



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**HELAINÉ ALMEIDA QUEIROZ**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DICLOFENACO  
SÓDICO FRENTE ÀS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A  
METICILINA (SARM)**

**FORTALEZA**

**2020**

HELAINÉ ALMEIDA QUEIROZ

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DICLOFENACO  
SÓDICO FRENTE ÀS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA  
(SARM)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- Q44a Queiroz, Helaine Almeida.  
AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DICLOFENACO SÓDICO FRENTE ÀS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (SARM) / Helaine Almeida Queiroz. – 2020.  
80 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior .  
Coorientação: Prof. Dr. Cecília Rocha da Silva.
1. *Staphylococcus aureus*. 2. resistência. 3. biofilme. 4. sinergismo . 5. reposicionamento de fármacos. I. Título.
- 

CDD 616.9

HELAINÉ ALMEIDA QUEIROZ

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DICLOFENACO  
SÓDICO FRENTE ÀS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA  
(SARM)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Aprovada em: 03/12/2020.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva (Coorientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho  
Universidade Regional do Cariri (URCA)

---

Prof. Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti  
Faculdade Maurício de Nassau

A Deus.  
À minha família.

## AGRADECIMENTOS

A Deus (sempre), por me guiar, proporcionar a vida que tenho e por nunca me desamparar.

À minha família, peça chave que representa amor, carinho e cuidado, à qual serei sempre grata. Aos meus pais Hélio e Albaniza, por todo amor, cuidado, apoio e investimento e por acreditarem que eu sempre posso buscar mais e ir longe. Afinal como certa vez meu pai disse “Filha, a vida apenas lhe deu curvas, mas o ponto final quem coloca é você”.

À minha irmã, Heládia, não tenho palavras suficientes para agradecê-la. Obrigada, por cuidar do meu bem mais precioso, sem você certamente tudo seria mais difícil.

Ao meu filho Benício, por me mostrar o verdadeiro sentido do amor incondicional, por ter me transformado em um ser humano melhor.

Ao meu esposo Tibério, por toda a paciência, amor, compreensão.

Ao Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior por sua orientação, confiança e apoio, por ser um exemplo de profissional e de ser humano.

Aos professores membros da banca que dispuseram de seu tempo para estarem presentes, contribuindo para a melhoria do trabalho realizado.

Aos amigos do LABIMAN, Letícia Serpa, Lisandra Juvêncio, Dayana Dias, Bruna Nascimento, Maria Aparecida, João Batista, Cecília Rocha, Lívia Sá, Aryadine Venâncio, Amanda Cavalcante, Vitória Farias, Daniel Sampaio, Amanda Barbosa por todas as contribuições e parceria ao longo desses dois anos.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM), bem como todos os professores por todo o conhecimento compartilhado ao longo desses anos, com ensino de excelência.

“Dificuldades preparam pessoas para desafios extraordinários”.

C.S Lewis.

## RESUMO

Nos últimos anos, tem sido relatado um aumento na incidência de infecções causadas por bactérias, dentre elas *Staphylococcus aureus* que corresponde a 50% das infecções constatadas em várias regiões do mundo. Atualmente, os fármacos disponíveis para o tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) são limitados e esse microrganismo desenvolveu resistência a praticamente todos os antibióticos indicados para seu tratamento. Este fato está associado, principalmente, a alguns de seus fatores de virulência, tais como as hemolisinas, as enterotoxinas estafilocócicas, a toxina-1 do choque tóxico estafilocócico (TSST-1), a citotoxina Panton-Valentine leucocidina (PVL) e a sua capacidade de formar biofilme que apresenta até mil vezes mais resistência se compararmos a sua forma plactônica. Diante disso, faz-se necessária a busca por novas opções terapêuticas e um reposicionamento adequado de fármacos. O reposicionamento de fármacos é uma alternativa terapêutica, já que otimiza o tempo e reduz os custos se compararmos com a implantação de uma nova molécula no mercado. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do diclofenaco sódico isolado e em combinação com a oxacilina frente a células plactônicas, antibiofilme e em biofilme formado em cepas clínicas de SARM. Para isso, o efeito antibacteriano foi demonstrado por meio da microdiluição, seguindo as recomendações do protocolo M07-A10, *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) e para determinar seu possível mecanismo de ação utilizou-se a citometria de fluxo. As cepas de SARM apresentaram Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) variando entre 156,25 e 1250 µg/mL, o sinergismo com a oxacilina ocorreu em 13 cepas (80%) e o sinergismo também foi visto frente a antibiofilme e em biofilme formado de SARM. Os ensaios de citometria mostrou que esses fármacos alteram a integridade da membrana e promove danos ao DNA das células de SARM, levando-as a um possível processo apoptótico.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, resistência, biofilme, sinergismo, reposicionamento de fármacos.

## ABSTRACT

In recent years, an increase in the incidence of infections caused by bacteria has been reported, including *Staphylococcus aureus* which corresponds to 50% of infections found in various regions of the world. Currently, the drugs available for the treatment of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are limited and this microorganism has developed resistance to practically all antibiotics indicated for its treatment. This fact is mainly associated with some of its virulence factors, such as hemolysins, staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1), Panton–Valentine leukocidin (PVL) and its ability to form biofilm that presents up to a thousand times more resistance when compared to its plactonic form. Therefore, it is necessary to search for new therapeutic options and an adequate repositioning of drugs. Drug repositioning is a therapeutic alternative, as it optimizes time and reduces costs when compared to the implantation of a new molecule on the market. The aim of the study was to evaluate the antimicrobial activity of diclofenac sodium alone and in combination with oxacillin against plactonic cells, antibiofilm and biofilm formed in clinical strains of SARM. For this, the antibacterial effect was demonstrated through microdilution, following the recommendations of the protocol M07-A10, *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) and to determine its possible mechanism of action, flow cytometry was used. MRSA strains showed Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) ranging from 156.25 to 1250 µg/mL, synergism with oxacillin occurred in 13 strains (80%) and synergism was also seen against antibiofilm and in biofilm formed from MRSA. Cytometry tests showed that these drugs alter the integrity of the membrane and promote damage to the DNA of SARM cells, leading them to a possible apoptotic process.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, resistance, biofilm, drug synergism, drug repositioning.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Etapas de desenvolvimento do biofilme.....	26
Figura 2 – Estrutura química do Diclofenaco Sódico e Potássico.....	35
Figura 3 – Desenho esquemático do protocolo do Teste de Sensibilidade M07-A10.....	40
Figura 4 – Microscopia Eletrônica de Varredura, mostrando o crescimento de biofilme de SARM.....	58

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resultado do diclofenaco sódico isolado e combinado com a oxacilina na viabilidade celular de células de SARM.....	49
Gráfico 2 - Fragmentação do DNA ocasionado pelo diclofenaco sódico isolado e em associação com oxacilina frente a cepa de SARM evidenciado pela técnica do TUNEL.....	50
Gráfico 3 - Avaliação do índice de danos ao DNA em cepa de SARM.....	51
Gráfico 4 - Atividade antibiofilme do diclofenaco sódico (DS) e em associação com a oxacilina (OXA) frente a cepas de SARM .....	53
Gráfico 5 - Atividade em biofilme formado do diclofenaco sódico (DS) isolado e em associação com a oxacilina (OXA) frente as cepas de SARM.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação do FICI e parâmetros para análise dos dados.....	41
Tabela 2 - Efeito do diclofenaco sódico e da oxacilina sozinho e combinado frente a cepas de SARM determinado pelo método da Concentração Inibitória Fracionada (FICI)	48

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
-	Negativo
+	Positivo
>	Maior
<	Menor
≥	Maior ou Igual
≤	Menor ou Igual
B	Beta
μ	Micro
μg	Micrograma
μl	Microlitro
°C	Grau Celsius
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AINE	Anti-Inflamatório Não Esteroide
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANT	Antagonista
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAMHB	Mueller Hinton de cátion ajustado
CA-SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina advindo da comunidade
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COX	Cicloxigenase
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DS	Diclofenaco Sódico
EPM	Erro Padrão da Média

ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, e Enterobacter sp</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FICI	Concentração Inibitória Fracionada
G	Grama
GISA	<i>Staphylococcus aureus</i> de Sensibilidade Intermediária aos Glicopeptídios
GRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente aos Glicopeptídeos
H	Hora
HA-SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilcolina restritas a ambientes hospitalares
HCl	Ácido Clorídrico
IND	Indiferente
IP	Iodeto de Propídeo
LABIMAN	Laboratório de Bioprospeção de Moléculas Antimicrobianas
M	Molar
mA	Miliampere
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à metilcolina
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)]-2,5-difenil tetrazolium
NAC	N-Acetilcistéina
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetro
OXA	Oxacilina
PABA	Ácido Para Aminobenzoico
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PBP	Proteína de Ligação com a Penicilina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIA	Polissacarídeo de Adesão Intercelular
PVL	Panton-Valentine Leucocidina
RNA	Ácido Ribonucleico

SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
SCCmec	Cassete Cromossômico Estafilocócico mec
SIN	Sinérgico
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay</i>
UFC <sup>1</sup>	Universidade Federal do Ceará
UFC <sup>2</sup>	Unidade Formadora de Colônias
US\$	Dólar Americano
USA	Estados Unidos da América
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
TSST-1	Toxina-1 do Choque Tóxico Estafilocócico

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	20
2.1	Infecções por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
2.2	Infecções causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a metilina (SARM).....	20
2.3	Colonização por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
2.4	Fatores de virulência.....	23
2.4.1	<i>Hemolisinas</i> .....	23
2.4.2	<i>Polissacarídeos capsulares</i> .....	24
2.4.3	<i>Proteína A</i> .....	24
2.4.4	<i>Enterotoxinas estafilocócicas</i> .....	24
2.4.5	<i>Biofilme</i> .....	25
2.5	Patogênese.....	26
2.6	Diagnóstico.....	27
2.7	Prevalência de SARM.....	27
2.8	Arsenal farmacológico.....	31
2.8.1	<i>Agente tópicos</i> .....	31
2.8.2	<i>Agentes orais</i> .....	31
2.8.3	<i>Agentes intravenosos</i> .....	32
2.9	Novas estratégias terapêuticas.....	33
2.10	Diclofenaco sódico.....	35
3	HIPÓTESES.....	37
4	OBJETIVOS.....	38
4.1	Objetivo geral.....	38
4.2	Objetivos específicos.....	38
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
5.1	Microrganismos.....	39
5.2	Fármacos.....	39
5.3	Teste de Sensibilidade aos Fármacos.....	39
5.3.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i> .....	39
5.3.2	<i>Sinergismo do diclofenaco sódico com a oxacilina</i> .....	41

5.4	Ensaio de citometria.....	41
5.4.1	<i>Preparo da suspensão de células de SARM.....</i>	41
5.4.2	<i>Integridade de membrana.....</i>	42
5.4.3	<i>Análise de fragmentação do DNA.....</i>	42
5.4.4	<i>Análise de ruptura do DNA por teste de cometa alcalino.....</i>	42
5.5	Ensaio de biofilme.....	43
5.5.1	<i>Atividade antibiofilme (em formação).....</i>	44
5.5.2	<i>Biofilme formado.....</i>	44
5.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	45
5.7	Análise estatística.....	46
6	RESULTADOS.....	47
6.1	Atividade antibacteriana do diclofenaco sódico.....	47
6.1.1	<i>Resultados dos CIMs do diclofenaco sódico sozinho e em sinergismo com a oxacilina frente a cepas de SARM.....</i>	47
6.2	Análise do possível mecanismo de ação.....	49
6.2.1	<i>Redução do número de células de SARM após o tratamento com diclofenaco sódico isolado e associado a oxacilina.....</i>	49
6.2.2	<i>Fragmentação do DNA induzida pelo diclofenaco sódico isolado e associado a oxacilina evidenciada pela técnica do TUNEL.....</i>	49
6.2.3	<i>Ruptura do DNA induzida pelo diclofenaco sódico isolado e associado a oxacilina evidenciada pela técnica do Cometa alcalino.....</i>	50
6.3	Análise do diclofenaco sódico e em combinação com a oxacilina frente a biofilme em formação e formado de SARM.....	51
6.3.1	<i>Ação antibiofilme do diclofenaco sódico sozinho e em combinação com a oxacilina.....</i>	51
6.3.2	<i>Ação do diclofenaco sódico isolado e em sinergismo com a oxacilina em biofilme formado.....</i>	55
6.3.3	<i>Análise de imagens do MEV.....</i>	58
7	DISCUSSÃO.....	60
8	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS .....	65

## 1. INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva, vista na microscopia em forma de cocos aglomerados. Atualmente, pode ser classificada de acordo com sua sensibilidade às  $\beta$ - lactamases, em: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) (ENRIGHT, 2002; LOWY, 1998; SHUKLA et al., 2010).

Esse microrganismo faz parte da microbiota humana e cerca de 30% dos indivíduos da população mundial são colonizados por tal patógeno na ausência de sintomas (DELEO et al., 2010; TONG et al., 2015). No entanto, as pessoas que são colonizadas apresentam um fator de risco para as infecções subsequentes, principalmente quando são colonizadas pelo SARM (GORWITZ et al., 2008a).

As infecções hospitalares são consideráveis devido a sua frequência, morbidade e mortalidade, destacando-se dentre elas as infecções ocasionadas pela bactéria *Staphylococcus aureus* (CATÃO et al., 2012). SARM é considerado umas das principais bactérias responsáveis por infecções hospitalares e adquiridas da comunidade (DIEKEMA et al., 2001; LIU et al., 2015). Acredita-se que mais de 50% das infecções relatadas em ambientes hospitalares no Norte e no Sul da América, Ásia e Malta sejam causadas por esse patógeno. Já na China, Europa, África e Austrália esses valores variam entre 25-50% das infecções (STEFANI et al., 2012).

*Staphylococcus aureus* tornou-se um microrganismo preocupante devido à sua alta resistência aos antibióticos indicados para seu tratamento, como a penicilina, a meticilina, a linezolida e a daptomicina (CHAMBERS, 1997; RAYGADA; LEVINE, 2009). Essa resistência advém do gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação com a penicilina (PBP 2) (CHAMBERS, 1997; STEFANI et al., 2012; STRYJEWSKI; COREY, 2014).

Atualmente, as infecções ocasionadas por esse patógeno são tratadas com glicopeptídeos. No entanto, algumas cepas têm mostrado baixa sensibilidade a esses fármacos, sendo chamadas de *Staphylococcus aureus* de sensibilidade intermediária aos glicopeptídios (GISA), tornando-se uma grande preocupação mundial (ENRIGHT, 2002). Em 2019, por exemplo, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) relatou que foram confirmados 119.000 casos de infecções ocasionadas por SARM a nível mundial durante o ano de 2017, com 20.000 mortes ocasionadas por esse patógeno no mesmo ano (Centers for Disease Control and Prevention, 2019).

A alta prevalência dessas infecções pode ser justificada pelos fatores de virulência apresentados por essa bactéria, dentre eles: as hemolisinas, as enterotoxinas estafilocócicas, a toxina-1 do choque tóxico estafilocócico (TSST-1), a citotoxina Panton-Valentine Leucocidina (PVL) e a coagulase (LIU et al., 2015; LUO et al., 2018). Além disso, SARM tem a capacidade de formar biofilmes, podendo exibir de dez a mil vezes mais resistência aos antibióticos se comparado com as bactérias plactônicas (OYAMA et al., 2016).

