bacteremias ou infecções por toxinas (CASSETTARI et al., 2005; ROBERT et al., 2005). As infecções podem ser causadas por bactérias estafilocócicas do próprio indivíduo (infecções endógenas) ou adquiridas de outros doentes ou até mesmo de portadores saudáveis

(infecções exógenas) (LIMA et al., 2015). Pacientes internados tem uma maior chance de adquirir essa bactéria e desenvolver alguma infecção, por estar expostos a contaminação que esses ambientes possuem (MOURA et al., 2018)

A capacidade de colonização e a patogenicidade do *S. aureus* são uma consequência dos seus fatores de virulência que possuem papel importante na adesão celular, na evasão da resposta imunológica do hospedeiro e na captação de nutrientes. Esses fatores de virulência podem ser classificados nas três seguintes categorias: a) fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, como diversas enterotoxinas, a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), proteína A, lipases e polissacarídeos capsulares; b) fatores relacionados com a aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, pela produção de moléculas de fibrinogênio, colágeno, fibronectina, ou da enzima coagulase; e c) fatores relacionados com a invasão nas células do hospedeiro, penetração nos tecidos e adesão de superfícies de catéteres e próteses (ALMEIDA et al., 2017; VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

O diagnóstico das infecções causadas por *S. aureus* podem ser realizados através da coleta de amostras, cultura em disco de Petri, identificação pela técnica de coloração de Gram, métodos bioquímicos com determinação das enzimas produzidas, ou ainda a sorologia para detectar anticorpos específicos (ALMEIDA et al., 2017).

O tratamento para essas infecções bacterianas tem encontrado desafios, devido ao alto grau de resistência que *S. aureus* desenvolveu ao longo dos anos. Na década de 1930, implantou-se a antibioticoterapia. Com o surgimento da sulfanilamida, acreditava-se no fim das doenças infecciosas, mas ao estudar a evolução e resistência de *S. aureus*, percebeu-se que no final desta década surgiam as primeiras cepas resistentes à sulfanilamida (WRIGHT, 2010). Na década de 1940 com o emprego da penicilina em uso clínico, o *S. aureus* passou a desenvolver resistência pela produção de β -lactamases (penicilinase), que tem a capacidade de hidrolisar o anel β -lactâmico da penicilina, tornando-a inativa (TURNER et al., 2019).

Geralmente utiliza-se da antibioticoterapia para tratamento das infecções causadas por bactérias. No caso da intoxicação alimentar tratam-se os sintomas manifestados pelo paciente, pois a doença é causada pela toxina pré-formada e não por multiplicação do microrganismo em si. É importante não fazer uso indiscriminado de antibióticos, pois a automedicação seleciona as cepas mais adaptadas aos antibióticos e favorece sua proliferação, dificultado o tratamento (PAHISSA, 2009).

2.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Desde as décadas de 1950 e 1970 quando surgiram epidemias por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), despertou-se a atenção da sociedade médica e dos pesquisadores para o problema da resistência adquirida aos antimicrobianos (COUTO; PEDROSA, 1999). MRSA é responsável por inativar a ação de muitos antibióticos, se tornando um grande problema para a população e os órgãos de saúde pública, por ser um dos principais agentes causadores de infecções nosocomiais (STRATTON, 2000). No ambiente hospitalar, as infecções oportunistas por essa cepa são recorrentes e graves, sendo relatado que cerca de 20% das infecções que ocorrem em centros cirúrgicos são causadas por esta bactéria. Essas infecções têm preocupado os profissionais da saúde devido à complexidade em tratá-las com eficácia (BANBURY, 2003).

As infecções causadas por bactérias resistentes aumentaram consideravelmente nas últimas décadas devido ao uso descontrolado de fármacos. Essas infecções representam grande parte das causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, mesmo em países desenvolvidos (GUEVARA AGUDELO et al., 2020).

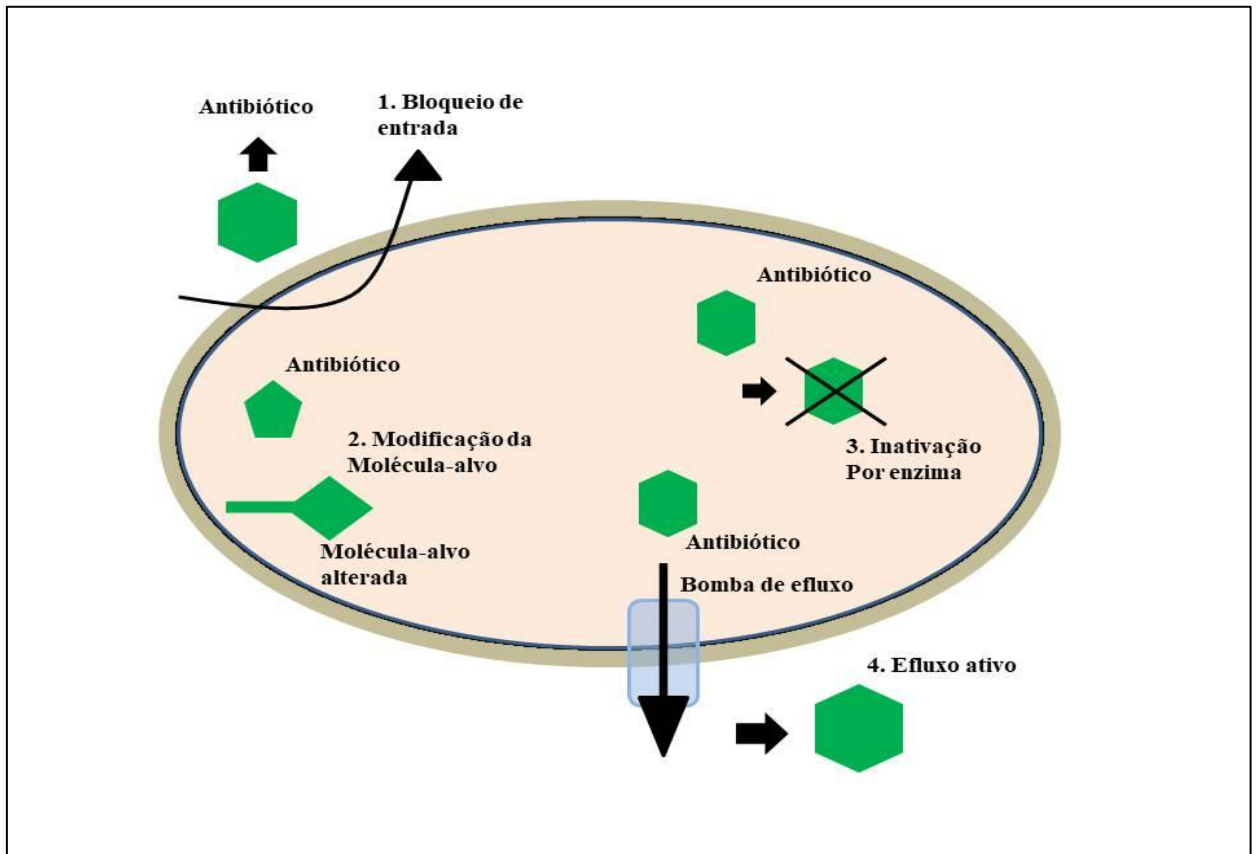
Muitos estudos com extratos, óleos essenciais de plantas ou compostos sintetizados e seus derivados, realizam a associação destes com antibióticos, obtendo atividade clinicamente sinérgica da associação composto-antibiótico (DUARTE, 2006). Esses dados têm facilitado aos pesquisadores a busca por novos fármacos antibacterianos que sejam eficazes na resensibilização ou na danificação do patógeno-alvo e que sua ação biológica seja mais seletiva e com menos efeitos indesejáveis.

Os antibacterianos possuem diferença em relação ao mecanismo de ação e podem ser classificados de acordo com o local ao qual atuam: na parede celular, na síntese proteica, na replicação do DNA ou na atividade enzimática celular (MOREIRA et al., 2009). Para ser considerado um antibacteriano ideal, este precisa possuir atividade letal sobre o microrganismo, sem que cause efeitos colaterais no indivíduo e que não desenvolva alguma resistência bacteriana (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Estudos realizados demonstraram que as bactérias podem desenvolver ou adquirir resistência aos antibióticos por três mecanismos principais: I) alteração ou modificação pós-traducional do alvo do antibiótico, por mutação genética na bactéria; II) inativação do antibiótico por hidrólise ou modificação enzimática dos grupos funcionais ativos III) diminuição da concentração intracelular da droga por consequência da diminuição da permeabilidade da parede e membrana celular ou do efluxo ativo da droga (Figura 1) (BLAIR et al., 2015; POOLE, 2002; SHORE et al., 2011). Deste modo, as bactérias utilizam desses

mecanismos isolados ou em conjunto, para impedir a ação de antibióticos das mais diversas classes químicas (SILVEIRA et al., 2006).

Figura 1 - Mecanismos de resistência bacteriana.



Fonte: Adaptado de Tortora et al., 2012

Os mecanismos presentes em *S. aureus* podem ser independentes entre si ou atuar sinergicamente. Uma cepa, por exemplo, pode apresentar bombas de efluxo e a enzima β -lactamase ao mesmo tempo. Dependendo do antibacteriano envolvido, a bactéria pode utilizar um ou vários destes mecanismos de resistência (KARAM et al., 2016).

2.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA POR BOMBA DE EFLUXO

Um dos mecanismos que causam a redução das concentrações celular de antibiótico dentro da bactéria, envolve a ação de bombas de efluxo. Essas proteínas atuam retirando substâncias nocivas do interior da bactéria, como metais tóxicos, antibióticos e desinfetantes, evitando assim o dano celular (BHARDWAJ; MOHANTY, 2012; BLAIR et al., 2015; SHRIRAM et al., 2018)

Bombas de efluxo são proteínas transmembranares com regiões hidrofóbicas, presentes na membrana celular bacteriana. Expõem antibiótico e componentes tóxicos para fora da célula bacteriana, mantendo as concentrações intracelulares de antibióticos em baixos níveis e assim impedindo a chegada do fármaco no seu local de ação (ABUSHAHEEN et al., 2020; COSTA et al., 2011; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). A extrusão de um fármaco ocorre pelo processo dependente de energia designado de efluxo ativo. Este mecanismo de resistência pode extrusar várias classes de antibióticos (BAPTISTA, 2013; MARQUEZ, 2005). O aumento da expressão dessas bombas de efluxo na membrana, por meio de mutações regulatórias ou aquisição de plasmídeos, aumentam a resistência bacteriana a antibióticos (DEMARCO et al., 2007; FREMPONG-MANSO et al., 2009; LI; NIKAIDO, 2009; PIDDOCK, 2006).

Essas proteínas podem ser específicas para um substrato/antibiótico ou ser transportadora de uma variedade de compostos com estruturas distintas, incluindo várias classes de antibióticos, conferindo um fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) (MARQUEZ, 2005). As bombas de efluxo MDR que são codificadas no cromossomo podem causar susceptibilidade reduzida a antibióticos e a biocidas, enquanto as bombas codificadas em plasmídeos são mais específicas (POOLE, 2007).

Dois sistemas são fundamentais como fonte de energia para o transporte: transporte acoplado mediado por íons e o transporte mediado por ATPases. O antiporte é mediado por Na^+ (sódio) e H^+ (hidrogênio), que são movidos para o meio intracelular, em troca da liberação do antibiótico para fora da célula. No sistema ATPase é necessário que ocorra a quebra de ATP para retirar o antibiótico do meio intracelular (XAVIER, 2008).

As bombas de efluxo também funcionam como transportadores do tipo uniporte, onde somente um soluto é conduzido e simporte, onde o íon da força motriz e a substância são liberados na mesma direção (KUMAR et al., 2020; LEKSHMI et al., 2018).

Estudos anteriores indicaram que as bombas de efluxo em bactérias são capazes de extrusar detergentes, antissépticos (CHUANCHUEN et al., 2001; SANCHEZ; MORENO; MARTINEZ, 2005), solventes (RAMOS et al., 2002), metais tóxicos (SILVER; PHUNG, 1996) e antibióticos (ZGURSKAYA; NIKAIDO, 2000). A associação de antibióticos com substâncias capazes de inibir as bombas de fluxo representa uma estratégia de controle da resistência bacteriana. Existem várias substâncias de origem natural e sintética que já foram identificadas como bons inibidores de bombas de efluxo. Porém, a eficiência dessas substâncias como inibidores se torna limitada por causa da toxicidade que possuem (PRASCH; BUCAR, 2015).

Existem seis famílias principais de bombas de efluxo que são classificadas de acordo com suas características. Elas se dividem entre os transportadores primários e secundários. Transportadores primários utilizam a hidrólise de adenosina trifosfato como a Superfamília de cassetes de ligação ao ATP (*ATP-Binding cassette*, ABC). Os transportadores secundários utilizam gradientes de prótons para conduzir a eliminação de substratos. Consiste na Família de extrusão de multidrogas e compostos tóxicos (*Multidrug and toxic compound extrusion* - MATE), superfamília de facilitadores principais (*Major facilitator superfamily* - MFS), Família pequena de resistência a multidrogas (*Small multidrug resistance* - SMR), Superfamília de resistência nodulação e divisão celular (*Resistance nodulation division* - RND) e Família de efluxo de compostos antimicrobianos proteobacteriano (*Proteobacterial antimicrobial compound efflux* – PACE) (BARMAK; MAHMOUDI; BARDANIA, 2018; BLAIR; PIDDOCK, 2016; LI; NIKAIDO, 2009).

Bombas de efluxo da família ABC utilizam a energia exercida através da hidrólise de ATP para importar ou exportar substratos na célula contra gradientes eletroquímicos (VASILIOU; VASILIOU, 2009). A hidrólise do ATP desencadeia mudanças conformacionais na estrutura do transportador resultando na exportação de substratos. O domínio estrutural da superfamília ABC é formado por dois domínios de vias citoplasmáticas ligadas a nucleotídeos que se conectam e hidrolisam ATP e dois domínios transmembranares que formam um canal condutor (HOLLENSTEIN; DAWSON; LOCHER, 2007). Transportadores dessa família transportam diversas moléculas como proteínas, lipídios, carboidratos e aminoácidos. São os principais transportadores responsáveis pela resistência a muitas drogas em células cancerígenas (KUMAR; SCHWEIZER, 2005).

A família MATE utiliza a força condutora dos gradientes de Na^+ ou H^+ para transportar substâncias através da membrana (TAKANASHI; SHITAN; YAZAKI, 2014). Foram identificados pela primeira vez em *Vibrio parahaemolyticus* e *Escherichia coli* como proteínas de efluxo de drogas e classificadas para este grupo por falta de sequências não homologas com as proteínas MFS (MORITA et al., 2000).

A superfamília facilitadora (MFS) utiliza o potencial eletroquímico de soluto e dos íons para conseguir transportar o substrato contra o gradiente de concentração. São envolvidos no transporte de açúcares, íons e drogas, sendo responsáveis pelo efluxo de várias substâncias. Bombas MFS são relatadas em bactérias gram-positivas como *S. aureus* como, por exemplo, a NorA conferindo resistência a fluoroquinolonas e bombas específicas para tetraciclina como a Tet(A) e Tet(K) (NIKAIDO; TAKATSUKA, 2009).

A família SMR é uma pequena classe de proteínas de efluxo que consiste de transportadores de 110 aminoácido, possuindo 4 domínios transmembranares (NASIE; STEINER-MORDOCH; SCHULDINER, 2012). Algumas bombas dessa família incluem bomba de *S. aureus* que realiza o efluxo de cátions e drogas (PAULSEN; BROWN; SKURRAY, 1996).

Bombas RND é a família mais importante clinicamente em casos de resistência aos fármacos por garantir que eles sejam expulsos para fora da célula e não para o periplasma. As moléculas do antibiótico portanto atravessam as barreiras da membrana plasmática para serem efetivamente expulsas da células (NIKAIDO; TAKATSUKA, 2009).

Os mecanismos envolvidos na inibição de bombas de efluxo envolve sua ligação diretamente à bomba de efluxo e o bloqueio de sua função, de forma competitiva ou não competitiva com os substratos (VIVEIROS et al., 2008). Os inibidores também podem causar depleção da fonte energia, seja por meio da inibição da ligação do ATP ou perturbando o gradiente de prótons. Recentemente, os inibidores de bombas demonstraram ter afinidade pelos substratos em cepas MDR. Ao formar o complexo com o antibiótico, os inibidores poderiam dificultar a saída da droga nas células e prevenir sua extrusão devido ao tamanho maior do complexo (CHAN; ONG; CHUA, 2007).

2.4 BOMBAS DE EFLUXO

2.4.1 Bomba de efluxo QacA/B

Em 1980 foi identificado no plasmídeo pSK1, um gene que codificava resistência a diversos desinfetantes e antissépticos, carregado por isolados clínicos de *S. aureus* (TENNENT et al., 1985). O gene foi denominado *qacA* que codificava a bomba de efluxo QacA pertencente à família MFS, sendo o responsável por extrusar drogas hidrofóbicas como a tetraciclina (ROUCH et al., 1990). QacA é capaz de carregar resistência a uma variedade de compostos antibacterianos lipofílicos catiônicos e a diferentes classes químicas. Esses compostos possuem uma característica em comum, pois são aromáticos e contêm carga positiva, sendo estes cátions monovalentes ou bivalentes (WASSENAAR et al., 2015). O gene *qacB* foi encontrado no plasmídeo pSK23 que codifica a bomba de efluxo QacB, observada em isolados clínicos nos anos 1950 (COSTA et al., 2013).

A bomba de efluxo QacA/B, expressas na cepa SA-K4414 de *S. aureus*, possuem transcrição codificada por plasmídeo e são transportadores que fazem parte da Superfamília

Facilitadores Principais (MFS). As bombas de efluxo mediadas por plasmídeos são mecanismos importantes de resistência, como os processos de efluxo requerem energia, esses sistemas têm sido referidos como bombas (LEVY, 1992).

A transcrição da proteína QacA é regulada por *qacR*, que funciona como repressor ligando-se a montante de *qacA* no DNA, inibindo a sua expressão. Então, quando a bactéria está em contato com compostos lipofílicos catiônicos, estes ligam-se ao repressor que se dissocia do DNA, liberando o gene e permitindo a expressão de QacA. A expressão de QacB ocorre de maneira semelhante (CHATTERJEE et al., 2016; WASSENAAR et al., 2015).

2.4.2 Bomba de efluxo QacC

A proteína QacC pode ser denominada também de Smr, possui 107 aminoácidos e 4 segmentos transmembranares, faz parte da família secundária de resistência a múltiplas drogas (SMR). Essa proteína foi identificada na cepa SA K4100 e realiza transporte do tipo uniporte e carrega resistência a alguns corantes e compostos de amônio quaternário (LITTLEJOHN et al., 1992; MITCHELL; BROWN; SKURRAY, 1998; PUTMAN; VAN VEEN; KONINGS, 2000). Por ser uma proteína pequena, ainda não foi comprovado se QacC age como proteína de transporte independente ou se há interação com outras proteínas de membrana para a eliminação de compostos das células (GRKOVIC; BROWN; SKURRAY, 2002).

O gene *qacC* é transportado em plasmídeos pequenos, de replicação por círculo rolante, e em plasmídeos grandes de multirresistência com poucas cópias (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005; NGUYEN et al., 2019; SCHERF et al., 2020; TRUONG-BOLDUC; WANG; HOOPER, 2018). O promotor desses dois sistemas de plasmídeos difere entre si (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005). A expressão QacC não é modulada por regulador transcricional e no momento não há estrutura com alta resolução disponível que represente a proteína QacC (RAJABI et al., 2020). Semelhante ao QacA, o QacC possui resistência a alguns QACs como o benzalcônio e cetrimida, mas não causa resistência contra clorexidina (BJORLAND et al., 2003; HEIR; SUNDHEIM; HOLCK, 1999; MITCHELL; BROWN; SKURRAY, 1998).

2.4.3 Bomba de efluxo MepA

MepA pertence à família MATE e foi o primeiro mecanismo de transporte multidrogas a ser descrito em *S. aureus*, conferindo à cepa SA-K2068 o fenótipo multirresistente

(KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005; MCALEESE et al., 2005). Essa bomba de efluxo possui resistência a alguns biocidas como pentamidina, clorexidina, e às fluoroquinolonas como a norfloxacin e ciprofloxacina (KAATZ; MCALEESE; SEO, 2005).

A bomba de efluxo MepA foi identificada em estudos anteriores em cepas mutantes de *S. aureus* e é codificada pelo gene cromossômico *mepA* (MCALEESE et al., 2005) e apresenta 451 aminoácidos e 12 segmentos transmembranares. A energia usada para o transporte do substrato é o gradiente de prótons pelo antiporte exclusivo dos íons sódio (Na^+) (HE et al., 2004; KURODA; TSUCHIYA, 2009; MORITA et al., 2000).

2.5 β -LACTAMASE

As β -lactamases são enzimas produzidas por bactérias e são responsáveis por causar resistência aos antibióticos β -lactâmicos como as penicilinas, carbapenemas e cefalosporinas (GELATTI et al., 2009). Esses antibióticos possuem em sua estrutura molecular um anel de três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio, sendo conhecida como β -lactama, essa enzima lactamase quebra esse anel e desativa as propriedades antibacterianas da molécula, adquirindo assim, resistência contra metilicina, sendo esse um derivado semissintético da penicilina (RAGBETLI et al., 2016).

A família dos β -lactâmicos possui o mesmo anel β -lactâmico, mas a química não é igual, o que irá diferenciar as cadeias lineares, as suas características, espectros de ação e a resistência a β -lactamases (DELEO; CHAMBERS, 2009). Essas enzimas são inibidas por inibidores de β -lactamase como o sulbactam, ácido clavulânico e tazobactam, assim as cepas que as produzem são sensíveis quando ocorrem associações de antibióticos β -lactâmicos com os inibidores de β -lactamase (LIVERMORE, 1995; RAGBETLI et al., 2016).

2.6 SEMICARBAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS

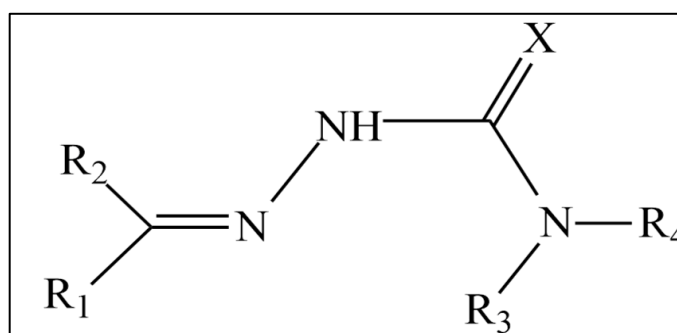
Os compostos químicos derivados de semicarbazonas e tiossemicarbazonas vêm se destacando nas pesquisas por apresentarem amplo perfil farmacológico. São conhecidos como compostos que tem capacidade quelante, onde heteroátomos que estão presentes na cadeia, agem como sítios de coordenação que podem ligar-se a vários metais de transição. Possuem átomos doadores de elétrons como oxigênio, nitrogênio e enxofre (BERALDO, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2008).

As semicarbazonas sofrem diminuição de atividade biológica quando ocorre a substituição do enxofre por oxigênio, quando comparadas com o análogo tiosemicarbazonas. Entretanto, as semicarbazonas demonstram boa atividade como agentes antichagásicos, anticonvulsivantes, herbicidas e pesticidas, além de serem eficientes inibidores da corrosão de metais (BERALDO, 2004).

A possibilidade de modular o caráter lipofílico destas moléculas e suas interações com os receptores biológicos pela mudança dos substituintes da cadeia é uma forma de melhorar diversas atividades biológicas e de manifestar atividades específicas (BRONDANI et al., 2007; MENDES, 2010).