Portanto, são necessárias novas alternativas terapêuticas que consigam combater esse patógeno, pois a ausência de investimentos da indústria farmacêutica para a descoberta de novos antibióticos contribui para a falta de medicamentos que solucionem infecções graves por SARM (WORTHINGTON; MELANDER, 2013)

Dessa forma, o redirecionamento de fármacos torna-se uma boa alternativa, pois, do ponto de vista econômico, pode haver até 40% de redução nos custos, visto que há uma diminuição nos gastos obtidos dos estudos farmacológicos e toxicológicos, além de uma minimização do tempo para sua inserção no mercado (ANDRADE-NETO et al., 2018; DIMASI; HANSEN; GRABOWSKI, 2003; SAMPAIO et al., 2018).

Nas últimas décadas, algumas pesquisas vêm demonstrando o potencial antibacteriano do diclofenaco sódico contra alguns patógenos, como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherischia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* (DUTTA et al., 2004; PADMA; YALAVARTHY, 2015; UMARU et al., 2009). Além disso, podem haver combinações de medicamentos com alvos farmacológicos variados, ou seja, uma associação sinérgica, obtendo-se mais benefícios do que a monoterapia, diminuindo a toxicidade e aumentando a eficácia do tratamento (BAHMANI et al., 2019; SILES et al., 2013).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Infecções por *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva que se apresenta em forma de cocos aglomerados, semelhantes a “cachos de uvas” (LAKHUNDI; ZHANG, 2018). Essa bactéria faz parte da família Micrococcaceae, a qual incorpora quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus* (KONEMAN et al., 2008).

Essa bactéria tem forma esférica e possui apenas 1 µm de diâmetro, aproximadamente. Ela se distingue de outras espécies de *Staphylococcus* devido à sua pigmentação em amarelo ouro e à sua positividade para provas bioquímicas de coagulase, fermentação de manitol e testes de desoxirribonuclease (LOWY, 1998).

*Staphylococcus aureus* apresenta diversos fatores de virulência e toxinas que contribuem para sua transmissão e sua não eliminação pelo sistema imunológico humano, dentre eles: coagulase, hemolisinas que danificam a membrana celular, enterotoxinas estafilocócicas responsáveis por intoxicação alimentares, síndrome do choque tóxico (TSST-1), toxinas esfoliativas que ocasionam a síndrome da pele escaldada, proteína estafilocócica A e citotoxina Panton-Valentine leucocidina (PVL). Em geral, as diferentes combinações desses fatores contribuem para a obtenção das mais variadas infecções (LIU et al., 2015; LUO et al., 2018).

Além dos fatores citados acima, esse patógeno também tem a capacidade de formar biofilmes, podendo exibir de dez a mil vezes mais resistência aos antibióticos se comparado com as bactérias plactônicas (OYAMA et al., 2016).

Apesar de ser um microrganismo com várias estratégias de disseminação, acredita-se que 30% dos indivíduos da população mundial são colonizados por tal patógeno na ausência de sintomas, ou seja, faz parte da microbiota normal desses humanos (DELEO et al., 2010; TONG et al., 2015).

### **2.2 Infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM)**

Atualmente, *Staphylococcus aureus* pode ser classificada, de acordo com sua sensibilidade aos β- lactâmicos, em: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) e

*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (SARM) (ENRIGHT, 2002; LOWY, 1998; SHUKLA et al., 2010).

O primeiro caso humano de infecção causada por SARM ocorreu na década de 60, em um paciente no Reino Unido. Posteriormente, várias outras cepas desse patógeno foram evidenciadas e relatadas a nível mundial, principalmente no decorrer na década de 80 (COOKSON, 2011).

Essa bactéria é preocupante devido à sua resistência intrínseca aos beta-lactâmicos. Ressalte-se que essa classe de antibióticos inclui as penicilinas, a amoxicilina, a oxacilina, a meticilina, dentre outras (HAMILTON; MACGOWAN, 2019).

Por esse motivo, SARM é considerado um microrganismo ESKAPE, onde fazem parte os seguintes microrganismos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter sp*, ou seja, patógenos que têm prioridade e urgência em pesquisas científicas (ROCH et al., 2019; ANDRADE NETO, 2015).

A supracitada resistência surgiu a partir da aquisição do “cassete cromossômico estafilocócico mec” (SCCmec), gene *mecA*, que codifica uma transpeptidase chamada de proteína de ligação com a penicilina (PBP 2a). Essa proteína é responsável pela mudança do sítio de ligação da meticilina, o que ocasiona a resistência a esse fármaco (LENCASTRE; OLIVEIRA; TOMASZ, 2007).

Tradicionalmente, as infecções causadas por SARM estavam restritas aos ambientes hospitalares, sendo chamadas de cepas HA-SARM. No entanto, nas últimas décadas, tem havido um crescente aumento de cepas de SARM advindas da comunidade (CA-SARM). CA-SARM são definidas como microrganismos que vêm dos pacientes ambulatoriais ou de isolados de pacientes de até 48 horas após a internação hospitalar (GELATTI; BECKER, 2009; GORDON; LOWY, 2008).

Dessa forma, devido ao aumento de infecções por SARM, seu tratamento atual consiste no uso dos glicopeptídeos, principalmente, da vancomicina e da teicoplanina. Essa classe de fármacos age primordialmente por meio de mecanismos de ação combinados que inibem a síntese de peptoglicano, além de alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática e de interferir na síntese de RNA citoplasmático. À vista disso, esses mecanismos inibem a síntese da parede celular bacteriana (REYNOLDS, 1989; VAN BAMBEKE et al., 2004).

### 2.3 Colonização por *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* pode ser tanto um microrganismo comensal aos seres humanos quanto um importante causador de infecções sérias. Acredita-se que de 30% a 50% dos adultos saudáveis são colonizados por ela e que entre 10% e 20% possuem colonizações persistentes pelo supracitado patógeno (LOWY, 1998).

O local mais acometido por colonizações são as fossas nasais, com cerca de 20% dos indivíduos colonizados apresentando esse patógeno em sua microbiota nasal. Apesar de ser o local mais comumente encontrado, *Staphylococcus aureus* também pode se abrigar na pele, no períneo, na faringe, nas axilas, na vagina e no trato gastrointestinal (WERTHEIM et al., 2005).

Conforme existe a colonização, o indivíduo fica mais sensível a ter uma infecção futura pela cepa colonizadora (GORDON; LOWY, 2008). Um estudo feito por Brown et al., (2013) diz que 80% das bacteremias nosocomiais são causadas por cepas colonizadoras endógenas.

Os pacientes que possuem maior predisposição a essa colonização são aqueles que apresentam diabetes mellitus tipo 1, os usuários de entorpecentes absorvidos de forma intravenosa, os que fazem uso de hemodiálise, os que realizam algum procedimento cirúrgico e os que são portadores do vírus causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (LOWY, 1998).

Outros indivíduos também podem ser colonizados por SARM, sendo eles portadores assintomáticos, constituindo o principal reservatório e fonte de propagação da bactéria (ALVAREZ; LABARCA; SALLES, 2010).

Nos anos de 2003 e 2004, nos Estados Unidos, cerca de 1,5% da população norte americana eram colonizadas por cepas de SARM, correspondendo a cerca de 4,1 milhões de pessoas, sendo 0,8% maior do que anos de 2001 e 2002. O estudo também aponta que a prevalência de colonização por SARM não varia se compararmos com sexo, etnia ou raça, mas que é significativamente maior em pessoas acima de 60 anos (GORWITZ et al., 2008). Estudos mostram que mais da metade dos pacientes colonizados por SARM permanecem dessa forma por mais de um ano e que 21% deles podem se manter colonizados por mais de 4 anos (ROGERS et al., 2014).

Essa situação de estado portador de SARM pode ser modificada por meio da descolonização, consistente na administração tópica de antimicrobianos ou antissépticos, com

ou sem terapia antimicrobiana sistêmica, que pode erradicar ou suprimir o estado de portador. A principal vantagem dessa descolonização é a prevenção do desenvolvimento subsequente de infecção em um paciente colonizado e a interrupção da transmissão de SARM para outros pacientes (ALVAREZ; LABARCA; SALLES, 2010).

## **2.4 Fatores de virulência**

A capacidade de colonização e patogenicidade de *S.aureus* advém dos seus fatores de virulência que facilitam a adesão celular, a captação de nutrientes e dificultam a resposta imunológica do hospedeiro (SANTOS et al., 2007).

Os fatores de virulência podem ser segregados em três categorias: os relacionados com a aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, como a produção de fibrinogênio, fibronectina, colágeno e coagulase; os relacionados com os mecanismos de evasão do hospedeiro, como as enterotoxinas estafilocócicas, a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), a proteína A, lipases e polissacarídeos capsulares e os relacionados com a penetração na célula e disseminação nos tecidos do hospedeiro (GORDON; LOWY, 2008).

### **2.4.1 Hemolisinas**

Essas toxinas receberam essa denominação inicialmente por sua capacidade de ocasionar a lise dos eritrócitos, extraíndo dessa forma o ferro contido nessas células. O ferro é um componente indispensável em diversos processos biológicos da bactéria. As hemolisinas são classificadas em quatro tipos alfa, beta, gama e delta (HUSEBY et al., 2007; KONEMAN et al., 2008).

A hemolisina alfa tem propriedades pró-inflamatórias que contribuem para a formação de poros na membrana da célula, interrompendo a integridade celular dos hospedeiras (HADDAD et al., 2018). A hemolisina beta é conhecida como uma esfingomielinase, ou seja, atua sobre o complexo lipocarboidrato esfingomielina. Ela aumenta sua atividade hemolítica pela exposição dos eritrócitos a temperaturas frias, sendo denominada também por hemolisina “quente-fria” (KONEMAN et al., 2008; SALGADO-PABÓN et al., 2014).

A hemolisina gama atua principalmente como surfactante, rompendo a membrana celular e promovendo o extravasamento do conteúdo celular e, por fim, a hemolisina delta que

atua sobre os leucócitos, promovendo sua ruptura por meio de alterações na permeabilidade celular dos íons (KONEMAN et al., 2008).

#### **2.4.2 Polissacarídeos capsulares**

Algumas cepas de *S.aureus* podem produzir esses tipos de polissacarídeos que comprometem o sistema imune, impedindo a fagocitose do microrganismo (KONEMAN et al., 2008). Os estudos relatam que existe cerca de onze tipos capsulares, mas as que mais se sobressaem no isolados clínicos são as cápsulas do tipo cinco e oito (GORDON; LOWY, 2008; LOWY, 1998).

Esses tipos cinco e oito são envolvidas no impedimento da opsonização da bactéria e também no interferimento da quimiotaxia e no extravasamento dos neutrófilos para o local da infecção (GORDON; LOWY, 2008).

#### **2.4.3 Proteína A**

A proteína A se encontra na parede celular de *S. aureus*. Ela age como fator de virulência, pois tem capacidade de se ligar a porção Fc de todas as subclasses de IgG humanas (RIGI; GHAEDMOHAMMADI; AHMADIAN, 2019). Os estudos mostram que cerca de 99% das cepas dessa espécie possuem a proteína A (SHOKRI; SALOUTI; ZANJANI, 2015).

Essa proteína interfere na opsonização da bactéria pelas células polimorfonucleares e na ativação do sistema complemento que são capazes de desencadear respostas de hipersensibilidade imediata e tardia (MAZIGI et al., 2019; KONEMAM et al., 2008).

#### **2.4.4 Enterotoxinas estafilocócicas**

As enterotoxinas fazem parte de um grupo de Exotoxinas Pirogênicas Estafilocócicas e Estreptocócicas que além dessas toxinas, também compõem essa família a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST) e um grupo de exotoxinas pirogênicas de estreptococos (ORTEGA et al., 2010).

Essa família de toxinas são conhecidas como superantígenos, sendo capazes de estimular a proliferação inespecífica de células de linfócitos do tipo T via ligação ao MHC de classe II, levando a uma tempestade de citocinas (AUNG et al., 2017; ORTEGA et al., 2010).

Todas elas compartilham três características biológicas: pirogenicidade, superantigenicidade e a capacidade de agir em pequenas quantidades, podendo até mesmo serem letais (KONEMAN et al., 2008).

As enterotoxinas são potentes toxinas gastrointestinais produzidas por *S. aureus* ao longo da fase logarítmica do crescimento ou durante a fase exponencial para estacionária (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). Esse grupo está associado a diversos surtos alimentares e de intoxicação (KÉROUANTON et al., 2007).

Já a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST) ocasiona uma infecção aguda que é caracterizada por um início agudo de febre alta, erupção cutânea eritematosa difusa, descamação da pele, hipotensão e envolvimento de três ou mais falhas de sistemas orgânicos (ORTEGA et al., 2010).

#### **2.4.5 Biofilme**

*Staphylococcus aureus* é um patógeno muito associado a infecções ocasionadas por biofilmes. Como já citado anteriormente, em infecções por SARM, o biofilme é considerado um importante fator de virulência que leva à resistência aos antibióticos e à alta tolerância a condições ambientais adversas (SHIVAEE et al., 2019).

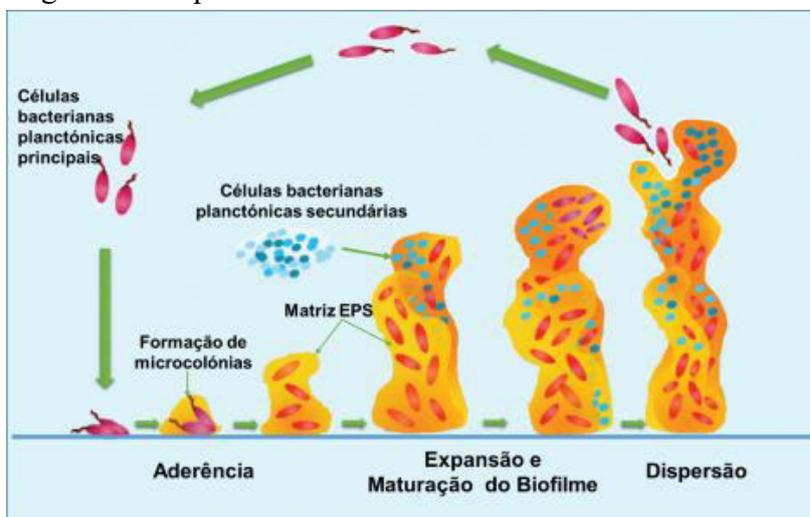
O número de infecções ocasionadas por biofilme bacteriano vem crescendo ao longo dos anos, principalmente devido ao aumento do uso de dispositivos médicos, contribuindo para o desenvolvimento e a persistência de infecções crônicas. Na forma de biofilme, a resistência aos antibióticos aumenta em até 1.000 vezes. Essa problemática estimula várias pesquisas com alternativas que visem a sua erradicação (TOMO et al 2005; TKHILAISHVILI et al., 2018).