As semicarbazonas possuem na sua estrutura um grupamento carbonila que pode ser convertido em grupamento tiocarbonilado, formando então a tiosemicarbazona. A diferenciação entre ambas consiste que a semicarbazona possui função carbonila (C=O), enquanto a tiosemicarbazona apresenta uma função tionila (C=S) (Figura 2) (PAVAN et al., 2010; DU et al., 2002).

Figura 2 - Estrutura geral das semicarbazonas (X = O) e das tiosemicarbazonas (X = S); R₁, R₂, R₃ e R₄ = H, grupos alquila ou arila.



Fonte: o autor.

Derivados das tiosemicarbazonas e semicarbazonas agem inibido as enzimas através da complexação de reações de redox ou de metais endógenos e através da interação com o DNA ou inibição de sua síntese. É importante destacar que alguns complexos de tiosemicarbazonas possuem ligantes que apresentam habilidade de mimetizar a ação de certas enzimas, como alguns de cobre que imitam a ação da superóxido dismutase que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (BERALDO; GAMBINO, 2004^a).

2.6.1 Atividades biológicas das semicarbazonas

Semicarbazonas constitui uma importante classe de compostos e a sua utilização em atividades biológicas vem se desenvolvendo cada vez mais. São obtidas por meio da condensação entre uma cetona ou um aldeído e podem ser usadas como intermediário na síntese orgânica, para obtenção de anéis heterocíclicos, como a tiazolidonas (BRONDANI et al., 2007). Nas semicarbazonas, o grupamento carbonila presente em sua estrutura, pode ser convertido em grupamento tiocarbonilado originando assim uma tiosemicarbazona (SOARES et al., 2011).

Em estudos anteriores foi observado que a vanilina semicarbazona e a vanilina tiosemicarbazona têm a capacidade de inibir o crescimento de células cancerígenas e inibição do número de macrófagos (ALI et al., 2012; SHAHRIAR et al., 2014). Noblí et al. (2005) realizaram estudos da atividade antitumoral *in vitro* de cinco ligantes semicarbazônicos com vanádio, que apresentaram seletiva citotoxicidade em células tumorais TK-10 (célula de carcinoma renal humano).

O Nitrofural (5-nitro-2-furfurilidenosemicarbazona) foi sintetizado em 1944 e apresentou atividade bacteriostática em cepas de *Pseudomonas pyocyne* (DODD et al., 1944). Em 1969, foi visto que os efeitos desse composto provoca destruição do *Trypanosoma cruzi* e tinha a capacidade de inibir a enzima tripanotiona redutase desse protozoário (ANDRADE; BRENER, 1969; HENDERSON et al., 1988). Outro estudo mostrou que derivados isoxazolínicos contendo o heterociclo nitrofurano apresentaram atividade capaz de combater *Mycobacterium tuberculosis* (TANGALLAPALLY et al., 2007).

2.6.2 Atividades biológicas das tiosemicarbazonas

As substâncias da classe das tiosemicarbazonas são bastante estudadas pela comunidade científica e atuam como ligantes doadores de N, S, possuindo propriedades farmacológicas antitumorais (SOARES et al., 2012), antibacteriana (MAIA et al., 2009), antifúngica (CHANDRA; PARMAR; KUMAR, 2009) e antiviral (PELOSI, 2010). São compostos que podem apresentar coordenação a metais de transição, coexistindo duas formas tautoméricas em equilíbrio ceto-enólico, sendo que as semicarbazonas podem ligar-se também a cátions metálicos (CHIKATE et al., 2005).

Pavan et al. (2010) testaram a citotoxicidade de semicarbazonas e tiosemicarbazonas frente à cepa *M. tuberculosis*. As tiosemicarbazonas apresentaram a maior atividade que as

semicarbazonas, isso ocorreu devido à presença de um átomo de enxofre, pois este é capaz de aumentar a interação com os receptores biológicos da bactéria.

Um estudo realizado anteriormente por Altintope et al. (2016) obteve sucesso na síntese e avaliação da atividade antifúngica de derivados 2-benzilideno-*N*-(naftalen-1-il)-tiossemicarbazonas, apresentando uma concentração inibitória mínima (CIM) de 125 µg/mL em cepas de *Candida glabrata* e 250 µg/mL em *C. fusarium* e *C. aspergillus*.

A atividade antibacteriana foi demonstrada em um estudo realizado por Khan e Asiria (2017), onde tiossemicarbazônicos esteroidais foram efetivos frente cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes* e *S. typhimurium*, onde os resultados obtidos na CIM dos compostos estavam entre 64-256 µg/ml.

O aumento da resistência aos antibióticos e antifúngicos, presentes em ambientes hospitalares, instiga um maior investimento da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos compostos ativos. As tiossemicarbazonas podem passar por modificações moleculares na sua estrutura, de forma a potencializar sua ação e obter resultados promissores. Essas modificações são de baixo custo de produção e a torna um potencial antimicrobiano (BERALDO, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana e a capacidade inibidora de β -lactamase e de bombas de efluxo por compostos derivados semicarbazônicos e tiossemicarbazônicos, sobre cepas de *S. aureus* resistente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

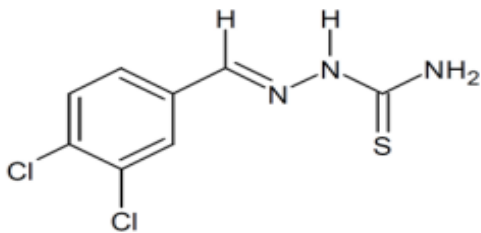
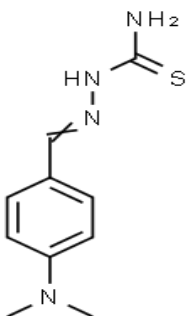
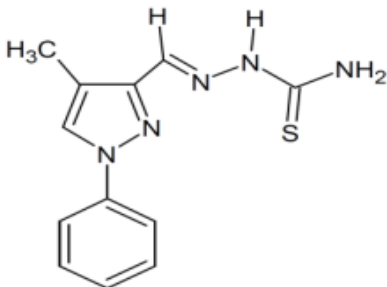
- Analisar a capacidade antibacteriana *in vitro* dos derivados semicarbazônicos e tiossemicarbazônicos;
- Avaliar a capacidade de inibição de β -lactamases verificado pela redução da CIM da ampicilina e oxacilina na cepa K4414 e K4100 de *S. aureus*;
- Verificar a capacidade de inibição da bomba de efluxo MepA na cepa K2068, comparando à redução da CIM do antibiótico;
- Avaliar a capacidade de inibição das bombas de efluxo QacA/B na cepa K4414, QacC na cepa K4100 e MepA na cepa K2068, averiguado pela redução da CIM do brometo de etídio.

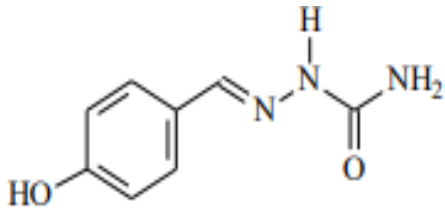
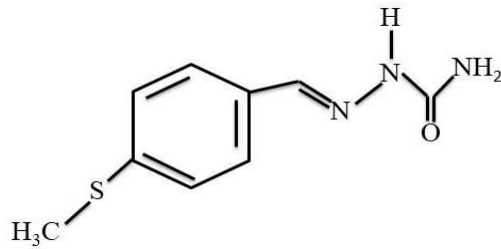
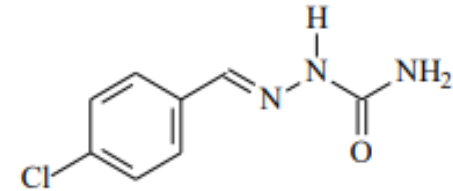
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS SEMICARBAZÔNICOS E TIOSSEMICARBAZÔNICOS

Os derivados semicarbazônicos e tiossemicarbazônicos (Tabela 1) foram sintetizados e fornecidos pelo Laboratório de Planejamento, Síntese e Avaliação de Fármacos (LABSINFA) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, sob a coordenação do Prof. Dr. Dalci José Brondani.

Tabela 1: Estrutura dos derivados semicarbazônicos e tiossemicarbazônicos sintetizados pelo LABSINFA – UFPE.

Estrutura	Nomenclatura	Abreviatura
	3,4-Diclorobenzaldeído tiossemicarbazona	VH10
	4-Dimetilamina benzaldeído tiossemicarbazona	VH01
	3-metil-1fenil-1H-pirazol-4- carboxaldeído tiossemicarbazona	VH26

	4-Hidroxibenzaldeído semicarbazona	LS04
	4-Tiometilbenzaldeído semicarbazona	LS26
	4-Clorobenzaldeído semicarbazona	LS14

4.2 CEPAS BACTERIANAS

As cepas bacterianas de *S. aureus* utilizadas foram: K4414 portadora de β -lactamase e das bombas QacA/B que apresenta resistência a ampicilina; K4100 que apresenta a bomba QacC resistente a oxacilina; e K2068 que expressa a proteína MepA, resistente a ciprofloxacina. As cepas foram cedidas pelo Professor Simon Gibbons (*University College London*), foram replicadas e mantidas em ágar infusão de coração (*Heart Infusion Agar*, HIA, Difco) 24 h antes do experimento, na temperatura de 37 °C (GIBBONS; OLUWATUYI; KAATZ, 2003).

4.3 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Foram utilizados os antibióticos ampicilina, oxacilina e ciprofloxacina. O agente intercalante de DNA usado foi o corante brometo de etídio, e os inibidores de bombas de efluxo foram a clorpromazina (CPZ) e o carbonilcianeto 3-clorofenil-hidrazona (CCCP), todos obtidos na Sigma Aldrich Co. Ltd. Os antibióticos foram dissolvidos em

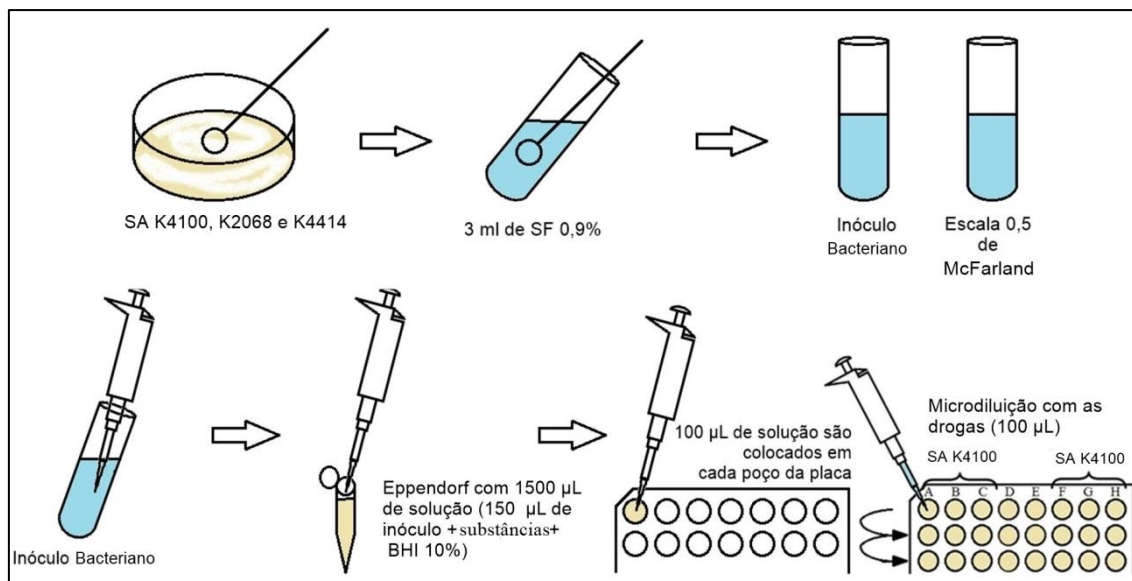
dimetilsulfóxido (DMSO) 10% e posteriormente em água estéril até obter concentração de 1.024 µg/mL. O CCCP foi dissolvido em solução de metanol/água na proporção 1:1. O brometo de etídio, sulbactam e CPZ foram dissolvidos em água destilada estéril, e armazenados a -20 °C, protegidos da luz.

4.4 MEIOS DE CULTURA

Durante os testes, foram utilizados os seguintes meios de cultura: ágar infusão de coração HIA (Difco Laboratories Ltda.) preparado seguindo as especificações do fabricante, e caldo infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion* – BHI, Acumedia Manufacturers Inc.) preparado na concentração de 10%.

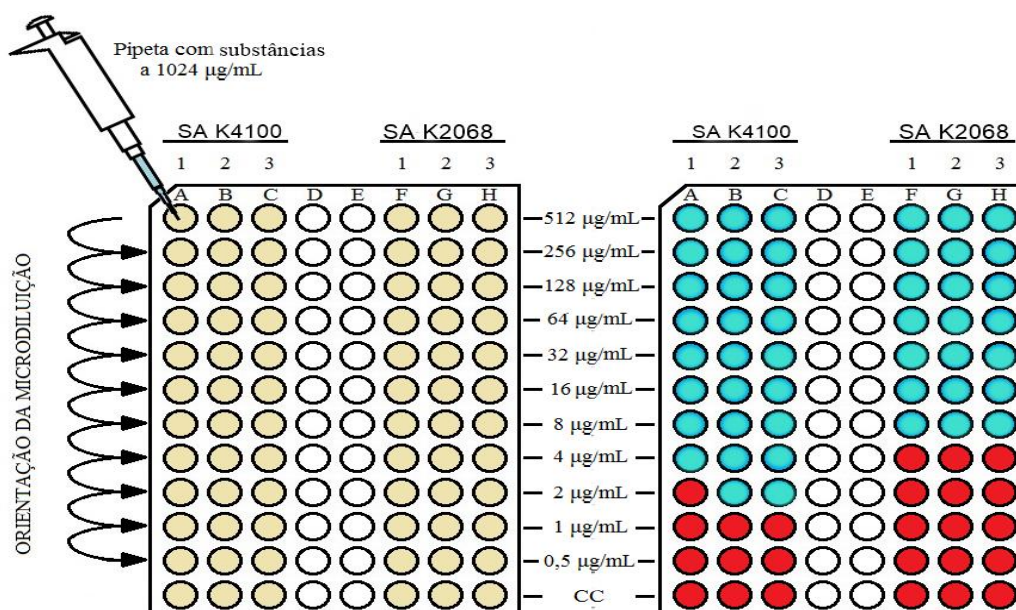
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A atividade antibacteriana direta foi avaliada pela mensuração do teste de concentração inibitória mínima, realizado pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2019). As cepas utilizadas foram semeadas em meio sólido HIA e mantidas em estufa na temperatura de 37 °C por 24 horas. Depois foram coletadas colônias das células replicadas com auxílio de uma alça de níquel-cromo e inoculadas em tubos de ensaios contendo 3 mL de solução salina estéril (0,9%). Feito isso, essa amostra foi comparada à escala de Mcfarland 10^5 UFC (1.5×10^5). Posteriormente, foram preparados eppendorfs® contendo 1.350 µL do meio de cultura líquido BHI e 150 µL do inóculo bacteriano, o volume final foi de 1,5 mL. Posteriormente placas de microdiluição foram preenchidas com 100 µL da solução do conteúdo total dos eppendorfs® (Figura 3).

Figura 3 - Padronização dos inóculos e preenchimento das placas de microdiluição

Fonte: Adaptado de FREITAS (2017)

Após essa etapa, foi realizada microdiluição, onde foram adicionados 100 µL de cada substância ou inibidor padrão (CCCP ou CPZ) no primeiro poço e procedida à diluição seriada até a penúltima cavidade (1:1), sendo a última cavidade utilizada como controle de crescimento. As concentrações dos compostos variaram de 512 a 0,5 µg/mL (Figura 4).

Figura 4 - Microdiluição seriada com os compostos.

Fonte: Adaptado de FREITAS (2017)

Após as diluições, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica na temperatura de 37 °C por 24 horas. Após esse período foi realizada a leitura, onde 20 µL da resazurina sódica foram adicionadas aos poços e após uma hora foi feita a leitura, onde, a alteração da cor azul para o rosa indicaria crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração onde o crescimento não pode ser observado (CLSI, 2019). Os ensaios antibacterianos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média das repetições.

4.6 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE β -LACTAMASE E DA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA.

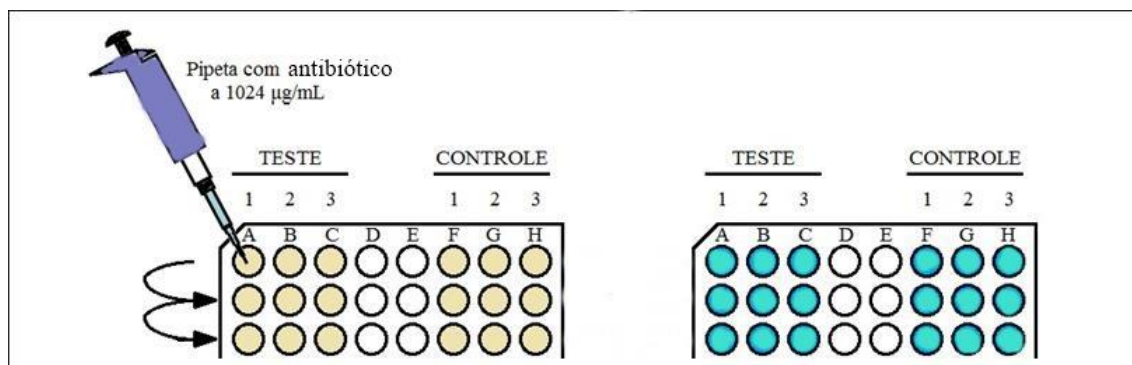
No teste de β -lactamase foi utilizada a cepa K4414 e K4100 portadoras da enzima. A verificação da presença de β -lactamase foi realizada utilizando-se a CIM da ampicilina isolada e a CIM da ampicilina associada ao inibidor da β -lactamase (Sulbactam) na concentração de 50%. Para confirmar a inibição da β -lactamase, assumiu-se que uma diminuição na CIM de três vezes, na associação antibiótico + inibidor é indicativo da produção de β -lactamase pela cepa. A avaliação de inibição da β -lactamase pelas substâncias testes envolveu o mesmo princípio, onde a redução da CIM em três vezes na associação entre o antibiótico e as substâncias, seria indicativo de inibição (CLSI, 2019).

4.7 VERIFICAÇÃO DA INIBIÇÃO DE β -LACTAMASE EM QacA/B E DAS BOMBAS DE EFLUXO QacC E MepA PELA REDUÇÃO DA CIM DO ANTIBIÓTICO

Para esse teste foram utilizadas as cepas K4414, K4100 portadoras de β -lactamase, QacA/B e QacC, respectivamente e K2068 portadora da bomba de efluxo MepA. Para verificar se houve efeito sinérgico na combinação do antibiótico com os compostos e os inibidores padrão das bombas, os compostos foram avaliados em concentração sub-inibitória (CIM/8) (TINTINO et al., 2020). Para tanto, eppendorfs® foram preenchidos com 150 µL do inóculo bacteriano, com os compostos e os inibidores em concentração sub-inibitória (CIM/8) e completado com o meio de cultura líquido BHI até atingir o volume de 1,5 mL. Foi também preparado um controle da modulação, com a mesma quantidade de inóculo e 1.350 µL de BHI. Em seguida as placas foram preenchidas e feitas diluições seriadas com 100 µL do antibiótico até a penúltima cavidade (1:1) (Figura 5). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e a leitura foi realizada com

resazurina. A microdiluição ocorreu de forma que concentração do antibiótico variou gradualmente de 512 a 0,5 µg/mL (CLSI, 2019).

Figura 5 - Microdiluição com antibióticos e placa controle



Fonte: Adaptado de FREITAS (2017)

4.8 VERIFICAÇÃO DA INIBIÇÃO DAS BOMBAS DE EFLUXO QacA/B, QacC E MepA PELA REDUÇÃO DA CIM DO BROMETO DE ETÍDIO

Para verificar a inibição de efluxo os compostos e dos inibidores padrão como modificadoras da resistência antibacteriana, foi utilizado o método proposto por Coutinho et al. (2008). O procedimento foi similar ao anterior (item 4.7), exceto que a associação foi realizada entre os compostos testados e o brometo de etídio. A placa de microdiluição foi preenchida adicionando 100 µL da solução contendo as substancias teste, em cada cavidade. Em seguida realizada a microdiluição seriada (proporção 1:1) com 100 µL de brometo de etídio até a penúltima cavidade. Foram realizados os controles, usando a CIM do brometo. Posteriormente as placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. A diluição seriada ocorreu de forma que concentração do brometo variou gradualmente de 512 a 0,5 µg/mL. A leitura foi realizada com adição de 20 µL de resazurina e verificada a mudança colorimétrica. A redução da CIM do brometo na associação, é um indicativo de inibição de bombas de efluxo (CLSI, 2019).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em média ± desvio padrão, através do software GraphPad Prism versão 7.0. A análise estatística foi analisada

com ANOVA de uma via (One-way ANOVA) e em seguida foi submetido o teste de Bonferroni como *post hoc*, sendo os resultados considerados significativos quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Na avaliação da atividade antibacteriana direta dos compostos, os resultados obtidos foram de CIM ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$, não apresentando atividade antibacteriana clinicamente relevante. Os antibióticos oxacilina, ampicilina e ciprofloxacina apresentaram valores da CIM de 512, 512 e 128 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antibacteriana direta das substâncias e antibióticos em cepas de *S. aureus* K4414, K4100 e K2068. Resultado expresso em $\mu\text{g/mL}$.

Compostos /cepas	SA K4414	SA K4100	SA K2068
	QacA/B	QacC	MepA
Oxacilina	-	512	-
Ampicilina	512	-	-
Ciprofloxacina	-	-	128
VH10	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
VH01	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
VH26	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
LS04	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
LS26	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
LS14	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024

Martins (2017) realizou estudos da atividade antibacteriana em derivados semicarbazônicos e tiosemicarbazônicos e demonstrou que o composto ((2Z)-2-[1,1,1-trifluoro-4-oxo-4-(tiofen-2-il)butan-2-ilideno]hidrazinacarboxamida) apresentou CIM de 128 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus*. Esse valor teve concordância com estudos de Viñuelas-Zahínos et al. (2011) e Rodríguez-Argüelles et al. (2005), que obtiveram uma CIM >100 $\mu\text{g/mL}$. Estudos realizados por Khan e Asiri (2017) obteve CIM com valores próximos aos obtidos no trabalho de Martins, (2017), com CIM de 256 a 32 $\mu\text{g/mL}$, para as tiosemicarbazonas esteroidais em

cepas de *S. aureus*. Zhang et al. (2015) sintetizaram tiossemicarbazonas derivadas de isatina e avaliaram a atividade contra *S. aureus* e os valores de CIM foram $>100 \mu\text{g/mL}$. Esses resultados obtidos em estudos anteriores diferem dos resultados obtidos neste estudo, pois esses derivados quando foram analisados os resultados de CIM obtidos foram superior, com valores $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$.

Um estudo realizado por Pereira (2015) avaliou a atividade antimicrobiana dos compostos 2,6-diacetilpiridina-semicarbazidahidroclorida, metilissotiocianato-hidrazina-monohidratada e 2-acetilpiridina-4-metil-3-tiossemicarbazida, sobre cepas de *S. aureus*, apresentando CIM entre 19,7 a $3,7 \mu\text{g/mL}$, sendo o composto Bis(4-N-metiltiossemicarbazona)-2,6-diacetilpiridina com maior atividade antibacteriana ($> 500 \mu\text{g/mL}$). Kalaivani et al. (2012) avaliaram a atividade biológica de complexos de tiossemicarbazonas com paládio observando que os valores de CIM para os complexos sobre os microrganismos *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* demonstraram atividade significativa.