A definição de biofilme consiste em ser uma comunidade de microrganismos fortemente aderidos a uma superfície, produzindo matriz extracelular altamente hidratada (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Na etapa de adesão, provavelmente ocorre a ligação das proteínas de superfície bacterianas ou a ligação das proteínas dos receptores do hospedeiro, como fibrinogênio, fibronectina e vitronectina. Durante a proliferação, as células que constituem o biofilme formam uma matriz que serve de proteção contra antibióticos e contra as defesas do hospedeiro. Essa matriz é composta de Polissacarídeo de Adesão Intercelular (PIA), ácidos teicoicos, proteínas

e resto de DNA. Por último, existe o descolamento das células estafilocócicas do biofilme (LIU et al., 2020). Essas etapas podem ser observadas conforme a Figura 1.

Figura 1 - Etapas de desenvolvimento do biofilme



Fonte: Adaptado de Tremblay et.al., 2014.

## 2.5 Patogênese

As patologias causadas pelo *S. aureus* podem ser resultantes tanto de difusão direta dos tecidos e de bacteremia primária, quanto de suas toxinas, unicamente. Tais infecções podem ser encontradas em um ou em vários sítios, recebendo variadas definições de acordo com suas características e locais de proliferação, tais como: sico (bicho-do-pé); foliculite (infecção do folículo piloso); carbúnculo; antraz; furúnculos localizados na região cervical posterior; hordéolo (terçol); hidradenite (inflamação das glândulas sudoríparas); e impetigo (LOWY, 1998; SANTOS et al., 2007)

O *S. aureus* pode ainda causar outras infecções, além das piogênicas, independentemente de estar em um processo infeccioso. Tais mecanismos específicos e patologias fazem com que o *S. aureus* possua algumas características que, eventualmente, não são encontradas em todas as cepas desse Gram-positivo (LANGE et al., 2014).

A capacidade patogênica de uma dada cepa de *S. aureus* está pautada no efeito combinado de toxinas e dos fatores extracelulares, em combinação com as propriedades proliferativas da cepa. Frise-se que a intoxicação estafilocócica alimentar, atribuível unicamente à ingestão de enterotoxina pré-formada, encontra-se em uma extremidade do espectro patológico. Já a bacteriemia estafilocócica e os abscessos disseminados em todos os órgãos se localizam no outro extremo (SANTOS et al., 2007; LANGE et al., 2014).

Os variados tipos de toxina provocados pelo *S. aureus* podem provocar uma resposta imune, com características específicas para cada hospedeiro, a qual é responsável pelas manifestações clínicas específicas do processo infeccioso, determinando, desse modo, o grau de severidade dos sintomas sistêmicos (KONEMAN et al., 2008; LANGE et al., 2014).

## 2.6 Diagnóstico

As amostras utilizadas para o diagnóstico do *Staphylococcus aureus* podem ser derivadas de pus coletados por “swab”, de aspirado de abscessos, aspirado traqueal e líquido cefalorraquidiano. A escolha da coleta vai depender da localização da infecção (KONEMAN et al., 2008).

O exame mais simples e de grande importância, mas que não fecha o diagnóstico, funcionando como um exame de triagem é o esfregaço. Nesse exame, *S. aureus* se apresenta como cocos aglomerados Gram-positivos (KONEMAN et al., 2008, LOWY et al., 1998).

As amostras também podem ser semeadas em placas de ágar-sangue e costumam produzir colônias típicas em 18 horas a 37°C, porém o padrão de hemólise demora alguns dias para seu aparecimento (LANGE et al., 2014). Além disso, pode-se usar ágar sal manitol com cerca 7,5% de NaCl, pois nessa concentração de sal há inibição de vários microrganismos presentes, mas não do *S.aureus* (KONEMAN et al., 2008).

Vale ressaltar, que outros testes como o da catalase e da coagulase também servem para triagem, já que grande parte das cepas desse patógeno são positivas nesses tipos de teste (BROCK et al., 2010).

Por fim, temos os testes de sensibilidade que podem ser feitos por microdiluição e por difusão em disco. Nessas metodologias é possível averiguar quais antibióticos determinada cepa é sensível. Além de ser verificado a resistência a algumas classes de antimicrobianos (LANGE et al., 2014; PETTI; FOWLER, 2003).

## 2.7 Prevalência de SARM

SARM é reconhecido no mundo todo como sendo um importante patógeno causador de infecções comunitárias e hospitalares (SIT et al., 2017). Segundo o estudo relatado em 2019 pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), houveram 20.000 mortes

causadas por SARM e 119.000 casos confirmados de infecções ocasionadas por esse patógeno durante o ano de 2017.

Vale ressaltar que as taxas de mortalidade ocasionadas por esse patógeno são semelhantes às causadas por doenças como a AIDS, a tuberculose e a hepatite viral combinada (SAID et al., 2020).

No entanto, apesar de todos esses casos confirmados, acredita-se que ainda existem muitos casos subnotificados, principalmente, devido ao fato de a esse microrganismo não ser preciso fazer vigilância epidemiológica em alguns países e também pelo fato de existirem pessoas colonizadas por ele que não são notificadas, ou seja, a incidência se baseia predominantemente em estudos publicados (CCIH, 2013).

Acredita-se que mais de 50% das infecções relatadas em ambientes hospitalares no Norte e no Sul da América, Ásia e Malta sejam causadas por esse patógeno (STEFANI et al., 2012). Já na China, Europa, África e Austrália esses valores variam entre 25-50% (STEFANI et al., 2012).

Em um estudo realizado por Fluit et al., (2001), que analisou 3.051 casos de infecções ocasionadas por *Staphylococcus aureus* obtidos de hospitais universitários, observou-se que a maior prevalência de SARM aconteceu em hospitais de Portugal (54%) e da Itália (43%) e que a prevalência mais baixa aconteceu na Suíça (2%) e em Barcelona (9%). A diferença exacerbada entre esses hospitais pode ter sido devido à identificação rápida da cepa, às políticas rígidas de isolamento de pacientes com colonização ou infecção por SARM e a um programa efetivo para o uso racional de antibióticos.

A prevalência de SARM exibe uma variação norte-sul da Europa, com uma proporção maior de isolados resistentes nos países do Sul em comparação com os países do Norte (HASSOUN; LINDEN; FRIEDMAN, 2017).

É importante ressaltar que as infecções ocasionadas por SARM na comunidade estão sendo mais prevalentes do que aquelas adquiridas por SARM em hospitais, a nível mundial, sendo considerado uma grande ameaça global (HASSOUN; LINDEN; FRIEDMAN, 2017).

Em um estudo científico realizado por Cameron et al., (2019) ficou demonstrado que na Austrália a incidência das infecções adquiridas por SARM na comunidade variam de 44 (Tasmânia) e 388 (sul do Território do Norte) casos por 100.000 pessoas/ano, sendo considerada relativamente alta em comparação aos demais países.

Lessa et al., (2010) afirmam que a incidência de infecções sanguíneas ocasionadas por SARM de início na comunidade foi 6,3 vezes maior nos Estados Unidos do que na Inglaterra, enquanto a incidência de SARM de início nos hospitais foi semelhante entre os dois países.

Na América Latina, o primeiro relato de SARM advinda da comunidade aconteceu no Uruguai no ano de 2001, ocasionando infecções em quatro crianças na ausência de fatores de risco para esse tipo de bactéria (GALLIANA, 2003). No entanto, é importante ressaltar que, atualmente, além do Uruguai, os demais países como Peru, Bolívia, Argentina, Paraguai, relatam infecções ocasionadas por essa bactéria de origem comunitária, sendo visto um aumento efetivo ao longo dos anos nessas regiões (MEÍJA; ZURITA; GUZMÁN BLANCO, 2010).

Em outro estudo publicado por Said et al., (2020) mostrou-se que, em um hospital em Al Qassim, na Arábia Saudita, dos 42 isolados obtidos de pesquisas de amostras nasais para *S.aureus*, apenas 6 não eram SARM e que, dessas amostras identificadas como SARM, 50% delas continham genótipos advindos da comunidade.

Dessa forma, é extremamente necessário o monitoramento contínuo da prevalência de infecções ocasionadas por SARM (HUSSEIN; SALIH; RASHEED, 2019). Vale ressaltar que a prevalência pode variar de região para região, levando em consideração alguns fatores, tais como: diferentes tipos de população rastreados, estratégias adotadas pelo estudo que podem focar em todos os pacientes ou somente naqueles de alto risco e por diferentes características dos serviços ou unidades investigadas (SANTOS, 2009).

No Brasil, SARM é responsável por 26,6% a 71% das cepas de *S. aureus* isoladas em diversos estabelecimentos de saúde do País. Em 1994, foi identificada uma cepa de SARM de origem comum entre diversas instituições hospitalares brasileiras, sugerindo que existia transmissão inter-hospitalar desse microrganismo (MOREIRA et al., 1998).

Nos anos de 2005 a 2008, o estudo multicêntrico SENTRY, que conta com a participação de quatro hospitais brasileiros, relatou que *S. aureus* é o principal agente de infecção da corrente circulatória (20,2%), o principal agente de infecções de pele e tecidos moles (28,1%) e o segundo agente mais comum de pneumonia em pacientes hospitalizados (24,9%) (GALES et al., 2009).

Em algumas regiões do Brasil, o estudo sobre a prevalência de infecções ocasionadas por SARM são raros, sendo concentradas na sua maioria nas grandes cidades (FERREIRA et al., 2009). Nos estudos existentes, mostra-se que a prevalência de SARM no

Brasil pode ser considerada alta, com ampla distribuição em vários hospitais, principalmente naqueles tidos como de grande porte (LOUREIRO et al., 2000).

Em um estudo realizado por Ferreira et al., (2009) foi exposto que, em Manaus, no Amazonas, 44% das amostras estudadas mostraram resistência a oxacilina/meticilina, sendo de 15,5% a prevalência de SARM nessas amostras.

Além dele, um estudo publicado por Cavalcanti et al., (2006) mostrou que, em um hospital universitário em Pernambuco, 13% dos isolados de *S. aureus* eram meticilina resistente. Outra pesquisa feita por Spiandorello et al., (2000) mostrou que, em um hospital em Caxias do Sul, localizado no Rio Grande do Sul, a prevalência de isolados de SARM foi de 32,7%.

Em Recife, a taxa de prevalência do supracitado patógeno foi de 13% em amostras de pacientes que estavam em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e, em Salvador, a taxa de infecção por SARM ficou em torno de 28% (FERREIRA et al., 2009).

Outro estudo realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás apontou que, de 295 episódios de bacteremia, 118, ou seja, 40% dos casos, eram ocasionados por *S.aureus* e, desses casos, 66 foram causados por SARM, representando 55,9% dos isolados (GUILARDE et al., 2007).

Em relação à colonização de indivíduos por SARM no Brasil, predominaram nesse grupo crianças, adolescentes e adultos jovens que haviam sido acometidos com lesão cutânea e que evoluíram com complicações. Alguns estudos apontam que casos de colonização por CA-SARM tem capacidade de evoluírem para quadros de endocardite infecciosa, sepse, pneumonia necrotizante e osteomielite (EVANGELISTA; DE OLIVEIRA, 2015).

O primeiro caso de colonização por SARM no Brasil ocorreu no ano de 2004 e foi descrito por Ribeiro et al., (2005). Esses isolados foram obtidos de dois pacientes, um homem de 23 anos de idade e uma mulher de 34 anos, ambos diagnosticados com infecção de pele e tecidos moles.

Posteriormente, houve a descrição do primeiro caso de endocardite ocasionado por CA-SARM, reportado no ano de 2006 em uma unidade hospitalar do Rio de Janeiro. O paciente acometido foi um homem de 27 anos que havia sido internado para tratamento de uma ferida no pé, que posteriormente se agravou, levando a um quadro clínico de endocardite (FORTES et al., 2008).

Em 2017, Bes et al., (2018) relatou que no Hospital das Clínicas de São Paulo, 5,5% dos pacientes eram colonizados por *S.aureus* e que, desses indivíduos, 2,5% apresentavam

colonização por SARM. Nesse relato, a colonização foi considerada baixa quando comparada com outras regiões do Brasil e do mundo.

Portanto, é possível observar a emergência de CA-SARM, tornando-se um fato efetivamente preocupante. Frise-se que, apesar de existirem alguns estudos, a escassez de dados de prevalência acaba sendo um fator limitante do conhecimento da epidemiologia local relacionada ao CA-SARM (GELATTI; BECKER, 2009).

## **2.8 Arsenal farmacológico**

Atualmente, o arsenal farmacológico disponível no mercado para tratamento de SARM é extremamente limitado, contando apenas com um fármaco como opção para medicação de uso tópico, além de poucas opções como recursos terapêuticos orais e algumas alternativas para tratamento por via intravenosa (LIU et al., 2011; LUNA et al., 2010).

### **2.8.1 Agente tópicos**

A opção terapêutica usada para tratamento tópico é a mupirocina, bem como para descolonização da mucosa nasal e lesões cutâneas de pacientes ou profissionais da saúde (DE MOURA et al., 2010).

Seu mecanismo de ação consiste em uma competição com o aminoácido isoleucina pelo sítio ativo da bactéria isoleucil-tRNA-sintetase e, conseqüentemente, não há incorporação deste aminoácido à cadeia polipeptídica do microrganismo, inibindo a síntese protéica bacteriana. À vista disso, esse fármaco é considerado bactericida (FERREIRA, 2010).

Entretanto, devido ao uso contínuo e exacerbado da mupirocina, atualmente é possível observar o aumento crescente da resistência a esse medicamento, principalmente devido a alterações isoleucil-tRNA-sintetase (SHITTU; UDO; LIN, 2009).

### **2.8.2 Agentes orais**

Os fármacos orais mais prescritos para infecções de SARM são a tetraciclina e a rifampicina, combinados, assim como a clindamicina, a linezolida e o sulfametoxazol-trimetoprim (LUNA et al., 2010).

As tetraciclinas agem inibindo o aporte e a ligação dos aminoácidos que fazem parte da síntese proteica por meio da ligação da porção 30S do ribossomo bacteriano. Já a rifampicina age inibindo a biossíntese do RNA bacteriano ao promover o bloqueio da subunidade beta da RNA-polimerase que depende do DNA. Dessa forma, não há a união da enzima do DNA, impedindo o início da transcrição do RNA e, conseqüentemente, impossibilitando a síntese proteica da bactéria (TAVARES, 2014).

Já a clindamicina, que faz parte do grupo das lincosamidas, e a linezolida, que é integrante da classe das oxazolidinonas, possuem mecanismo de ação semelhantes, ou seja, agem interferindo na síntese proteica da bactéria, ligando-se à unidade 50S dos ribossomos, sendo consideradas fármacos bacteriostáticos (MOELLERING JR, 2003; BALLOW et al., 2002).

Por fim, o sulfametoxazol-trimetoprima faz parte do grupo das sulfonamidas, o qual atua inibindo a síntese de ácidos nucleicos e de proteínas. O sulfametoxazol inibe a produção das sintetases que convertem o ácido para aminobenzoico (PABA) em ácido fólico e a trimetoprima bloqueia as redutases que impedem a transformação do ácido fólico em ácido folínico, por meio disso, não se tem a formação dos ácidos nucleicos, exercendo um efeito bacteriostático sobre a bactéria (TAVARES, 2014).

### **2.8.3 Agentes intravenosos**

Para infecções de SARM que necessitam de um tratamento intravenoso, têm-se algumas opções de fármacos, como vancomicina, teicoplanina, tigeciclina, daptomicina (LUNA et al., 2010). Geralmente, para tratar as infecções por SARM, os medicamentos de escolha são a vancomicina ou a daptomicina, de acordo com as recomendações de 2011 da *Infectious Diseases Society of America guidelines* (HASSOUN; LINDEN; FRIEDMAN, 2017; LIU et al., 2011).

A vancomicina e a teicoplanina fazem parte da classe dos glicopeptídeos e esses fármacos agem promovendo a inibição da síntese da parede celular bacteriana, por meio da ligação terminal com as unidades precursoras da parede celular, D-alanil-D-alanil, ou seja, bloqueando a síntese de peptideoglicano (LÉONE; AYEM; MARTIN, 2000; ZENG et al., 2016).

Já a tigeciclina integra-se a classe das glicilciclinas que tem por mecanismo de ação a inibição da síntese proteica bacteriana por meio da ligação da subunidade 30S do ribossomo, bloqueando a entrada do RNA transportador (GREER, 2016).

Outrossim, a daptomicina é considerada um lipopeptídeo cíclico que age interferindo na funcionalidade da membrana celular do microrganismo. Esse fármaco promove uma despolarização na membrana celular, perdendo o potencial da membrana que interfere na formação de proteínas, do DNA e do RNA, ocasionando a morte da bactéria (PATEL; SAW., 2019).

Além desses fármacos relatados, existem as cefalosporinas de quinta geração que são efetivas contra SARM, contudo, seu uso ainda não está disponível em todos os países. Os principais representantes dessa classe são a ceftopibrole e a ceftaroline, ambas administradas por via intravenosa (TAVARES, 2014).

Aqui no Brasil, só está liberada para o uso terapêutico a ceftaroline, que obteve a aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2014. Em outros países, como nos Estados Unidos e na Europa, o uso desse fármaco começou a ser realizado em 2010 e em 2012, respectivamente (BATISTA, 2015).

O que difere essas cefalosporinas das de outras gerações é sua atividade contra SARM. Isso é obtido por meio da sua alta afinidade por proteínas de ligação com a penicilina, que se liga principalmente a um local alostérico da PBP2a, próximo ao domínio da transpeptidase. A ligação a este sítio causa alterações conformacionais que abrem o sítio ativo da molécula, permitindo a ligação de uma segunda molécula do fármaco, obtendo, conseqüentemente, a inibição de sua atividade enzimática (CHOO; CHAMBERS, 2016; FARRELL et al., 2012).

## **2.9 Novas estratégias terapêuticas**

O surgimento de resistência aos antibióticos representa um grande problema de saúde aos humanos (CONLON et al., 2016). Desde a ascensão de cepas resistentes, especialmente de SARM, o tratamento para essa infecção vem se tornando cada vez mais difícil, representando um grave problema de saúde pública (RAYGADA; LEVINE, 2009).

Além disso, outro fator ainda mais preocupante é a falta de investimentos da indústria farmacêutica para a descoberta de novos antibióticos, devido ao baixo retorno que esses fármacos trazem se comparados com os medicamentos utilizados em doenças crônicas,

contribuindo ainda mais para a escassez de alternativas terapêuticas relacionadas a infecções graves (WORTHINGTON; MELANDER, 2012).

Urge ponderar que, para que uma nova molécula seja lançada no mercado, são necessários vários anos de análises, existindo, além dos estudos pré-clínicos que fazem análises farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas, as pesquisas clínicas que de fato levam a molécula a ser testada em seres humanos, estando divididas por fases, durando em média 10 anos (LIMA; REZA, 2003).

Ademais, estima-se que o custo para a inserção de um medicamento novo no mercado farmacêutico seja, em média, US\$ 2,6 bilhões, divididos em um período de aproximadamente 15 anos, segundo dados publicados em novembro de 2014 e promovidos pelo Centro para o Estudo e Desenvolvimento de Fármacos - *Tufts Center for the Study of Drug Development* (DIMASI, 2014). À vista disso, levando em consideração ainda o fato de que aproximadamente 90% dos fármacos acabam obtendo resultados frustrados durante o prosseguimento na fase I dos ensaios clínicos, tal investimento é considerado de elevado risco, segundo o viés econômico-financeiro (LI; JONES, 2012).

Dessa forma, o reposicionamento de fármacos torna-se uma boa alternativa, pois, do ponto de vista econômico, alguns estudos relatam que há diminuição de cerca de 40% dos custos do que com a introdução de uma nova droga no mercado, visto que especificamente há uma redução nos gastos obtidos com os estudos farmacológicos e toxicológicos (DIMASI; HANSEN; GRABOWSKI, 2003).

Os termos reposicionamento de fármaco ou reaproveitamento de fármaco são considerados atribuições farmacológicas para um medicamento que já é utilizado clinicamente, ou seja, novos usos e aplicações terapêuticas que não estão descritas em sua bula (REAUME, 2011; SHIM; LIU, 2014). Trata-se do processo de encontrar novas utilizações para o fármaco, que não estão na indicação médica original, sendo esse medicamento já encontrado em uso no mercado ou algum composto que teve, por ventura, sua pesquisa descontinuada (MARUSINA et al., 2012).

Nesse contexto, surge a opção de realizar mudanças estruturais de fármacos já existentes no mercado, melhorando seus aspectos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos. Essa alternativa é considerada bastante eficaz na identificação de novos compostos potencialmente aceitáveis, por conta da possibilidade de utilizar moléculas-protótipo com eficácia terapêutica comprovada como modelo para o planejamento de fármacos (WERMUTH, 2003).

## 2.10 Diclofenaco sódico

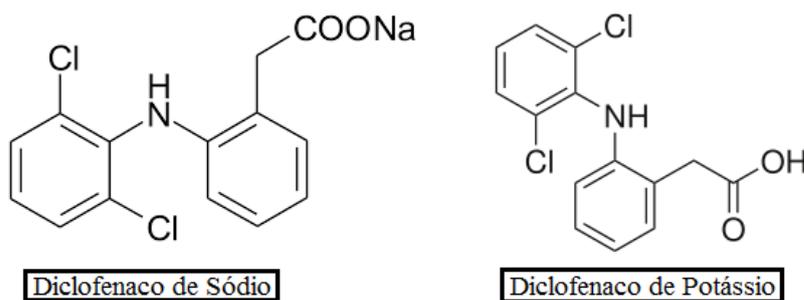
O diclofenaco é um derivado do ácido fenilacético (2- [2,6-ácido dicloranilino] fenilacético), sendo classificado como um anti-inflamatório não esteroide (AINE), comumente prescrito para o uso analgésico, antipirético e anti-inflamatório (SKOUTAKIS et al., 1988).

Esse fármaco é o AINE mais prescrito mundialmente. Estudos apontam que ele é o oitavo medicamento mais comercializado no mundo, tendo sido utilizado por mais de um bilhão de pacientes desde o seu descobrimento (GELLER et al., 2012).

A fórmula molecular do diclofenaco de sódio é  $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ . Já o nome oficial desse fármaco é 2-[(2,6-Diclorofenil)amino] benzoacetato de sódio. Quando puro, é um sólido branco cristalino ou levemente amarelado com pouca solubilidade em água (FARMACOPEIA, 2002).

O uso do diclofenaco sódico iniciou-se no Japão a partir de 1974, mas hoje é prescrito em mais de 120 países e é indicado para o tratamento de dor leve à moderada, artrite reumatoide, osteoartrite e espondilite anquilosante (GAN, 2010). Ele é apresentado em duas formas: sódica e potássica (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura química do diclofenaco sódico e potássico



Fonte: Autor

Seu mecanismo de ação constitui na inibição das cicloxigenases (COX), componente essencial na biossíntese de prostaglandinas. Com a produção reduzida de prostaglandinas, há uma diminuição da dor e da inflamação (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

O diclofenaco sódico possui várias formas de apresentação, tais como: via oral, via tópica e via intramuscular. A posologia recomendada é de 75 mg para dores leves e, no máximo, a dose de 150 mg por dia em casos de dores mais severas (GELLER et al., 2012; MOORE et al., 2004).

Atualmente, algumas pesquisas vêm demonstrando o potencial antibacteriano do diclofenaco sódico contra alguns patógenos, como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (PADMA; YALAVARTHY, 2015).

Em um estudo realizado por Abbas, (2015) mostrou-se que o diclofenaco sódico reduz os fatores de virulência, como a motilidade, os pigmentos piocianina e pioverdina, proteases, biofilme e a atividade hemolítica da *Pseudomonas aeruginosa*, que também é um patógeno que apresenta resistência a vários antibióticos.

Outra pesquisa desempenhada por Dutta et al., (2007) exibiu que o diclofenaco sódico, na concentração de 1,5 a 3 gramas, quando administrados em murinos, reduzia a letalidade contra infecções graves ocasionadas por *Salmonella*.

Além de bactérias, um estudo executado por Ghalehnoo et al., (2010) expôs que esse medicamento também inibe a filamentação e a formação de hifas de *Candida albicans* em concentrações de 500 mg/mL.

O que se acredita é que o diclofenaco sódico frente a bactérias altera os genes associados à regulação e à aquisição de resistência das bactérias, reduzindo assim, os sistemas de efluxo de drogas. Dessa forma, com a redução da expressão das bombas de efluxo, pode-se obter o acúmulo intracelular dos antibióticos, diminuindo os CIMs desses fármacos quando eles estão associados ao diclofenaco sódico (RIORDAN et al., 2011).

### 3. HIPÓTESES

- 3.1. Diclofenaco sódico apresenta atividade antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.
- 3.2. Diclofenaco sódico possui sinergismo quando associado à oxacilina.
- 3.3. Diclofenaco sódico apresenta atividade antibiofilme isolado e em sinergismo frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.
- 3.4. Diclofenaco sódico apresenta atividade antibacteriana frente a biofilme maduro de forma isolada e em sinergismo frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.
- 3.5. Diclofenaco sódico fragmenta o DNA bacteriano.
- 3.6. Diclofenaco sódico interfere na membrana plasmática *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.
- 3.7 Diclofenaco sódico não possui efeito antibacteriana em células plactônicas e em biofilme frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito antimicrobiano do diclofenaco sódico frente a cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

### **4.2. Objetivos específicos**

4.2.1. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do diclofenaco sódico frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina;

4.2.2. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do diclofenaco sódico associado à oxacilina frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina;

4.2.3. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do diclofenaco sódico frente a antibiofilme formado por cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina;

4.2.4. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do diclofenaco sódico frente ao biofilme maduro formado por cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina;

4.2.5. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do diclofenaco sódico associado à oxacilina frente ao antibiofilme formado por cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina;

4.2.6. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do diclofenaco sódico associado à oxacilina frente ao biofilme maduro formado por cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina;

4.2.7. Investigar o possível mecanismo de ação antimicrobiano do diclofenaco sódico através de citometria de fluxo.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Microrganismos**

No presente estudo, foram utilizadas 15 cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (SARM), sendo uma *American Type Culture Collection* (ATCC) de SARM (65398) e outra ATCC de *Staphylococcus aureus* (6538), utilizadas como controle, e 13 cepas clínicas dos mais variados sítios de coleta, como sangue, líquido pleural, ponta de cateter, secreção de abscesso e secreção ocular. Essas cepas foram obtidas do acervo do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Essas cepas ficaram preservadas em solução contendo caldo Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia), com alto teor de glicose (Proquimios, Rio de Janeiro, Brasil) e glicerol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e ficaram estocadas em baixas temperaturas (– 20°C).

Quando vão ser utilizadas, essas cepas são descongeladas e uma pequena alíquota delas são ressuspensas em 1mL de caldo Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia) e posteriormente são levadas para estufa, durante 24 horas a 35°C.

Após esse procedimento, as cepas foram repicadas em ágar Mueller Hinton e incubadas por 48 horas a 35°C. Todo esse processo foi realizado sob padrões de biossegurança 2 (ANDRADE NETO et al., 2019; JOSINO et al., 2021).

### **5.2 Fármacos**

Os fármacos utilizados na pesquisa foram o diclofenaco sódico e a oxacilina. Eles foram adquiridos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich Co. (USA) e, posteriormente, dissolvidos com água destilada estéril.

### **5.3 Teste de Sensibilidade aos Fármacos**

#### **5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

O CIM foi avaliado utilizando a técnica de microdiluição em caldo seguindo o protocolo M07-A10 (CLSI, 2015). O CIM considerado foi aquele que a menor concentração

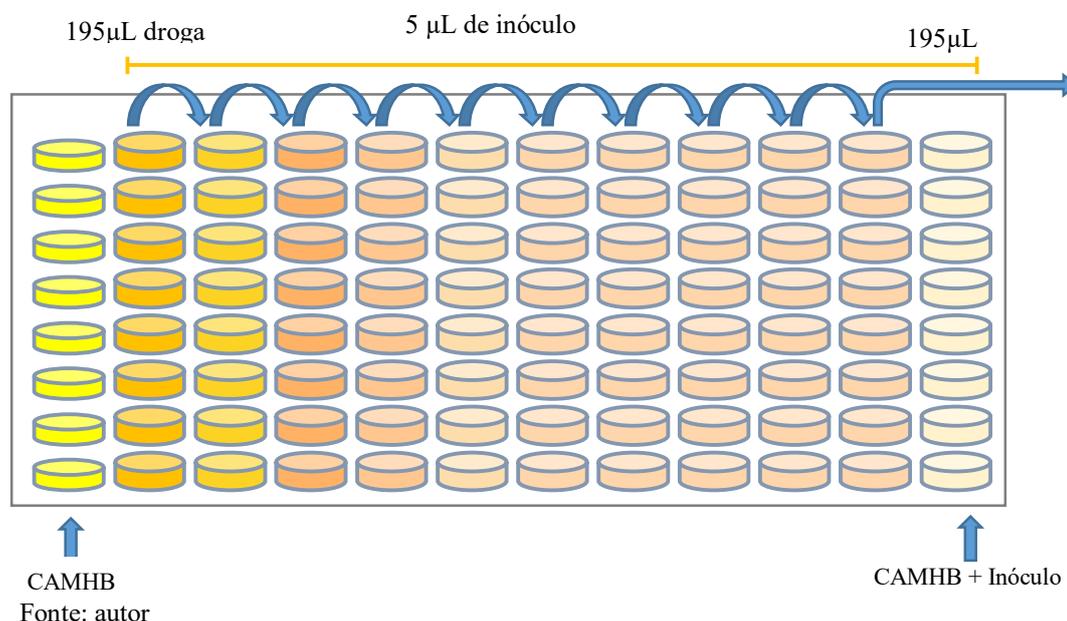
do fármaco foi capaz de inibir 100% do crescimento bacteriano, sendo avaliado pela turbidez de crescimento. O diclofenaco sódico (Sigma-Aldrich Co., USA) foi avaliado na faixa de concentração de 1,95 – 1250µg/mL e a oxacilina (Sigma-Aldrich Co., USA) foi usada como controle positivo na faixa de concentração 0,25 - 64 µg/mL.