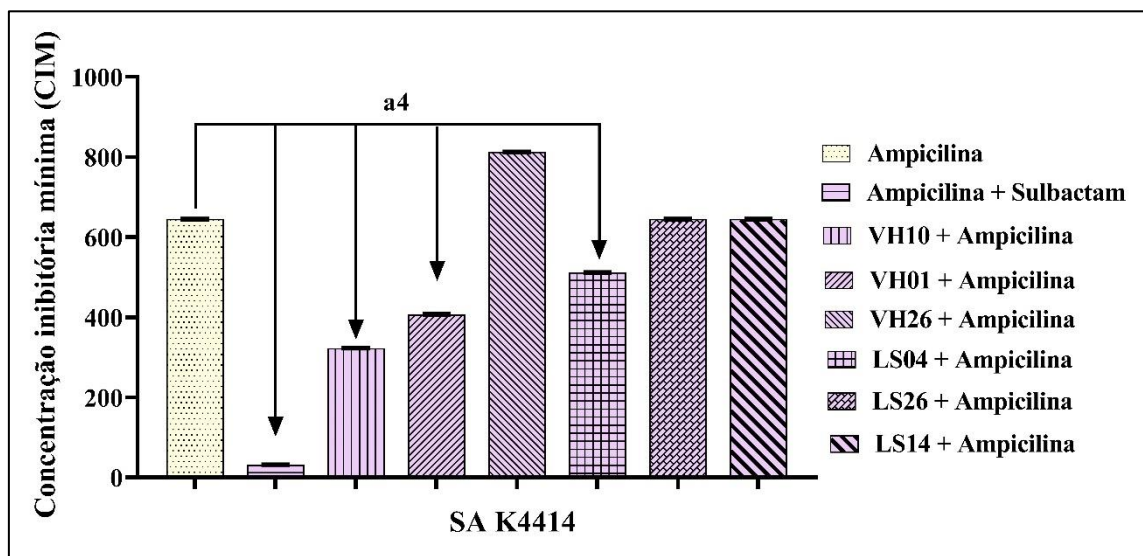
5.2 VERIFICAÇÃO DA INIBIÇÃO DE β -LACTAMASE E DAS BOMBAS DE EFLUXO QacA/B, QacC e MepA

A cepa SA K4414 é portadora de β -lactamase e da bomba de efluxo QacA/B (SIDHU et al., 2001; SIDHU et al., 2002). O sulbactam é tido como um inibidor da β -lactamase e por isso foi testado em associação a ampicilina. Foi possível verificar um aumento do efeito antibacteriano da ampicilina associada ao sulbactam onde a CIM do antibiótico diminuiu, passando de $682,6 \mu\text{g/mL}$ para $32 \mu\text{g/mL}$ na associação com o inibidor de β -lactamase. Em comparação com o resultado do controle do antibiótico, essa redução da CIM foi de aproximadamente vinte e uma vezes, indicando que a cepa SA K4414 testada possui a enzima β -lactamase, podendo ser inibida (CLSI, 2019).

A redução da CIM do antibiótico para a cepa SA K4414 foi clinicamente significativa para os compostos VH10, VH01 e LS04 com redução da CIM do antibiótico de $682,6 \mu\text{g/mL}$ para 341,3, 554,6 e $512 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os outros compostos não obtiveram resultados significativos, isso pode ter ocorrido devido a capacidade quelante dessas substâncias onde o antibiótico não consegue se ligar e consequentemente, agir na célula bacteriana de forma eficiente (Figura 6).

Figura 6 - Avaliação da capacidade potencializadora de antibióticos e de inibição de β -

lactamase pelos compostos VH10 ao LS14 frente a cepa de *S. aureus* SA K4414, associadas à ampicilina.

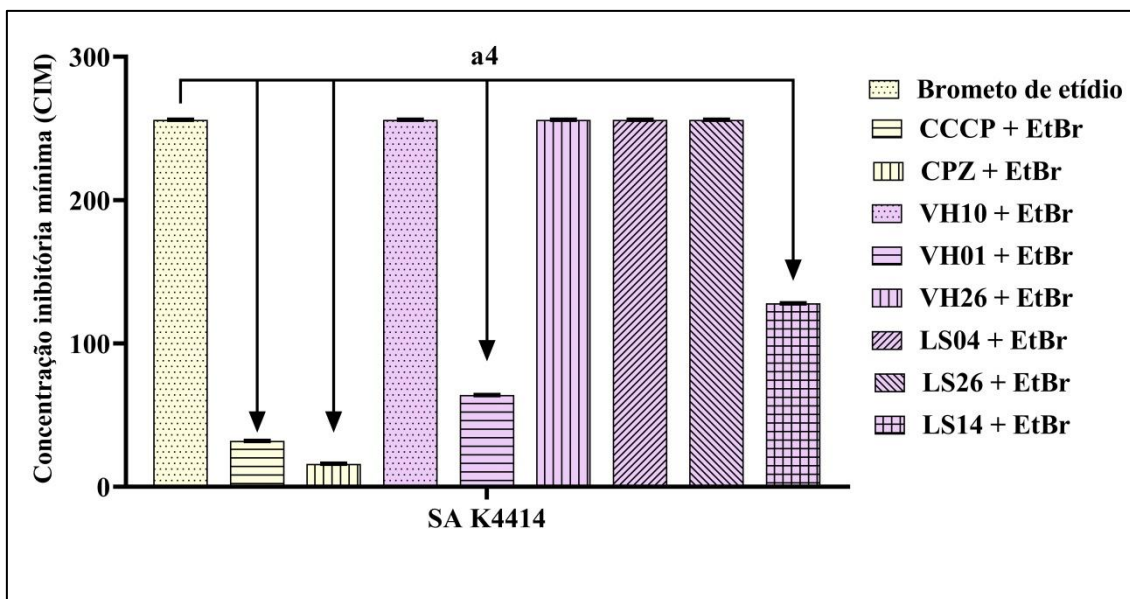


Os

valores representam a média geométrica $\pm$ EPM (erro padrão da média). A análise foi realizada através de ANOVA de uma via. $a4 = P < 0,0001$ vs Ampicilina.

Na cepa SA K4414, a diminuição da CIM brometo de etídio ocorreu na associação com VH01 e LS14 que apresentaram uma MIC de 64 e 128 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, indicando a ocorrência de inibição de QacA/B por esses dois compostos. Os inibidores CCCP e CPZ apresentaram uma concentração associada de 32 e 16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os outros compostos não tiveram atividade estatisticamente significativa (Figura 7). Esses compostos testados possivelmente podem ter atuado como inibidores enzimáticos, pois possuem capacidade de complexação com metais endógenos (BERALDO, 2004).

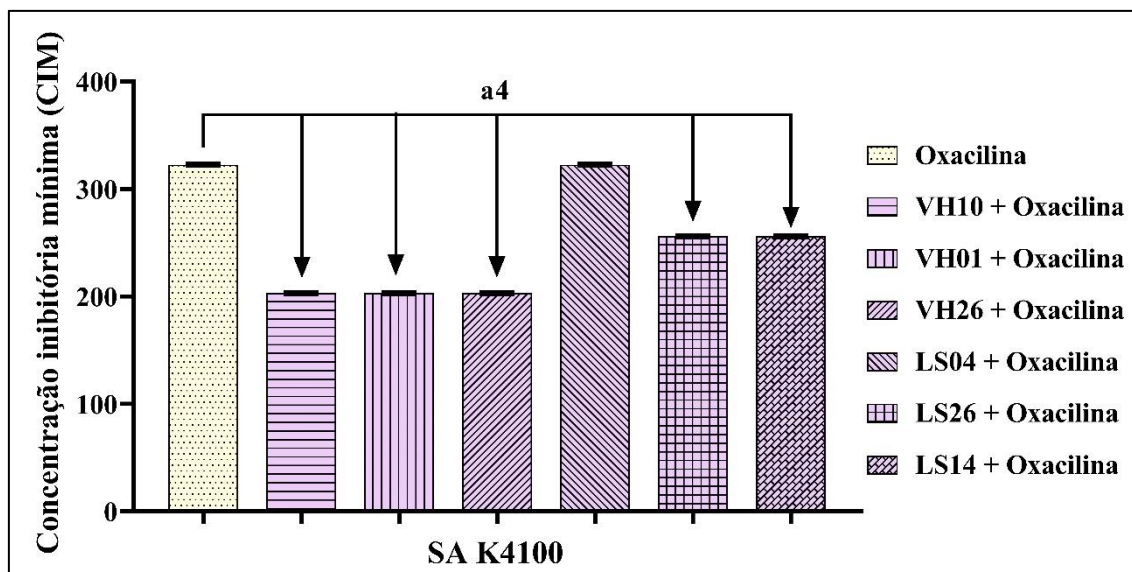
Figura 7 - Avaliação da capacidade de inibição da bomba de efluxo QacA/B pelos compostos VH10 ao LS14 frente a cepa de *S. aureus* SA K4414, em comparação ao controle brometo de etídio.



Os valores representam a média geométrica $\pm$ EPM (erro padrão da média). A análise foi realizada através de ANOVA de uma via. $a_4 = P < 0,0001$ vs Brometo de etídio; EtBr = brometo de etídio; CCCP = carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona; CPZ = clorpromazina.

Os resultados obtidos a partir da concentração sub-inibitória (CIM/8) dos compostos VH10 ao LS14 em associação com a oxacilina, demonstraram resultado estatisticamente relevante frente a cepa K4100 portadora da bomba de efluxo QacC, e portadora de β -lactamase, indicando possível ocorrência de inibição da enzima. A associação do antibiótico com as substâncias VH10 VH01 e VH26 apresentaram CIM de 128 $\mu\text{g/mL}$. A associação com LS26 e LS14 reduziu o valor da CIM para 256 $\mu\text{g/mL}$. A substância LS04 associada ao antibiótico não causou potencialização (Figura 8). As bactérias possuem a capacidade de se adaptar e resistir a altos níveis de antibióticos, como metais tóxicos (MARTINS et al., 2007). De acordo com Lowy (2003) a resistência bacteriana à oxacilina também pode ocorrer pelo mecanismo da β -lactamase, e normalmente relacionada aos genes homólogos dos reguladores do gene *blaZ* de *S. aureus*.

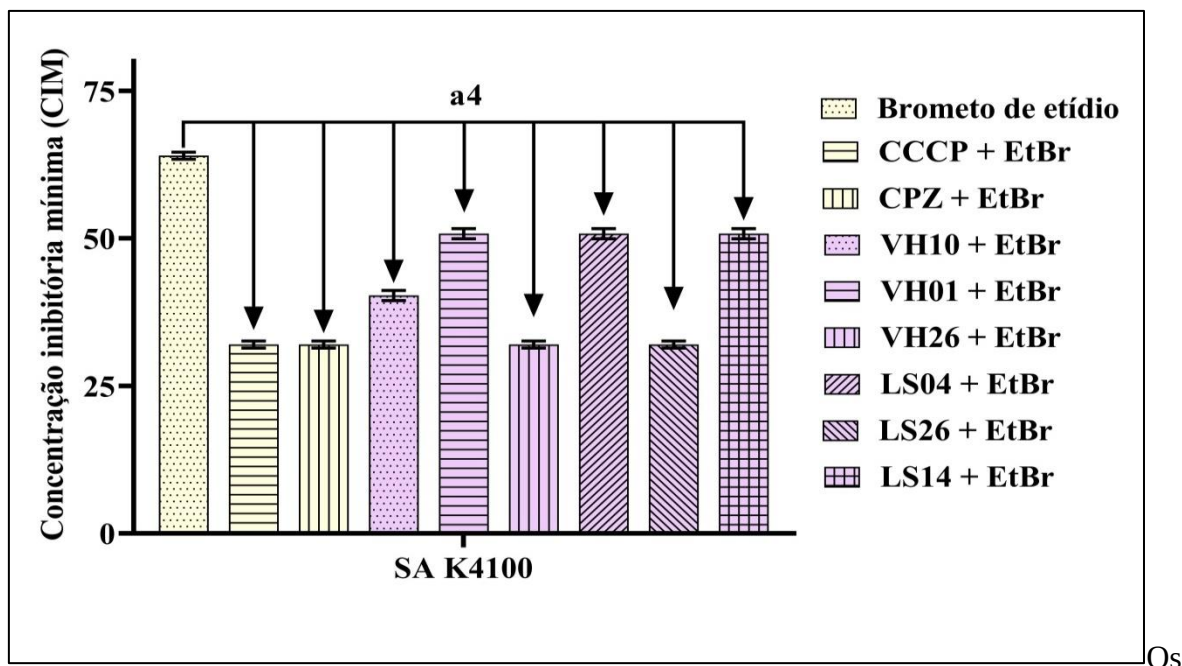
Figura 8 - Avaliação da capacidade potencializadora de antibióticos e de inibição de β -lactamase pelos compostos VH10 ao LS14 frente a cepa de *S. aureus* SA K4100, associadas à oxacilina.