Para a realização do teste, foi utilizado o meio caldo Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia) de cátion ajustado (CAMHB) e também placas de poliestireno de 96 poços em fundo “U”. Inicialmente, foi adicionado 195µL do fármaco na coluna dois e em seguida realizou-se a diluição seriada para obtenção do intervalo de concentração desejado dos fármacos. A coluna 1 foi utilizada como controle de esterilidade do meio CAMHB e a coluna 12 como controle positivo do teste (inóculo + meio).

Para preparar o inóculo, as cepas foram semeadas em ágar Mueller Hinton e incubadas por 24 horas. Depois, foram preparadas suspensões de cada cepa em solução salina 0,9% de acordo com a escala 0,5 McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Em seguida, 100 µL dessas suspensões foram colocados em 900 µL de CAMHB e 5 µL foram adicionados em cada poço da placa, com exceção dos poços da coluna 1. As placas foram incubadas por 20 horas a 35 °C e, após esse período, foi feita a leitura visual.

Com a finalidade de comprovar a ocorrência de resistência a oxacilina de todas as cepas, foram levados em consideração o ponto de corte: CIM  $\geq 2$  µg/ mL para oxacilina (CLSI, 2012). Os experimentos foram realizados em triplicata, além de serem utilizadas as cepas padrões como controle, conforme Figura 3.

Figura 3 - Desenho esquemático do protocolo do Teste de Sensibilidade M07-A10



### 5.3.2 Sinergismo do diclofenaco sódico com a oxacilina

A oxacilina foi combinada com o diclofenaco sódico, tendo como referência os CIM de cada uma das drogas. Após essa combinação, foi utilizada a técnica do *checkboxboard* para obtenção da Concentração Inibitória Fracionada (FICI) (LEE; JUNG; CHA, 2014). A relação foi determinada por meio de equação  $FICI = [FC]/[CFS] + [AC]/[CAS]$ , onde [FC] e [AC] são os CIMs do diclofenaco sódico e da oxacilina associados e [CFS] e [CAS] são os CIMs das referidas drogas sozinhas (Tabela 1). Após o resultado dessa equação, o FICI foi classificado como: sinérgico (SIN) ( $FICI \leq 0.5$ ), indiferente (IND) ( $0.5 > FICI \leq 4.0$ ), ou antagonista (ANT) ( $FICI > 4.0$ ) (ODDS, 2003).

Os testes de sensibilidade *in vitro* foram realizados em triplicata em diferentes dias. As médias geométricas foram usadas estatisticamente para avaliar os resultados do CIM.

Tabela 1 - Determinação do FICI e parâmetros para análise dos dados

Cálculo do FICI	Parâmetros	
$FICI A + FICI B$	$FICI \leq 0,5$	<b>SINERGISMO</b>
$FICI A = \frac{CIM A \text{ em combinação}}{CIM A \text{ isolado}}$	$0,5 < FICI < 4,0$	<b>INDIFERENTE</b>
$FICI B = \frac{CIM B \text{ em combinação}}{CIM B \text{ isolado}}$	$FICI \geq 4,0$	<b>ANTAGONISMO</b>

Fonte: Autor

## 5.4 Ensaios de citometria

### 5.4.1 Preparo da suspensão de células de SARM

Foi utilizada, para os experimentos de citometria de fluxo, a cepa 572. A cepa foi semeada em ágar Mueller Hinton a 35 °C por 24 horas. Após isso, a cepa foi suspensa em 5 mL

de meio caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) e reincubada sob as mesmas condições citadas acima.

Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação (3000 g, 5 min) e lavadas três vezes com solução salina 0,85%. Por fim, as células ( $\sim 10^6$  células/mL) foram ressuspensas em meio BHI. (DA SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014).

#### **5.4.2 Integridade de membrana**

A integridade de membrana foi realizada seguindo os protocolos de Neto et al., (2015); Shi et al., (2007); Silva et al., (2011). Para isso, foi utilizado o teste de exclusão com iodeto de propídeo (IP) na concentração de 2mg/L.

Após a incubação com as amostras durante 20 horas, a fluorescência celular foi determinada no citômetro *Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)* e analisada usando o software *CytoSoft 4.1*. Um total de 10.000 eventos foram avaliados por análise (n=2) e os detritos celulares foram omitidos.

#### **5.4.3 Análise de fragmentação do DNA**

A fragmentação do DNA foi vista utilizando a técnica *Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay (TUNEL)* descrita por Dwyer et al., (2012); Andrade Neto et al., (2015). Para isso, as células foram tratadas e fixadas com paraformaldeído a 7%.

As células fixadas foram penetradas com 1% de Triton X-100 em gelo durante 10 minutos e depois incubadas com a mistura reacional TUNEL durante 1 hora a 37 °C. Este experimento descrito acima, seguiu as recomendações do fabricante do kit (Roche, Suíça).

Após isso, 200 células foram contadas por amostra para determinar as porcentagens de células positivas por meio de um microscópio de fluorescência (Olympus, Tokyo, Japan).

#### **5.4.4 Análise de ruptura do DNA por teste de cometa alcalino**

O ensaio em cometa alcalino foi realizado essencialmente como descrito por (Miloshev; Mihayloy; Anachkova , (2001). Cerca de 200  $\mu$ L de agarose 0,5% (Invitrogen,

Grand Island, NY, USA) foram espalhados em cada lâmina e secados a temperatura ambiente antes da aplicação da suspensão de células sobre as lâminas.

As células de SARM foram lavadas com água destilada e ressuspensas em tampão S (sorbitol 1 M e fosfato monopotássico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 mM, pH 6,5). Posteriormente, cerca de  $5 \times 10^4$  células da bactéria foram fundidas com agarose a 0,7% de baixo ponto de fusão (37°C), contendo 2 mg/mL de Zymolase 20T (Seikagaku Corp., Japão) e incubadas por 20 min a 30°C. A fim de minimizar a atividade de enzimas celulares endógenas, todos os procedimentos que se seguem foram realizados em uma sala fria de 8 a 10 °C.

Após esse tempo, as lâminas foram emergidas com NaOH 30 mM, NaCl 1 M, lauril sarcosina a 0,1% e EDTA 50 mM (pH 12,3) durante 1 hora. As lâminas foram lavadas três vezes durante 20 minutos cada em uma solução (30 mM de NaOH, 10 mM de EDTA e pH 12,4) para o desenrolamento do DNA e, em seguida, submetidas à eletroforese no mesmo tampão e executadas à eletroforese por 20 minutos a 0,5V/cm e 24 mA.

Por fim, após a eletroforese, os géis foram neutralizados por submersão das lâminas em 10 mM Tris HCl pH 7,5 durante 10 minutos, seguidos por incubações consecutivas por 10 minutos em etanol 76% e 96%. Depois, foram coradas com brometo de etídio (1 mg/mL) e analisados por microscopia de fluorescência (Olympus, Tóquio, Japão), como foi descrito por Pinkerton et al., (2010). Todos os passos acima foram realizados no escuro para evitar danos adicionais no DNA.

Para cada grupo experimental, foram examinadas 100 células e as imagens foram escolhidas aleatoriamente por meio da microscopia de fluorescência. A leitura é feita através de escores de acordo com o tamanho da cauda e o índice de dano ao DNA foi quantificado visualmente, variando entre 0 (completamente intacto: 100 células X 0) e 400 (dano máximo: 100 células X 4) (COLLINS, 2004).

## **5.5 Ensaio de biofilme**

Após a realização dos ensaios descritos anteriormente, no qual foi visto o potencial antibacteriano do diclofenaco sódico e do diclofenaco sódico mais oxacilina em células planctônicas, houve a necessidade de avaliar o potencial desses fármacos de maneira isolada e associada frente a antibiofilme e biofilme maduro de SARM, utilizando placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato.

### **5.5.1 Atividade antibiofilme (em formação)**

A atividade antibiofilme foi determinada seguindo o protocolo Costa et al., (2014), com algumas modificações. Inicialmente, as cepas foram colocadas em TSB suplementado com glicose a 2%. Posteriormente, elas foram centrifugadas a 3.500 rpm e lavadas por 3 vezes com PBS.

Após isso, foram feitos inóculos em caldo TSB a 0,5 da escala de McFarland ( $1 \times 10^8$  células) e 200  $\mu$ l foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços de poliestireno juntamente com as drogas diclofenaco sódico e diclofenaco sódico com oxacilina em várias diluições, seguindo o CIM de cada uma das cepas. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h.

Posteriormente, o conteúdo foi removido e lavado 3 vezes com PBS. Para a avaliação da viabilidade dos biofilmes, foi realizado o ensaio de redução do MTT (2 mg/ml em PBS). A partir dessa solução, foram adicionados 150  $\mu$ l em cada poço e deixados na estufa por 2 h a 35 °C.

Após o intervalo tempo supracitado, a solução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) foi retirada e foram colocados 100  $\mu$ l dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver o {*E, Z*-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan} (sal de formazan).

Posteriormente, 100  $\mu$ l DMSO foram transferidos para uma nova placa de 96 poços e foi realizada a leitura em um leitor de placas a 570 nm. Os resultados obtidos foram analisados a partir da média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes.

Para a verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA), seguidos pelos testes de Tukey ( $p < 0,05$ ) realizados pelo programa GraphPad Prism® 6.0 (GraphPadSoftware, San Diego, CA, USA).

### **5.5.2 Biofilme formado**

A atividade do diclofenaco sódico e do diclofenaco sódico com oxacilina foi testada em biofilme maduro seguindo o protocolo estabelecido por Branbilla et.al. (2017) com algumas modificações.

Inicialmente, foram feitos inóculos em caldo TSB a 0,5 da escala de McFarland ( $1 \times 10^8$  células), posteriormente 200  $\mu$ l foram postos em cada um dos poços em uma placa de 96 poços de poliestireno e incubados em estufa a 35 °C por 48 horas.

Em seguida, o conteúdo foi removido e lavado 3 vezes com PBS e após isso, foram adicionadas diluições das drogas citadas acima, seguindo o valor dos CIMs para cada um dos microrganismos. Decorrido 24 horas, o conteúdo foi removido e lavado 3 vezes com PBS, subsequentemente foi testado com MTT sua viabilidade celular.

O MTT foi adicionado 150  $\mu$ l em cada poço e deixados na estufa por 2 h a 35 °C. Após esse tempo, MTT foi retirada e foram colocados 100  $\mu$ l DMSO para dissolver o sal de formazan. Posteriormente, 100  $\mu$ l DMSO foi transferido para uma nova placa de 96 poços e foi realizada a leitura em um leitor de placas a 570 nm.

Os resultados obtidos foram analisados a partir da média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes.

Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguidos pelos testes de Tukey ( $p < 0,05$ ) realizados pelo programa GraphPad Prism® 6.0 (GraphPadSoftware, San Diego, CA, USA).

## **5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Essa metodologia foi realizada com a cepa 572 em biofilme maduro com o fármaco diclofenaco sódico sozinho e em sinergismo com a oxacilina. Para isso, foi seguido o protocolo de Branbilla et.al. (2017) com pequenas modificações.

Inicialmente, foi feito um inóculo em caldo TSB que continha cerca de  $1,0 \times 10^8$  células/mL e 1.000  $\mu$ l dessa suspensão foram adicionados em lamínulas de vidro, colocadas posteriormente em uma placa de 12 poços de poliestireno.

Essa placa foi incubada a 35 °C por 48 horas. Em seguida, foi lavada com PBS 3 vezes e colocada em contato com os fármacos citados acima por 24 horas a 35 °C. Após isso, os poços foram lavados novamente com PBS e fixados com glutaraldeído a 2,5% por 24 horas a 4°C.

No dia seguinte, as lamínulas foram 2 vezes lavadas com tampão cacodilato 0,1 M por 10 minutos e, em seguida, desidratadas com concentrações crescentes de álcool cada uma,

passando 10 minutos em contato com a lamínula (30, 50, 70, 80,90, 95, e 100%). Essas amostras foram analisadas no equipamento Quanta 450 FEG - FEI.

### **5.7 Análise estatística**

Todos os ensaios realizados foram feitos em triplicata, em dias diferentes. As médias geométricas foram utilizadas para determinação dos CIMs. Já para os testes em biofilmes, os resultados foram analisados estatisticamente pela ANOVA, sendo considerados significativos  $p \leq 0,05$ , realizados pelo programa GraphPad Prism® 6.0 (GraphPadSoftware, San Diego, CA, USA) e para os ensaios de citometria foi utilizado Mann-Whitney U Test, com significância  $p \leq 0,05$ .

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Atividade antibacteriana do diclofenaco sódico**

#### ***6.1.1 Resultados dos CIMs do diclofenaco sódico sozinho e em sinergismo com a oxacilina frente a cepas de SARM.***

Conforme mostrado na Tabela 2, os CIMs para o diclofenaco sódico variaram de 156,25 µg/mL a 1250 µg/mL. Já para a oxacilina, os CIMs foram de 8 µg/mL à > 64 µg/mL. Além disso, o efeito sinérgico do diclofenaco sódico associado com a oxacilina foi constatado em 12 cepas, ou seja, em 80% delas e, em 3 (20%), o resultado foi indiferente. Não houve nenhum resultado apresentando antagonismo.

Tabela 2 - Efeito do diclofenaco sódico e da oxacilina sozinho e combinado frente a cepas de SARM determinado pelo método da Concentração Inibitória Fracionada (FICI).

Cepas <sup>a</sup>	CIM <sup>b</sup> (µg/ml)					
	Isolado <sup>c</sup>		Combinado <sup>d</sup>			
	DS	OXA	DS	OXA	FICI	Interpretação
SARM 1	156,25	8	78,25	4	1,0	IND
SARM 2	156,25	8	39,06	2	0,5	SIN
SARM 3	156,25	8	39,06	2	0,5	SIN
SARM 4	156,25	16	39,06	4	0,5	SIN
SARM 5	156,25	16	39,06	4	0,5	SIN
SARM 6	156,25	16	78,25	8	1,0	IND
SARM 7	156,25	64	19,53	8	0,25	SIN
SARM 8	156,25	64	78,25	32,0	1,0	IND
SARM 9	156,25	64	39,06	16	0,5	SIN
SARM 10	625	64	78,12	8	0,25	SIN
SARM 11	1250	64	39,06	2	0,06	SIN
SARM 12	312,5	16	39,12	2	0,25	SIN
SARM 13	312,5	8	78,25	1	0,38	SIN
SA ATCC <sub>TM</sub>						
14	1250	2	39,60	0,065	0,06	SIN
SARM ATCC <sub>TM</sub>						
15	1250	16	312,5	4	0,50	SIN

<sup>a</sup> Cepas SARM isoladas da coleção do LABIMAN <sup>b</sup> CIM – Concentração Inibitória Mínima necessária para inibir 100% do crescimento do microrganismo após incubação de 20 horas. <sup>c</sup> A microdiluição em caldo procedeu de acordo com o protocolo M07-A10 do CLSI para drogas isoladas. <sup>d</sup> Combinação do diclofenaco sódico mais oxacilina. SIN- Sinergismo ; IND- indiferente; DS- diclofenaco sódico; OXA- oxacilina.

## 6.2 Análise do mecanismo de ação do diclofenaco sódico e em combinação com a oxacilina frente a células de SARM

### 6.2.1 Redução do número de células de SARM após o tratamento com diclofenaco sódico isolado e associado a oxacilina

As células de SARM foram tratadas com oxacilina (16 µg/mL), diclofenaco sódico (312,5 µg/mL), diclofenaco sódico mais oxacilina (39,06 µg/mL e 2 µg/mL, respectivamente) durante 24 horas. Após esse período, houve uma redução significativa da viabilidade celular ( $p < 0,05$ ) tanto do diclofenaco sódico sozinho como em associação com a oxacilina. Vale ressaltar, que a forma combinada houve uma redução mais acentuada, como mostrado no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Resultado do diclofenaco sódico isolado e combinado com a oxacilina na viabilidade celular de células de SARM.

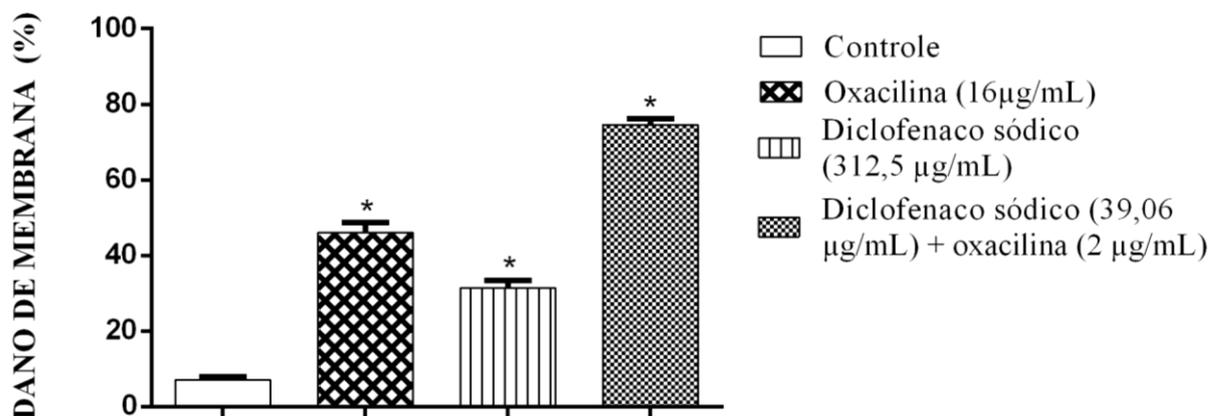


Gráfico 1 - Efeito do diclofenaco sódico no número de células viáveis na cepa representativa de SARM avaliada por citometria de fluxo. O BHI foi utilizado como controle negativo. \*  $p < 0,05$  comparado ao controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

### 6.2.2 Fragmentação do DNA induzida pelo diclofenaco sódico isolado e associado a oxacilina evidenciada pela técnica do TUNEL

A fragmentação do DNA foi observada por meio da técnica do TUNEL, mostrando que as células de SARM que foram submetidas ao tratamento do diclofenaco sódico (312,5 µg/mL) e da associação com a oxacilina (39,06 µg/mL e 2 µg/mL, respectivamente) apresentavam DNA fragmentado, principalmente, na combinação entre as duas drogas. Esse dano ao DNA para o diclofenaco sódico sozinho foi de  $20,5 \pm 2,9\%$ , para oxacilina foi de  $40,3$

$\pm 4,1\%$  e para associação do diclofenaco sódico e oxacilina de  $65,1 \pm 3,0\%$  foram positivos para o TUNEL. O controle apresentou  $4,79 \pm 1,3\%$ , como pode ser observado no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Fragmentação do DNA ocasionado pelo diclofenaco sódico isolado e em associação com oxacilina frente a cepa de SARM evidenciado pela técnica do TUNEL.

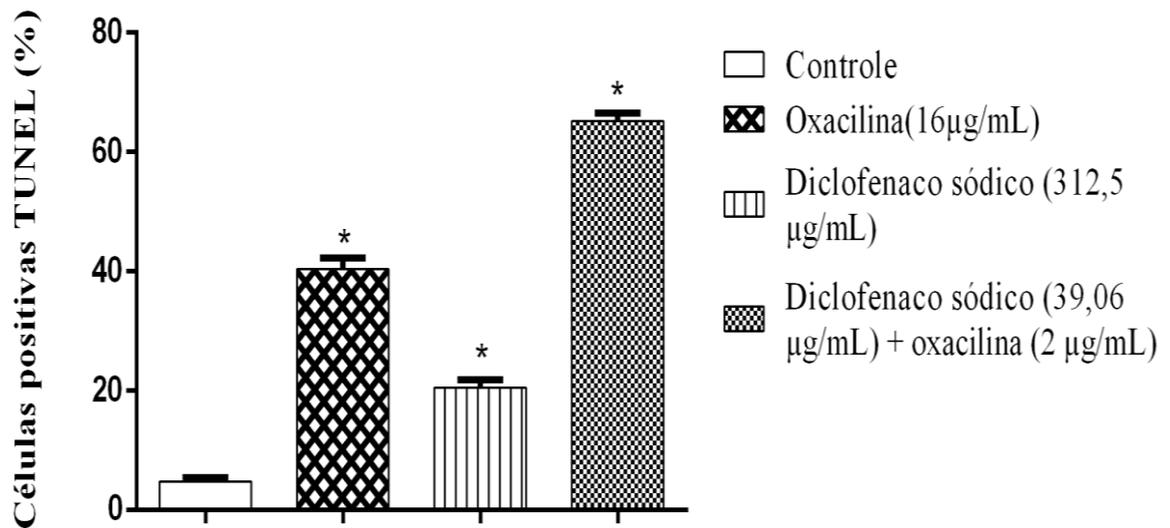


Gráfico 2: Teste TUNEL contra cepa representativa de SARM, mostrando fragmentação de DNA após incubação com diclofenaco de sódio. \*  $p < 0,05$  comparado ao controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

### ***6.2.3 Ruptura do DNA induzida pelo diclofenaco sódico isolado e associado a oxacilina evidenciada pela técnica do Cometa alcalino***

Por meio dessa técnica, é possível avaliar os danos DNA a nível subnuclear. Os resultados demonstraram uma ruptura de DNA mais acentuada na combinação da oxacilina com o diclofenaco sódico ( $39,06 \mu\text{g/mL}$  e  $2 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente) do que nos tratamentos das células de SARM com o diclofenaco sódico ( $312,5 \mu\text{g/mL}$ ) e oxacilina ( $16 \mu\text{g/mL}$ ) isolados. O dano do DNA na associação das drogas foi de  $138 \pm 12,6\%$ , já no diclofenaco sódico e na oxacilina o dano ao DNA foi de  $61 \pm 10,1\%$  e  $33,5 \pm 6,0\%$  respectivamente, como mostrado no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Avaliação do índice de danos ao DNA em cepa de SARM.

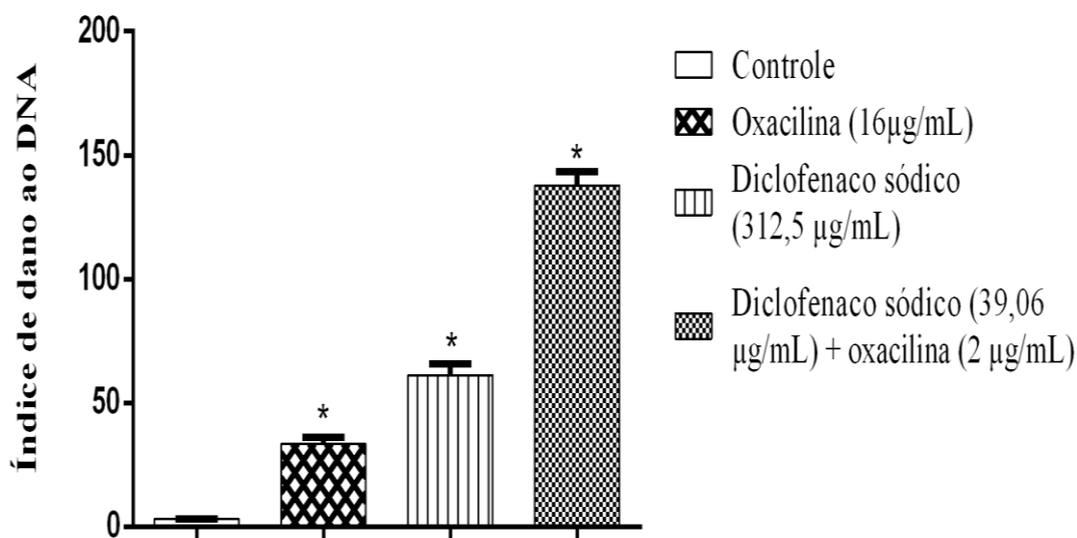


Gráfico 3: As células foram tratadas com oxacilina (CIM = 16 µg / ml), diclofenaco sódico (CIM = 312,5 µg / ml), diclofenaco sódico + oxacilina (CIM = 39,06 + 2,0 µg / mL) e BHI (controle negativo) por 24 horas e a avaliação do índice de danos ao DNA foi realizada por meio da técnica do cometa alcalino \*p <0,05 comparado ao controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman – Keuls.

### 6.3 Análise do diclofenaco sódico isolado e em combinação com a oxacilina frente a biofilme em formação e formado em SARM

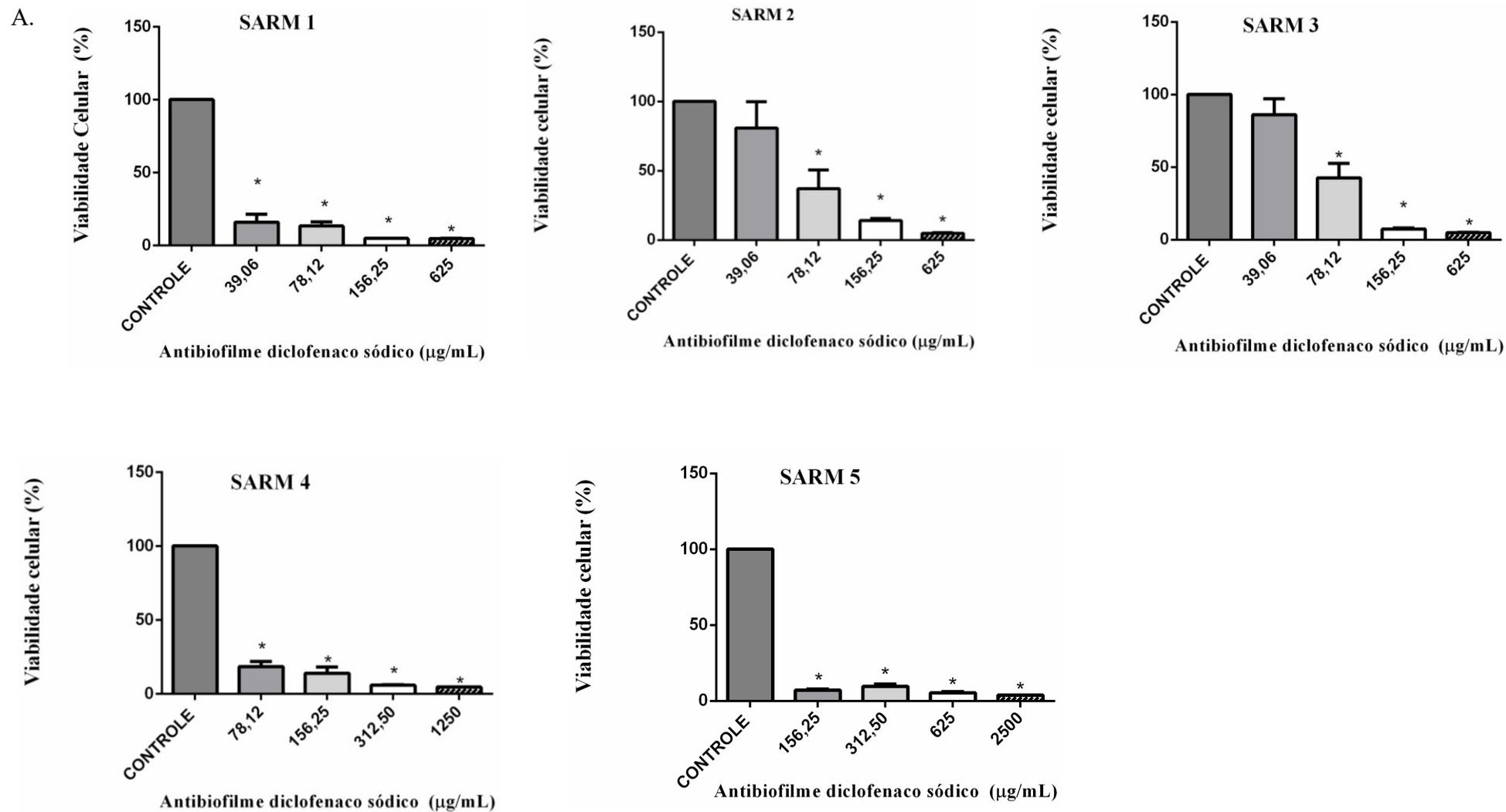
#### 6.3.1 Ação antibiofilme do diclofenaco sódico sozinho e em combinação com a oxacilina

Após a avaliação da biomassa dos biofilmes formados pelas 15 cepas de SARM, 5 delas foram consideradas boas formadoras de biofilme segundo a metodologia de (STEPANOVIĆ et al., 2000) e prosseguiram com os ensaios de ação antibiofilme com o diclofenaco sódico isolado e em associação com a oxacilina. As concentrações adotadas foram de CIM/4, CIM/2, CIM e 4XCIM, tendo como referência o valor do CIM de cada cepa, conforme os resultados mostrados no Gráfico 4.

Nas 5 cepas avaliadas, os valores de CIM/2, CIM e 4XCIM obtiveram significância em relação ao controle para o diclofenaco sódico sozinho, tendo reduções de mais de 50% na inibição de formação dos biofilmes por SARM.

Já para a combinação do diclofenaco sódico mais oxacilina, houve significância em relação ao controle para todas as cepas nos valores de CIM e 4XCIM, com reduções em cerca de 60% na atividade antibiofilme de SARM.

Gráfico 4 - Atividade antibiofilme do diclofenaco sódico (DS) e em associação com a oxacilina (OXA) frente a cepas de SARM.