Os valores representam a média geométrica $\pm$ EPM (erro padrão da média). A análise foi realizada através de ANOVA de uma via. $a_4 = P < 0,0001$ vs Oxacilina.

A redução da CIM do brometo de etídio frente a cepa SA K4100 foi estatisticamente significativa para todos os compostos. Todos apresentaram resultados entre 32 e 53,3 $\mu\text{g/mL}$, onde essa redução da CIM associada sugere uma inibição do mecanismo de efluxo de QacC (Figura 9). Essa proteína de efluxo é caracterizada por extrusar compostos de amônia quaternária e brometo de etídio. O aumento da concentração intracelular de brometo de etídio pela inibição de bombas de efluxo, estimula sua intercalação ao DNA e impede a replicação do material genético, impedindo o crescimento bacteriano resultando na diminuição da CIM (NIKAIDO; TAKATSUKA, 2009; WASSENAAR et al., 2015). Como a fenotiazina, a clorpromazina (CPZ), pode inibir bombas de efluxo dependentes e não dependentes de energia (SCHERF et al., 2020), podendo ainda eliminar plasmídeos de bactérias (KRISTIANSEN et al., 2003) e resultados positivos com esse inibidor de bombas, indica reprodutibilidade do experimento. Portanto, os resultados obtidos podem sugerir a ocorrência de inibição de bombas de efluxo e da enzima degradadora de lactamas, ao mesmo tempo.

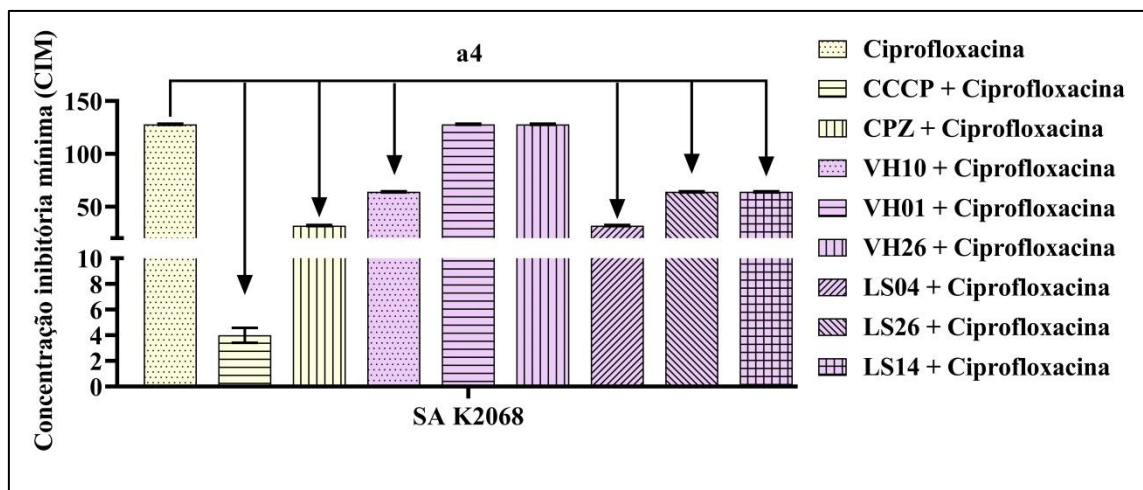
Figura 9 - Avaliação da capacidade de inibição da bomba de efluxo QacC pelos compostos VH10 ao LS14 frente à cepa de *S. aureus* SA K4100, em comparação ao controle brometo de etídio.



valores representam a média geométrica $\pm$ EPM (erro padrão da média). A análise foi realizada através de ANOVA de uma via. $a_4 = P < 0,0001$ vs Brometo de etídio; EtBr = brometo de etídio; CCCP = carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona; CPZ = clorpromazina.

Na cepa SA K2068 que é portadora de MepA, observou-se para quatro compostos atividade sinérgica significativa em associação com a ciprofloxacina por redução da CIM desse antibiótico. O controle apresentou uma concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$. Os compostos VH10, LS26 e LS14 reduziram a CIM da ciprofloxacina para 64 $\mu\text{g/mL}$ e a LS04 reduziu para 32 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando atividade sinérgica desses compostos com o antibiótico. Os inibidores também apresentaram concentrações menores que o controle (Figura 10). O efeito sinérgico evidente sugere a ocorrência da inibição do mecanismo de resistência MepA pelas substâncias testadas (OLIVEIRA-TINTINO et al., 2021).

Figura 10 - Avaliação da capacidade sinérgica e de inibição de bomba de efluxo pelos compostos VH10 ao LS14 frente a cepa de *S. aureus* K2068, associadas à ciprofloxacina.

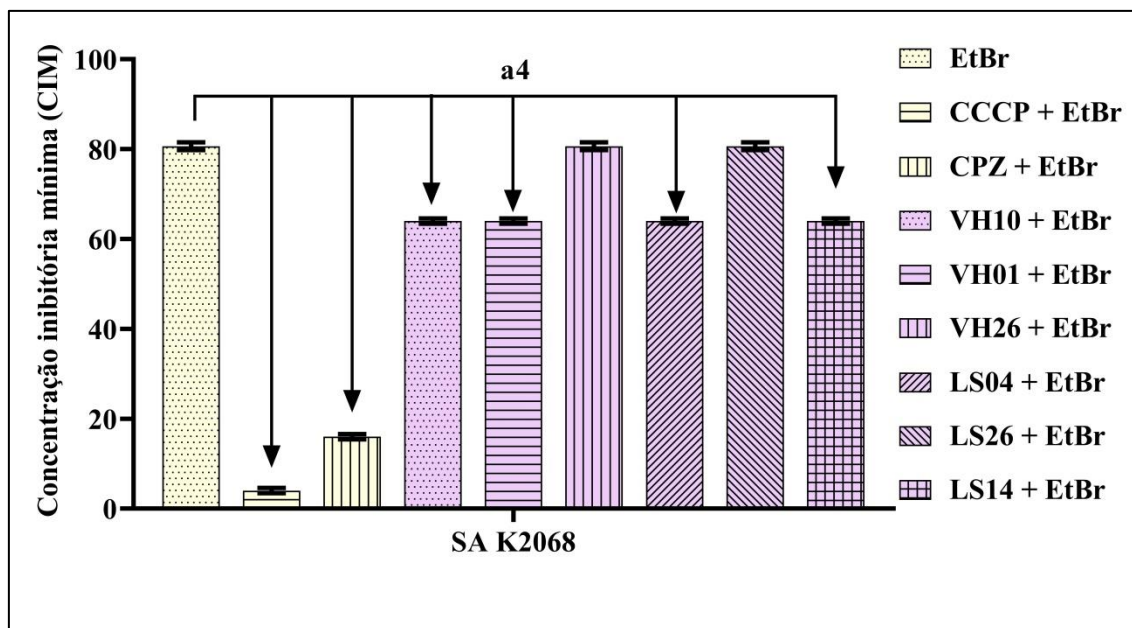


Os

valores representam a média geométrica $\pm$ EPM (erro padrão da média). A análise foi realizada através de ANOVA de uma via. $a_4 = P < 0,0001$ vs Ciprofloxacina; CCCP = carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona; CPZ = clorpromazina.

A associação do brometo de etídio com as semicarbazonas e tiossemicarbazonas demonstrou resultados promissores, frente SA K2068. A CIM associada de VH26 e LS26 foi de 85 µg/mL. Os compostos VH10, VH01, LS04 e LS14 apresentaram atividade sinérgica com uma concentração de 64 µg/mL. Os inibidores padrões CCCP e CPZ obtiveram concentração de 4 e 16 µg/mL respectivamente, demonstrando serem inibidores efetivos e reprodutibilidade do teste. Esses resultados demonstram uma possível inibição de MepA pelas semicarbazonas e tiossemicarbazonas (Figura 11).

Figura 11 - Avaliação da capacidade de inibição da bomba de efluxo MepA pelos compostos VH10 ao LS14 frente a cepa de *S. aureus* SA K2068, em comparação ao controle brometo de etídio.



valores representam a média geométrica $\pm$ EPM (erro padrão da média). A análise foi realizada através de ANOVA de uma via. $a4 = P < 0,0001$ vs Brometo de etídio; EtBr = brometo de etídio; CCCP = carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona; CPZ = clorpromazina.

Tiosemicarbazonas esteroidais, seus derivados e complexos com paládio, foram mais ativas do que a amoxicilina frente a cepas de *S. aureus* em testes antibiograma em meio sólido. Substâncias da classe das semicarbazonas foram testada em cepas de *S. aureus* em estudos realizados por Espíndola et al. (2015) através do método de difusão em discos de papel e o mesmo não apresentou nenhuma inibição no crescimento bacteriano.

Estudos realizados por Nakazone et al. (1990), onde testaram algumas semicarbazonas pelo método da diluição seriada em meio líquido, observaram que os valores de CIM obtidos em cepas de *S. aureus* variaram entre 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ em comparação ao controle 1,25 $\mu\text{g/mL}$, ao qual teve melhor inibição que as semicarbazonas.

Brondani et al. (2008) testaram os compostos S06 (2-butil-1-(5-nitrofurfurilidene)-semicarbazona), S07 (2,4-dibutil-1-(5-nitrofurfurilidene)-semicarbazona), S08 (2-pentil-1-(5-nitrofurfurilidene)-semicarbazona) e S09 (2,4-dipentil-1-(5-nitrofurfurilidene)-semicarbazona). Dentre estes, o S06 apresentou a melhor atividade antibacteriana contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. faecalis*, *Candida sp* e *Aspergillus niger*. Estudos realizados por Santos (2011) testaram-se os mesmos compostos semicarbazônicos onde S03 (2-secbutil-1-(5-nitrofurfurilidene)-semicarbazona), S05 (2,4-pentenil-1-(5-nitrofurfurilidene)-semicarbazona), S07 e S09 frente *S. aureus*, foi observado que estes apresentaram valores de concentração

bactericida mínima e CIM de 8 a 64 vezes menor em relação a nitrofurazona.

A atividade biológica de derivados das semicarbazonas e tiosemicarbazonas pode ocorrer por três tipos de mecanismos, sendo eles: a) inibição da enzima redutase ribonucleotídeo fosfatase (essencial para síntese de DNA); b) criação de lesões em DNA por estresse oxidativo; c) e ligações a bases nitrogenadas de DNA e RNA, bloqueando ou impedindo a replicação das bases, podendo ainda estar ligadas a capacidade quelante que elas possuem (BRONDANI et al. 2008).