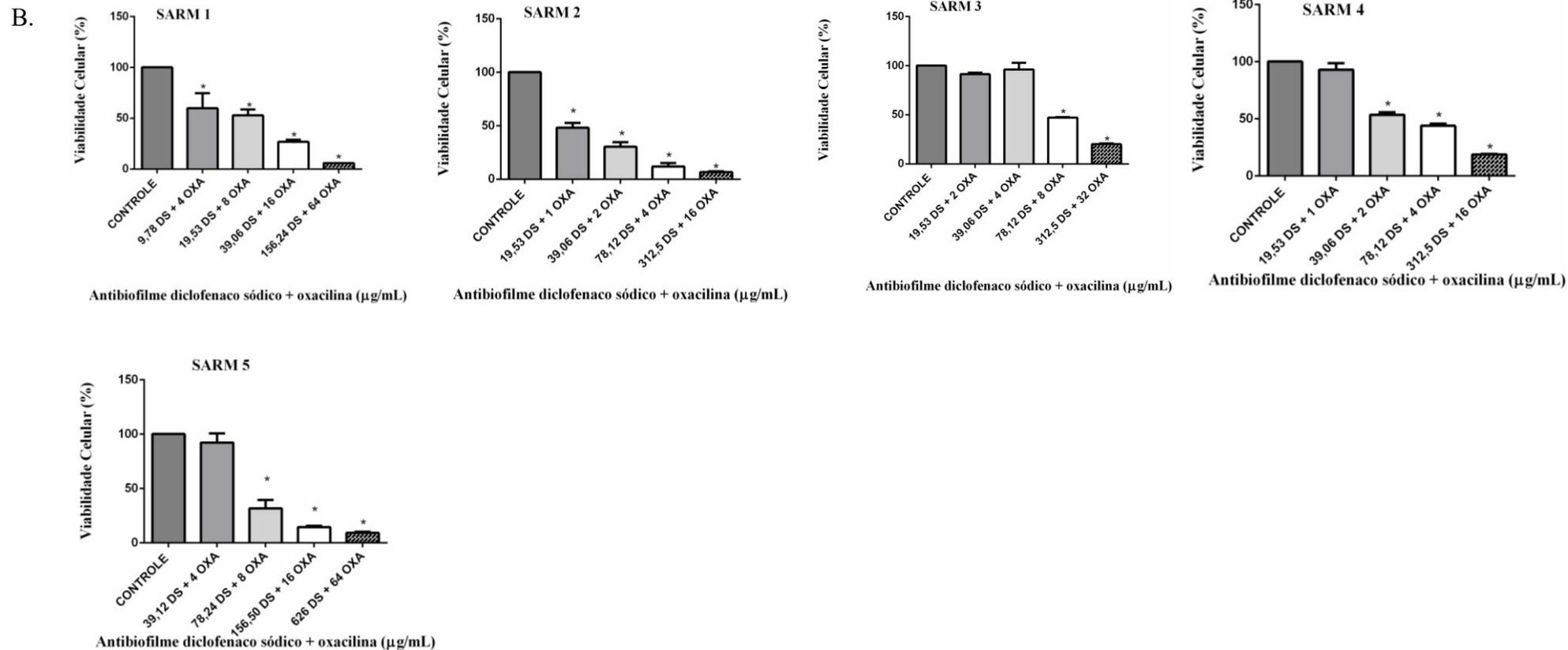


Gráfico 4: A- diclofenaco sódico isolado; BHI- Controle; SARM 1, SARM 2, SARM 3: CIM/ 4 (39,06  $\mu\text{g/mL}$ ); CIM/2 (78,12  $\mu\text{g/mL}$ ); CIM (156,25  $\mu\text{g/mL}$ ); 4XCIM (625  $\mu\text{g/mL}$ ). SARM 4: CIM/4 (78,12  $\mu\text{g/mL}$ ); CIM/2 (156,25  $\mu\text{g/mL}$ ); CIM (312,50  $\mu\text{g/mL}$ ); 4XCIM (1250  $\mu\text{g/mL}$ ). SARM5: CIM/4 (156,25  $\mu\text{g/mL}$ ); CIM/2 (312,50  $\mu\text{g/mL}$ ); CIM (625  $\mu\text{g/mL}$ ); 4XCIM (2500  $\mu\text{g/mL}$ ). B- diclofenaco sódico (DS) mais oxacilina (OXA)- SARM 1: CIM/4 (9,78DS + 4 OXA  $\mu\text{g/mL}$ ); CIM/2 (19,53 DS+ 8 OXA  $\mu\text{g/mL}$ ); CIM (39,06 DS+16 OXA  $\mu\text{g/mL}$ ); 4XCIM (156,24 DS+64 OXA  $\mu\text{g/mL}$ ). SARM 2, SARM 3, SARM 4: CIM/ 4 (19,53 DS + 1 OXA  $\mu\text{g/mL}$ ); CIM/2 (39,06 DS+ 2 OXA  $\mu\text{g/mL}$ ); CIM (78,12 DS + 4 OXA  $\mu\text{g/mL}$ ); 4XCIM (312,5 DS+16 OXA  $\mu\text{g/mL}$ ). SARM 5: CIM/4 (39,12 DS + 4 OXA  $\mu\text{g/mL}$ ); CIM/2 (78,24 DS+ 8 OXA  $\mu\text{g/mL}$ ); CIM (156,50 DS+16 OXA  $\mu\text{g/mL}$ ); 4XCIM (625 DS+64 OXA  $\mu\text{g/mL}$ ).

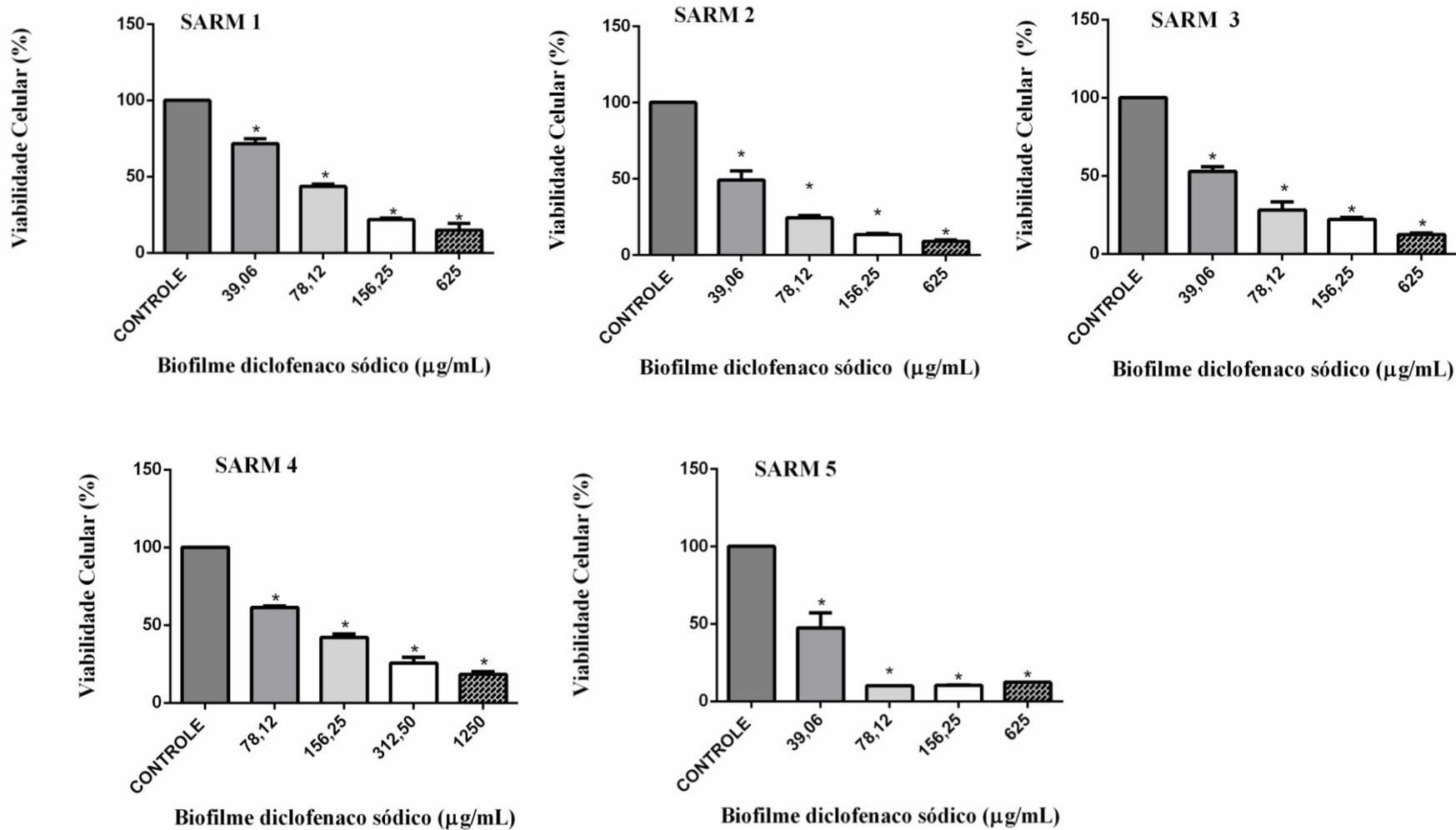
### ***6.3.2 Ação do diclofenaco sódico isolado e em sinergismo com a oxacilina em biofilme formado***

As cinco cepas mencionadas anteriormente foram selecionadas para avaliação de sua atividade frente a biofilme formado com os mesmos fármacos supracitados (diclofenaco sódico e diclofenaco sódico + oxacilina).

Para esta forma de biofilme, todas as cepas de SARM tiveram significância em relação ao controle para o diclofenaco sódico sozinho nas concentrações mais baixas testadas, com redução de cerca de 50% do biofilme em concentrações, variando entre 36,06 e 78,12 µg/mL. Na avaliação do sinergismo, todas as cepas tiveram redução a partir da concentração do CIM, com inibição do biofilme maduro em cerca de 60%, conforme o Gráfico 5.

Gráfico 5 - Atividade em biofilme formado do diclofenaco sódico (DS) isolado e em associação com a oxacilina (OXA) frente as cepas de SARM.

A.



B.

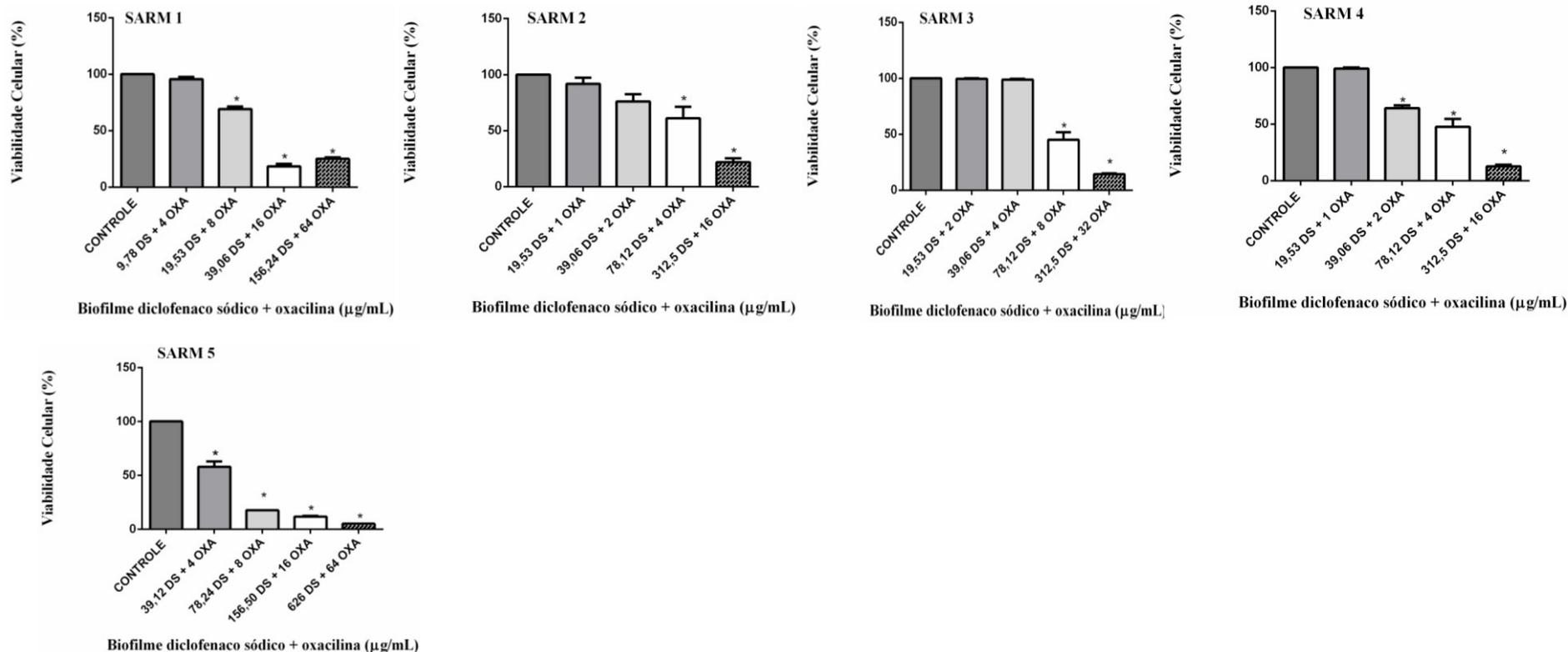


Gráfico 5: A- diclofenaco sódico isolado - BHI- controle; SARM 1, SARM 2, SARM 3, SARM 5: CIM/4 (39,06 µg/mL); CIM/2 (78,12 µg/mL); CIM (156,25 µg/mL); 4XCIM(625 µg/mL). SARM 4: CIM/4 (78,12 µg/mL); CIM/2 (156,25 µg/mL); CIM (312,50 µg/mL); 4XCIM (1250 µg/mL). B- diclofenaco sódico (DS) e oxacilina (OXA) - SARM 1: CIM/4 (9,78DS + 4 OXA µg/mL); CIM/2 (19,53 DS+ 8 OXA µg/mL); CIM (39,06 DS+16 OXA µg/mL); 4XCIM (156,24 DS+64 OXA µg/mL). SARM 2, SARM 4: CIM/4 (19,53 DS + 1 OXA µg/mL); CIM/2 (39,06 DS+ 2 OXA µg/mL); CIM (78,12 DS + 4 OXA µg/mL); 4XCIM (312,5 DS+16 OXA µg/mL). SARM 3: CIM/4 (19,53 DS + 2 OXA µg/mL); CIM/2 (39,06 DS+ 4 OXA µg/mL); CIM (78,12 DS + 8 OXA µg/mL); 4XCIM (312,5 DS+32 OXA µg/mL). SARM 5: CIM/4 (39,12 DS + 4 OXA µg/mL); CIM/2 (78,24 DS+ 8 OXA µg/mL); CIM (156,58 DS + 16 OXA µg/mL); 4XCIM (626 DS+64 OXA µg/mL)

### 6.3.3 Análise de imagens do MEV

As imagens apresentaram um indicativo de redução no número de células de SARM, com o aumento da dose do diclofenaco sódico e do diclofenaco sódico com oxacilina, se comparado com o controle. Em CIMs mais elevados é possível visualizar alterações na morfologia celular onde as células se apresentaram com retração celular e em formas mais alongadas (Figura 4).

Foi possível observar que nas maiores concentrações, tanto de diclofenaco isolado quanto em combinação com a oxacilina, houve redução considerável na quantidade de células presentes, bem como modificações da morfologia celular, levando a crer que as células passaram por um possível processo apoptótico, em decorrência dos fármacos utilizados.

Figura 4 - Microscopia Eletrônica de Varredura, mostrando o crescimento de biofilme de SARM.