O mecanismo de ação antibacteriano da nitrofurazona ainda não está totalmente esclarecido, mas envolve a inibição de sistemas enzimáticos bacterianos, a maioria provavelmente causada devido o dano ao DNA (SANTOS, 2011). A enzima bacteriana, a nitrorredutase, converte os compostos em intermediários de vida curta, incluindo os radicais oxigenados livres, que interagem com o DNA causando a quebra e posterior dano às bactérias. A resistência bacteriana da nitrofurazona não é medida por plasmídios, mas parece ser causada por uma mutação associada à perda da atividade da nitrorredutase bacteriana. Hirano et al. (1967) afirmaram que a atividade antimicrobiana dos nitrofuranos ocorre devido a interferência nas fases precoces do ciclo de Krebs, pela inibição que se processa na formação anaeróbica da acetil-coenzima A, bloqueando o metabolismo glicídico das células bacterianas (SANTOS, 2011).

Dodd, Cramer e Ward (1950) verificou que a substituição do oxigênio em enxofre ou nitrogênio, no anel heterocíclico pode diminuir a atividade antibacteriana das substâncias *in vitro*. Assim, compostos com anel furânico se tornam mais ativos e derivados do pirrol, bem menos ativos. A ação antibacteriana de compostos da classe semicarbazonas e tiosemicarbazonas pode ocorrer por causa do grupo nitro, este funciona comoceptor de elétrons e interfere em processos enzimáticos do metabolismo bacteriano. É sugerido que a presença do nitrogênio cause antagonismo em um aminoácido essencial bacteriano. A redução desse grupo ocorre preferencialmente com esse substrato essencial bacteriano (DODD; CRAMER; WARD, 1950). Hirano et al. (1967) sugeriu que de alguma forma as moléculas eficazes bloqueiam temporariamente a transferência de energia que seria necessária para preceder a divisão celular.

Yoneda e Nitta (1964) observaram que os grupos $-\text{CH}=\text{CH}-$ ou $-\text{CH}=\text{N}-$ entre o 5-nitrofuril e o grupo final da cadeia lateral pode servir como grupo suplementar e aumentar a atividade antibacteriana. Esse achado pode corroborar com o presente estudo, pois na literatura não há estudos publicados para essa classe de substâncias em relação a atividade antibacteriana especificamente em cepas portadoras de bomba de efluxo.

O brometo de etídio é um substrato para as bombas de efluxos utilizado em testes de microdiluição para verificar a inibição de bomba de efluxo, e seu mecanismo de ação está associado à sua ligação direta ao DNA bacteriano (VIVEIROS et al., 2008). O brometo pode intercalar-se com o DNA da bactéria impedir a replicação do seu material genético e causa a morte celular. Para reversão desse efeito, proteínas de efluxo na membrana celular podem expulsar ativamente o brometo do interior da célula para o meio externo, restaurando a atividade de replicação e impedindo o dano celular (BANERJEE et al., 2014). Substâncias que são capazes de inibir as bombas promovem a permanência do brometo, antibióticos e outras substâncias tóxicas dentro da célula bacteriana e tendo como consequência a inibição do crescimento do microrganismo (LIMA et al., 2016; PATEL et al., 2010).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, os derivados semicarbazônicos e tiosemicarbazônicos não apresentaram atividade antibacteriana direta, porém os resultados sugeriram a ocorrência de inibição de bombas de efluxo e de β -lactamase, nas diferentes cepas de *S. aureus*. Os efeitos promissores obtidos especialmente pelos compostos VH01 e VH10 demonstraram que esses compostos podem atuar como componentes potencializadores de antibióticos.

Diante destes dados, fica evidenciado o potencial bioativo de derivados semicarbazônicos e tiosemicarbazônicos, demonstrando assim sua eficácia pré-clínica. Este estudo pode contribuir para o desenvolvimento de futuras pesquisas que buscam fármacos com grande potencial antibacteriano e que sejam eficazes no tratamento da resistência.

REFERÊNCIAS

- ABUSHAHEEN, M. A. et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, p. 100971, 2020.
- ALFEI, S.; ZUCCARI, G. Recommendations to Synthesize Old and New β -Lactamases Inhibitors: A Review to Encourage Further Production. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 3, p. 384, 2022.
- ALI, S. M. M. et al. In vivo anticancer activity of vanillin semicarbazone. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 6, p. 438–442, 2012.
- ALMEIDA, M. et al. *Staphylococcus aureus*. **Mostra Científica em Biomedicina**, v. 1, n. 1, 2017.
- ALÓS, J.-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 33, n. 10, p. 692–699, 2015.
- ANDRADE, Z. A.; BRENER, Z. Ação da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) sobre as formas intracelulares do Trypanosoma cruzi na doença de Chagas experimental. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 11, p. 222–228, 1969.
- ASAE. Autoridade de Segurança Alimentar e Ecológica - Órgão de Polícia Criminal. *Staphylococcus aureus*, 2021. Disponível em: Acesso em: 21 out de 2021.
- BAGNOLI F.; RAPPUOLI R.; GRANDI G. *Staphylococcus aureus*: Microbiologia, Patologia, Imunologia, Terapia e Profilaxia. **Springer; Cham**, Suíça: 2017.
- BANBURY, M. K. Experience in prevention of sternal wound infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. **Surgery**, v. 134, n. 5, p. S18--S22, 2003.
- BANERJEE, A. et al. The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones. **FEBS open bio**, v. 4, p. 251–259, 2014.
- BAPTISTA, M. G. F. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde. Lisboa. **Monografia 51p.-2013**, 2013.
- BARMAK, M. J.; MAHMOUDI, R.; BARDANIA, H. Evaluation of the effect of the internal

layer of oak fruit (jaft) extract on the prevention of gastric ulcers caused by stress in male rats. **Journal of medicine and life**, v. 11, n. 3, p. 225, 2018.

BEHLING, E. L. **Prevalência de microrganismos e resistência bacteriana em isolados de amostras do trato respiratório de pacientes internados em um hospital filantrópico da região do Vale do Rio Pardo**. 2021.

BHARDWAJ, A.; MOHANTY, P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 7, n. 1, p. 73–89, 2012.

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, v. 27, p. 461–471, 2004.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 4, n. 1, p. 31–39, 2004^a.

BJORLAND, J. et al. Novel plasmid-borne gene qacJ mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3046–3052, 2003.

BLAIR, J. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.

BLAIR, J. M. A.; PIDDOCK, L. J. V. How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps. **MBio**, v. 7, n. 4, p. e00840–16, 2016.

BRONDANI, D. J. et al. A new and efficient N-alkylation procedure for semicarbazides/semicarbazones derivatives. **Tetrahedron letters**, v. 48, n. 22, p. 3919–3923, 2007.

BRONDANI, D. J. et al. Novel nitrofurazone derivatives endowed with antimicrobial activity. **Archiv der Pharmazie**, v. 341, n. 10, p. 655–660, 2008.

BUCHAN, K. D.; FOSTER, S. J.; RENSHAW, S. A. *Staphylococcus aureus*: setting its sights on the human innate immune system. **Microbiology**, v. 165, n. 4, p. 367–385, 2019.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality ? **Brazilian Journal of Infections Diseases**, v. 9, p. 70-6, 2005.

CHAN, Y. Y.; ONG, Y. M.; CHUA, K. L. Synergistic interaction between phenothiazines and antimicrobial agents against *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 623–630, 2007.

CHANDRA, S.; PARMAR, S.; KUMAR, Y. Synthesis, spectroscopic, and antimicrobial studies on bivalent zinc and mercury complexes of 2-formylpyridine thiosemicarbazone. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2009, 2009.

CHATTERJEE, S. et al. In vitro inhibition of cholera toxin production in *Vibrio cholerae* by methanol extract of sweet fennel seeds and its components. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, p. JJID--2015, 2016.

CHIKATE, R. C. et al. Transition metal quinone–thiosemicarbazone complexes 1: Evaluation of EPR covalency parameters and redox properties of pseudo-square-planar copper (II)–naphthoquinone thiosemicarbazones. **Polyhedron**, v. 24, n. 8, p. 889–899, 2005.

CHUANCHUEN, R. et al. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 428–432, 2001.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute Standards Development Policies and Process. **Clinical & Laboratory Standards Institute**, 2019.

COSTA, S. S. et al. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **BMC microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2011.

COSTA, S. S. et al. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. **The Open Microbiology Journal**, v. 7, p. 59–71, 2013.

COUTO, R. C.; PEDROSA, T. M. Infecções hospitalares no Brasil e no mundo. **Couto RC, Pedrosa TM, Nogueira JM. Infecção hospitalar: epidemiologia e controle. Rio de Janeiro: Medsi**, p. 1-5, 1999.

DE FREITAS, F. A. et al. Estratégias de evasão de *Staphylococcus aureus* à imunidade inata. 2013.

DELEO, F. R.; CHAMBERS, H. F. Reemergência de *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos na era da genômica. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 9, p. 2464-2474, 2009.

DE OLIVEIRA, R. B. et al. Synthesis and antimalarial activity of semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1983–1988, 2008.

DE VARGAS, A. C. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, p. 159–163, 2004.

DEMARCO, C. E. et al. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3235–3239, 2007.

DODD, M. C. et al. The in vitro bacteriostatic action of some simple furan derivatives. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 82, n. 1, p. 11–18, 1944.

DODD, M. C.; CRAMER, D. L.; WARD, W. C. The relationship of structure and antibacterial activity in the nitrofurans. **Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)**, v. 39, n. 6, p. 313–318, 1950.

DOS SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 413–423, 2007.

DOS SANTOS MONTEIRO, R. F. et al. O uso indiscriminado de antimicrobianos para o desenvolvimento de micro-organismos resistentes. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 53, p. e3597--e3597, 2020.

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; COHEN, F. E. Synthesis and structure-activity relationship study of potente trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2695-2707, 2002.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.

ESPÍNDOLA, J. W. P. et al. Synthesis and structure–activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma Cruzi* Cruzain. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 818–835, 2015.

FREMPONG-MANSO, E. et al. Inability of a reserpine-based screen to identify strains overexpressing efflux pump genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 33, n. 4, p. 360–363, 2009.

GELATTI, L. C. et al. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 5, 2009.

GIBBONS, S.; OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 13–17, 2003.

GRKOVIC, S.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. Regulation of bacterial drug export systems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 4, p. 671–701, 2002.

GUEVARA AGUDELO, F. A. et al. Innovaciones en la terapia antimicrobiana. **Nova**, v. 18, n. 34, p. 9–25, 2020.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667–679, 2010.

HE, G.-X. et al. An H⁺-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 1, p. 262–265, 2004.

HENDERSON, G. B. et al. “Subversive” substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: Alternative approach to chemotherapy of chagas disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Sci. USA. v. 85, p. 5374–5378, 1988.

HEIR, E.; SUNDHEIM, G.; HOLCK, A. L. The qacG gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food

industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 378–388, 1999.

HIRANO, K. et al. Electronic aspect of the antibacterial activity of nitrofuran derivatives.

Bulletin of the Chemical Society of Japan, v. 40, n. 10, p. 2229–2233, 1967.

HOLDEN, M. T. G. et al. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences, v. 101, n. 26, p. 9786–9791, 2004.

HOLLENSTEIN, K.; DAWSON, R. J. P.; LOCHER, K. P. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. **Current opinion in structural biology**, v. 17, n. 4, p. 412–418, 2007.

JOSHI, C.; KHOSLA, N.; TIWARE, P.; *Bioorg. Med. Chem.* 14, 571.0, 2004.

KAATZ, G. W.; MCALEESE, F.; SEO, S. M. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein.

Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 49, n. 5, p. 1857–1864, 2005.

KALAIVANI, P. et al. DNA, protein binding, cytotoxicity, cellular uptake and antibacterial activities of new palladium (II) complexes of thiosemicarbazone ligands: effects of substitution on biological activity. **Metallomics**, v. 4, n. 1, p. 101–113, 2012.

KARAM, G. et al. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. **Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2016.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I.; CAMEOTRA, S. S. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. **Amb Express**, v. 3, n. 1, p. 1–16, 2013.

KHAN, S. A.; ASIRIA, A. M. Synthesis and spectroscopic studies of Ru (II) complexes of steroidal thiosemicarbazones by multi step reaction: as anti-bacterial agents. **ASteroids**, v. 124, p. 23–28, 2017.

KLOOS, W. E.; MUSSELWHITE, M. S. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. **Applied microbiology**, v. 30, n. 3, p. 381–395, 1975.

KRISTIANSEN, M. M. et al. Phenothiazines alter resistance of methicillin-resistant strains of

Staphylococcus aureus (MRSA) to oxacillin in vitro. **International journal of antimicrobial agents**, v. 22, n. 3, p. 250–253, 2003.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 10, p. 1486–1513, 2005.

KUMAR, S. et al. Functional and structural roles of the major facilitator superfamily bacterial multidrug efflux pumps. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 266, 2020.

KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 763–768, 2009.

LEKSHMI, M. et al. Modulação de bombas antimicrobianas efflux da superfamília facilitadora principal em *Staphylococcus aureus*. **Objetivos Microbiologia**, v. 4, n. 1, p. 1, 2018.

LEVY, S.B. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 36, p. 695–703, 1992.

LI, X.-Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. **Drugs**, v. 69, n. 12, p. 1555–1623, 2009.

LIMA, M. F. P. et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares—Revisão de Literatura. **Uningá Review**, v. 21, n. 1, 2015.

LIMA, V. N. et al. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 56–61, 2016.

LITTLEJOHN, T. G. et al. Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. **FEMS microbiology letters**, v. 95, n. 2–3, p. 259–265, 1992.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265–1273, 2003.

LUTZ, L. et al. Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection

in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, p. 224–228, 2003.

MAIA, P. I. DA S. et al. Vanadium complexes with thiosemicarbazones: synthesis, characterization, crystal structures and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Polyhedron**, v. 28, n. 2, p. 398–406, 2009.

MARQUEZ, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. **Biochim**87(12):1137-47, 2005.

MARTINS, A. et al. Prolonged exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) COL strain to increasing concentrations of oxacillin results in a multidrug-resistant phenotype. **International journal of antimicrobial agents**, v. 29, n. 3, p. 302–305, 2007.

MARTINS, T. R. M. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade biológica de ligantes orgânicos da classe das tiossemicarbazonas, semicarbazonas e hidrazonas**. 2017. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2017.

MCALLEESE, F. et al. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1865–1871, 2005.

MENDES, C. D. B. **Síntese e avaliação das atividades antinociceptiva e antichagásica de hidrazonas e semicarbazona derivadas do novo heterociclo pirrolidina [1, 2-d][1, 2, 4]-2-oxadiazolina**. Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

MITCHELL, B. A.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. QacA multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanyldrazones. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 475–477, 1998.

MOREIRA, M. A. S. et al. Multidrug efflux systems in *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* obtained from wholesome broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 241–247, 2009.

MORITA, Y. et al. NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is an Na⁺-driven multidrug efflux pump. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 23, p. 6694–6697, 2000.

- MOURA, A. S. et al. Resistência bacteriana associada aos casos de infecção hospitalar na Santa Casa de Misericórdia de Passos (MG): estudo de caso. **Ciência ET Praxis**, v.11, n.21, p. 95-106, 2018.
- MURAI, A. Y. et al. Tratamento de infecções hospitalares causadas pela *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) com antibióticos da classe das cefalosporinas. **Revista Brasileira de Ciências Biomédicas**, v. 3, n. 1, p. 06-12, 2022.
- NAKAZONE, V. M. F. et al. Semicarbazonas heterociclicas: 2. Atividade antimicrobiana. **Revista de farmacia e bioquímica da Universidade de Sao Paulo**, p. 112-22, 1990.
- NASIE, I.; STEINER-MORDOCH, S.; SCHULDINER, S. New substrates on the block: clinically relevant resistances for EmrE and homologues. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 24, p. 6766–6770, 2012.
- NGUYEN, M.-T. et al. Inactivation of *farR* causes high rhodomycinone resistance and increased pathogenicity in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1157, 2019.
- NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 769–781, 2009.
- NOBLÍA, P. et al. Vanadium (V) complexes with salicylaldehyde semicarbazone derivatives bearing in vitro anti-tumor activity toward kidney tumor cells (TK-10): Crystal structure of [VVO₂(5-bromosalicylaldehyde semicarbazone)]. **Journal of Inorganic Biochemistry**. V. 99, p. 443-451, 2005.
- OLIVEIRA, E. B. J.; CAVALCANTE, L. B. S.; RIBEIRO, D. L. R. Atividade antimicrobiana do *Allium Sativum* em combate a *Candida Albicans* e *Staphylococcus Aureus*: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, v. 7, n. 1, p. 9205-9231, 2021.
- OLIVEIRA, G. A. et al. Avaliação da tolerância à vancomicina em 395 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 37, p. 239–246, 2001.
- OLIVEIRA-TINTINO, C. D. M., TINTINO, S. R., MUNIZ, D. F., DOS SANTOS

BARBOSA, C. R., PEREIRA, R. L. S., BEGNINI, I. M., ... SILVA, T. G. (2021). Chemical synthesis, molecular docking and MepA efflux pump inhibitory effect by 1, 8-naphthyridines sulfonamides. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 160, 105753.

OMS – Organização Mundial de Saúde. Antibiotic resistance. WHO Library Cataloguing-in-Publication, 2017.

ONDUSKO, D. S.; NOLT, D. *Staphylococcus aureus*. **Pediatrics in Review**, 2018.

PAHISSA, A.; **Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus***, 1º edición. Barcelona: ICG Marge,SL,. p. 183, 2009.

PATEL, D. et al. Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5070–5073, 2010.

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.

PELOSI, G. Thiosemicarbazone metal complexes: from structure to activity. **The Open Crystallography Journal**, v. 3, n. 1, 2010.

PIDDOCK, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 629–636, 2006.

PIECHOTA M. et al. Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains from Hospitalized Patients in Poland. **BioMed Research International**, 2018.

POOLE, K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. **Journal of applied microbiology**, v. 92, p. 55S--64S, 2002.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. **Annals of medicine**, v. 39, n. 3, p. 162–176, 2007.

PRASCH, S.; BUCAR, F. Plant derived inhibitors of bacterial efflux pumps: an update. **Phytochemistry reviews**, v. 14, n. 6, p. 961–974, 2015.

PUTMAN, M.; VAN VEEN, H. W.; KONINGS, W. N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 4, p. 672–693, 2000.

RAĖBETL, C. et al. Avaliação da resistência antimicrobiana em isolados de *Staphylococcus aureus* por anos. **Perspectivas interdisciplinares em doenças infecciosas**, 2016.

RAJABI, S. et al. Evaluation of multidrug efflux pump expression in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Gene Reports**, v. 18, p. 100537, 2020.

RAMOS, J. L. et al. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 743–768, 2002.

ROBERT, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. **Internal Medicine Journal**, v. 35, p. 97S-105S, 2005.

RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, M. C. et al. Copper complexes of imidazole-2-, pyrrole-2- and indol-3-carbaldehyde thiosemicarbazones: inhibitory activity against fungi and bacteria. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 99, n. 11, p. 2231–2239, 2005.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E. et al. La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. **Biomédica**, v. 34, p. 181–190, 2014.

ROUCH, D. A. et al. Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. **Molecular microbiology**, v. 4, n. 12, p. 2051–2062, 1990.

ROWLING, J.K, 2012. <https://twitter.com/HPfrases/status/186936833383477248>

SANCHEZ, P.; MORENO, E.; MARTINEZ, J. L. The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 781–782, 2005.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

SANTOS, A.V. **Avaliação das atividades biológicas de derivados semicarbazônicos como potenciais candidatos a fármacos.** Dissertação de Mestrado. Universidade federal de Pernambuco – Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, 2011.

SCHERF, J. R. et al. Effect of terpinolene against the resistant *Staphylococcus aureus* strain, carrier of the efflux pump QacC and β -lactamase gene, and its toxicity in the *Drosophila melanogaster* model. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104528, 2020.

SCHLEIFER, K.-H.; BELL, J. A. Family VIII. Staphylococcaceae fam. nov. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 3, p. 392, 2009.

SHAHRIAR, S. M. S. et al. In vivo anticancer activity of vanillin, benzophenone and acetophenone thiosemicarbazones on swiss albino mice. **Journal of Costa Life Medicine**, v. 2, n. 10, p. 811-816, 2014.

SHORE, A. C. et al. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3765–3773, 2011.

SHRIRAM, V. et al. Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phyto-therapeutics to combat threatening antimicrobial resistance. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2990, 2018.

SIDHU, M. S., HEIR, E., SØRUM, H., & HOLCK, A. (2001). Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and β -lactam antibiotics in food-related *Staphylococcus* spp. **Microbial Drug Resistance**, 7(4), 363-371.

SIDHU, M. S., HEIR, E., LEEGAARD, T., WIGER, K., & HOLCK, A. (2002). Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β -lactamase transposon Tn 552 among clinical staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46(9), 2797-2803.

SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, p. 844–855, 2006.

SILVER, S.; PHUNG, L. T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annual review of microbiology**, v. 50, n. 1, p. 753–789, 1996.

SOARES, M. A. et al. N4-Phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cells, structure–activity relationship studies and

investigation on the mechanism of action. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3396-3409, 2012.

TAKANASHI, K.; SHITAN, N.; YAZAKI, K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. **Plant Biotechnology**, p. 14–904, 2014.

TANGALLAPALLY, R. P. et al. Discovery of novel isoxazoles as anti-tuberculosis agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 23, p. 6638–6642, 2007.

TENNENT, J. M. et al. Cloning and expression of *Staphylococcus aureus* plasmid-mediated quaternary ammonium resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 27, n. 1, p. 79–83, 1985.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American journal of medicine**, v. 119, n. 6, p. S3--S10, 2006.

THAMMAVONGSA, V. et al. Staphylococcal manipulation of host immune responses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 529–543, 2015.

TRACEV, T. A.; UNAKAL, C. G. *Staphylococcus aureus*. **StatPearls**, Ago de 2020.

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; WANG, Y.; HOOPER, D. C. Tet38 efflux pump contributes to fosfomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 8, p. e00927--18, 2018.

TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203–218, 2019.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus Aureus* meticilinoresistente. **Salud pública de México** c. 47, p.381-387, 2005.

VESTERGAARD, M.; FREES, D.; INGMER, H. Antibiotic resistance and the MRSA problem. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 2, p. 2–7, 2019.

VIÑUELAS-ZAHÍNOS, E. et al. Co (III), Ni (II), Zn (II) and Cd (II) complexes with 2-acetyl-2-thiazoline thiosemicarbazone: Synthesis, characterization, X-ray structures and antibacterial activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 1, p. 150–159, 2011.

VIVEIROS, M. et al. New methods for the identification of efflux mediated MDR bacteria, genetic assessment of regulators and efflux pump constituents, characterization of efflux systems and screening for inhibitors of efflux pumps. **Current drug targets**, v. 9, n. 9, p. 760–778, 2008.

XAVIER, D. E. **Avaliação da expressão de sistemas de efluxo para a resistência antimicrobiana entre amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa***. 2008. Tese (Mestrado) – Curso de Ciências básicas das Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de São Paulo - SP, 2008.

WASSENAAR, T. et al. Review and phylogenetic analysis of qac genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 5, n. 1, p. 44–61, 2015.

WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5 o ed., Philadelphia, p.1114, 2002.

WRIGHT, G. D. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? **BMC biology**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2010.

YONEDA, F.; NITTA, Y. Electronic structure and antibacterial activity of nitrofurantoin derivatives, **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 12, p. 1264-1268, 1964.

ZGURSKAYA, H. I.; NIKAIDO, H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 219–225, 2000.

ZHANG, X.-M. et al. Synthesis and evaluation of isatin- β -thiosemicarbazones as novel agents against antibiotic-resistant Gram-positive bacterial species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 419–430, 2015.

ZECCONI, A.; SCALI, F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. **Immunology Letters**, v. 150, n. 1-2, p. 12-22, 2013.