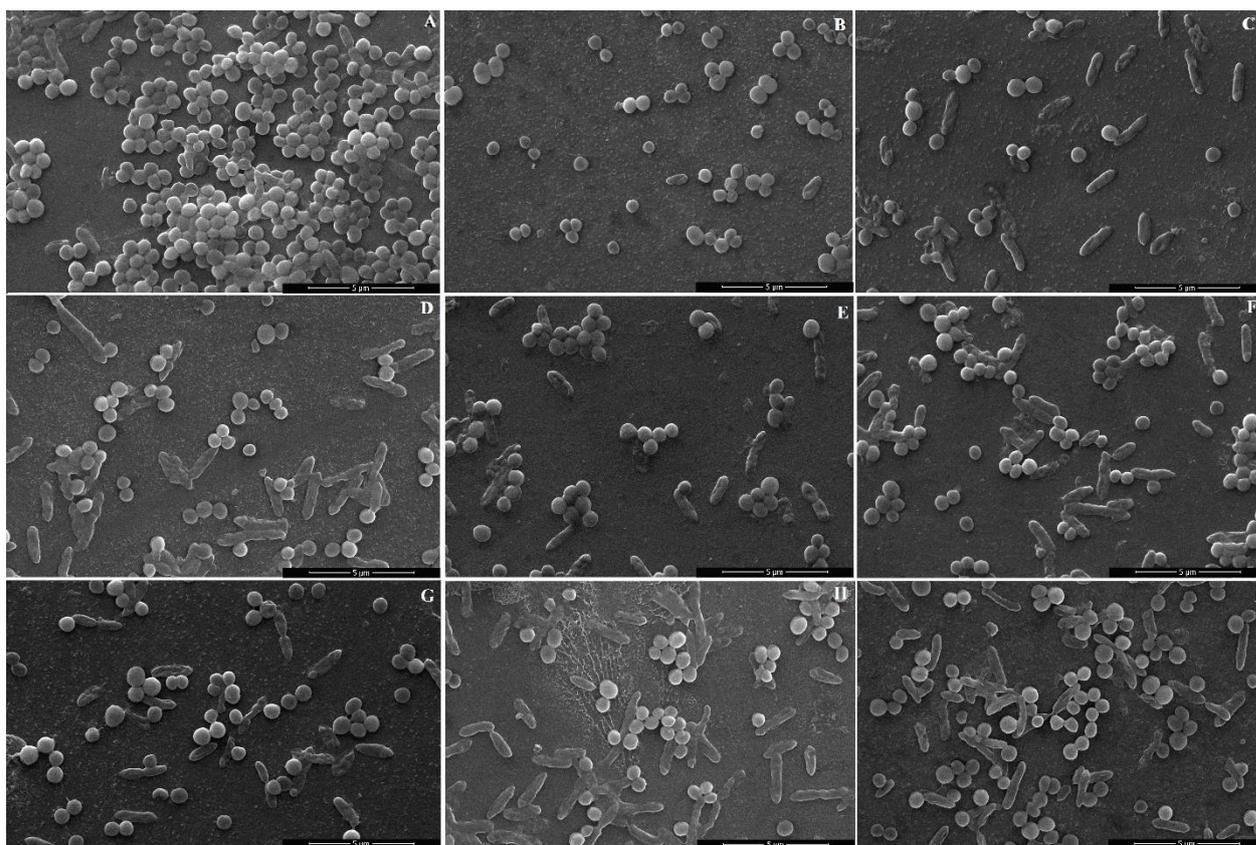


Figura 4. A: controle. B: biofilme tratado com 1250 µg/mL de diclofenaco sódico, C: biofilme tratado com 156.48 µg/mL de diclofenaco sódico e 8µg/mL oxacilina. D: biofilme tratado com 312.5µg/mL de diclofenaco sódico. E: biofilme tratado com 39.12 µg/mL de diclofenaco sódico e 2µg/mL oxacilina. F: biofilme tratado com 156.25µg/mL de diclofenaco sódico. G: biofilme

tratado com 19.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de diclofenaco sódico e 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxacilina. H: biofilme tratado com 78.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de diclofenaco sódico. I: biofilme tratado com 9.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de diclofenaco sódico e 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxacilina. Magnificence: 20000x. Bar:5  $\mu\text{m}$ .

## 7. DISCUSSÃO

SARM causa cerca de 60-70% de infecções ocasionadas por *Staphylococcus aureus* em hospitais, desenvolvendo resistência a praticamente todos os antibióticos utilizados atualmente em seu tratamento, tornando-se um grande problema clínico e urgente a nível mundial (BENDER; KRISTIANSEN, 1999; SALEM-MILANI et al., 2013).

Atualmente, existe pouco investimento da indústria farmacêutica para o descobrimento de novos fármacos antimicrobianos, devido ao baixo retorno financeiro que esses medicamentos trazem (WORTHINGTON; MELANDER, 2012).

Nesse contexto, surge a possibilidade de realizar o reaproveitamento de fármacos já existentes no mercado, atribuindo funções farmacológicas diferentes de seu uso habitual. Com isso, há cerca de 40% da diminuição dos custos, visto que há uma redução considerável nos gastos obtidos através dos estudos farmacológicos e toxicológicos (DIMASI; HANSEN; GRABOWSKI, 2003).

O diclofenaco sódico é comumente utilizado como um AINE, exibindo propriedades anti-inflamatória, antipirética e analgésica (MCCORMACK; SCOTT, 2008). No entanto, no presente estudo, averiguamos sua atividade antibacteriana de maneira isolada e em sinergismo com a oxacilina frente às cepas de SARM. Em sua forma isolada, seu CIM variou entre 156,25 e 1250 µg/mL. A atividade antibacteriana de alguns AINEs como ibuprofeno, diclofenaco sódico, acetaminofeno e aspirina já foi demonstrada perante alguns microrganismos (BENDER; KRISTIANSEN, 1999; HUSSEIN; AL-JANABI, 2010; LAUDY, 2018; S. SAMPAIO et al., 2018). Em relação ao diclofenaco sódico, sua atividade antibacteriana já foi vista frente a *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (PADMA; YALAVARTHY, 2015; WORTHINGTON; MELANDER, 2012).

Salem-Milani et al., (2013) mostrou a atividade antibacteriana do diclofenaco sódico e do ibuprofeno frente a *Enterococcus faecalis* na concentração de 50 µg/mL em ambos os medicamentos. Em outro estudo, realizado por Dutta et al., (2004) mostrou a atividade do diclofenaco sódico frente a 45 cepas *Mycobacterium* spp. em CIM variando entre 10- 25 µg/mL. Além disso, Mazumdar et al., (2009) a atividade do diclofenaco sódico variando o CIM de 50- 100 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus* spp. Nesse mesmo estudo, o diclofenaco sódico é apontado como um agente promissor para a criação de novos e mais eficazes agentes

antibacterianos, onde, por meio de sua molécula, será possível obter substâncias mais ativas contra infecções (MAZUMDAR et al., 2009).

Apesar de nossa concentração na forma isolada do diclofenaco ter sido um pouco mais elevada em comparação aos estudos acima relatados, Chan et al., (2017) encontrou CIM semelhantes aos nossos para SARM, com concentrações variando entre 312,5 e 2500 µg/mL. Haja vista que, em tratamentos descritos em sua bula, o diclofenaco sódico pode chegar a dose diária de 150 mg, ele ainda pode ser considerado um fármaco seguro e eficiente para o tratamento de infecções. Além disso, em sua forma farmacêutica de gel para uso tópico, essa concentração ainda é bem superior, sendo de 10 mg/g (MOHSEN et al., 2015; RESLINSKI; DABROWIECKI; GLOWACKAD, 2015).

Outro importante achado do nosso estudo foi o sinergismo do diclofenaco sódico com a oxacilina, onde sua associação pode reduzir entre 4 e 32 vezes a concentração dos fármacos se compararmos com suas concentrações utilizadas de maneira isolada. Essa associação foi pouco estudada na literatura, apenas estudos semelhantes como o realizado por Altaf et al., (2019) que mostrou a associação do diclofenaco sódico e do meloxicam associado a oxitetraciclina e gentamicina em tratamento de mastites caprinas ocasionadas por SARM com resultados satisfatórios, demonstrando que os AINEs podem ser adjuvantes no tratamento.

Em outro estudo realizado por Annadurai et al., 2002 demonstrou a associação sinérgica entre o diclofenaco sódico e a estreptomicina frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pumilus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* e *Vibrio cholerae*.

Vale ressaltar que, em nosso estudo, também foi encontrado ação antibiofilme e em biofilme maduro de SARM, tanto do diclofenaco sódico sozinho, como em associação como a oxacilina, mostrando o potencial desses medicamentos, tendo em vista que, nessa forma de biofilme, o microrganismo pode exibir de dez a mil vezes mais resistência aos antibióticos se comparado com as bactérias plactônicas. (OYAMA et al., 2016)

Em um estudo semelhante ao nosso, realizado por Mohsen et al., (2015), foi mostrada a atividade antibiofilme dos AINES (cetoprofeno, ibuprofeno e diclofenaco sódico) e seu sinergismo com N-acetilcistéina (NAC) frente a *S.aureus*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, além da atividade desses fármacos frente a biofilme maduro no qual o diclofenaco sódico teve maior potencial em relação aos outros medicamentos, com exceção apenas da *K. pneumoniae*.

Reslinski; Dabrowiecki; Glowacka, (2015) mostrou a atividade antibiofilme do diclofenaco sódico e do ibuprofeno frente a 70 cepas de *S. aureus* e 70 de *E. coli*, obtidas de

pacientes internados que iriam ser submetidos a cirurgia de hérnia com uso de material implantado, mostrando uma redução da contagem de unidade formadora de colônias (UFC) de  $42 \times 10^5$  UFC ml<sup>-1</sup> para  $10 \times 10^5$  UFC ml<sup>-1</sup> com o uso do diclofenaco sódico e para  $9,6 \times 10^5$  UFC ml<sup>-1</sup> com a utilização do ibuprofeno frente a *S.aureus*; bem como de  $21,8 \times 10^5$  para  $7,9 \times 10^5$  (diclofenaco) e para  $7,4 \times 10^5$  (ibuprofeno) frente a *E.coli*, mostrando que esses fármacos podem ser utilizados no pré-operatório, pois aumentam a eficácia dos antibióticos aplicados para fins profiláticos.

She et al., (2019) mostrou a atividade antibiofilme e em biofilme maduro da auranofina (anti-reumático) de maneira isolada e sinérgica com a linezolida frente a *S. aureus* e SARM, diminuindo a concentração mínima de erradicação do biofilme (MBEC50) 2 e >8 para auranofina e linezolida, respectivamente. No nosso estudo, a redução do diclofenaco sódico em MBEC50 para o sinergismo foi semelhante, diminuindo a concentração inicial de 2 a 8 vezes em relação a concentração inicial do diclofenaco.

Em outro estudo apresentado por Oh et al., (2018) também houve ação antibiofilme de SARM de um antioxidante aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e a bacitracina, um antibiótico comumente utilizado em pomadas, onde em sinergia a concentração de bacitracina caiu de  $10^{-1}$  U/mL para  $10^{-3}$  U/mL com a utilização de 2 µg/mL do antioxidante. Esses estudos corroboram que o reposicionamento de fármaco juntamente com a associação de antibióticos consiste em uma interessante alternativa para combater o crescimento de resistência dos microrganismos.

Além disso, no nosso estudo também foi analisado o possível mecanismo de ação desses fármacos, já que na literatura os mecanismos que levam os AINES, bem como o diclofenaco sódico, a agirem frente aos microrganismos não estão bem elucidados (PRESTON et al., 1987; MOHSEN et al., 2015).

No presente estudo foi mostrado que as células de SARM expostas ao diclofenaco sódico, principalmente, quando associado com a oxacilina, aumentavam a absorção do iodo de propídio, mostrando que esses fármacos promovem danos significativos à membrana celular da bactéria (PINKERTON et al., 2015; COLLINS et al., 2004). Estudos apontam que danos na membrana plasmática formam poros que promovem falhas na permeabilidade de íons, afetando o potencial eletroquímico da célula que não se mantém em equilíbrio osmótico, levando à morte celular (ANDRADE NETO et al., 2020).

Oliveira et al., (2019) em um estudo que corroborou ao nosso mostrou que o ibuprofeno aumentava significativamente a permeabilidade de células de *S. aureus* com

aumento de cerca de 98% da captação do iodeto de propídio (IP), além de mudanças significativas na liberação intracelular de potássio, propondo claramente a desestabilização e ruptura da membrana citoplasmática bacteriana. Pina- Vaz et al., (2000) também mostrou que o ibuprofeno nas concentrações de 10 a 20 mg/mL também promove danos na membrana plasmática de *Candida albicans*.

Nesse estudo, também foi visto por meio do ensaio do TUNEL e do cometa alcalino que o tratamento das células de SARM, principalmente com a combinação sinérgica da oxacilina com o diclofenaco sódico, ocasionava fragmentação do DNA e condensação nuclear (ANDRADE NETO et al., 2020). Em cultura de células de colesteotoma, o estudo também mostrou que o diclofenaco sódico induz a apoptose celular (KARA et al., 2019). Outro estudo mostrou que esse mesmo fármaco induz a morte celular programada de hepatócitos, ativando a via mitocondrial de apoptose, por meio da caspases 3, 8 e 9 que abrem um poro mitocondrial, e a fragmentação do DNA (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2003)

Algumas pesquisas relatam que o diclofenaco é capaz de interferir na biossíntese do DNA por meio da incorporação da desoxitimidina, o que corrobora nossos resultados, já que é possível constatar por meios dos nossos testes a fragmentação e a ruptura do DNA bacteriano (DASTIDAR et al., 2000). Padma; Yalavarthy, (2015) mostrou que o diclofenaco modifica mecanismos intrínsecos de fenotípicos de resistência antimicrobiana em *S. aureus*, tornando-os mais sensíveis a alguns antimicrobianos usados na clínica.

Nossos resultados mostram que o possível mecanismo de ação do sinergismo se dá por meio da indução de processos apoptóticos nas células de SARM, bem como através da alteração na permeabilidade celular.

## 8. CONCLUSÃO

A resistência antimicrobiana é apontada em vários estudos como um grande problema na atualidade, portanto o reposicionamento de fármacos é uma excelente alternativa que surge como alternativa terapêutica.

Nesse contexto, nossos resultados mostraram que o diclofenaco sódico juntamente com a oxacilina consiste em um possível adjuvante futuro contra células planctônicas e em forma de biofilme de SARM, já que ele promove alterações na membrana plasmática e atua sobre o DNA bacteriano, ocasionando prováveis danos que levam as células bacterianas a apoptose.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, H. A. Inhibition of Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* By Diclofenac Sodium. **Roumanian archives of microbiology and immunology**, v. 74, n. 3–4, p. 79–85, 2015.

ALTAF, M. et al. Antibiotic susceptibility profile and synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on antibacterial activity of resistant antibiotics (Oxytetracycline and Gentamicin) against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Microbial Pathogenesis**, v. 137, p. 103755, 2019.

ALVAREZ, C.; LABARCA, J.; SALLES, M. Prevention strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. SUPPL. 2, 2010.

ANDRADE-NETO, V. V. et al. Leishmaniasis treatment: Update of possibilities for drug repurposing. **Frontiers in Bioscience - Landmark**, v. 23, n. 5, p. 967–996, 2018.

ANNADURAI, S. et al. Experimental studies on synergism between aminoglycosides and the antimicrobial antiinflammatory agent diclofenac sodium. **Journal of Chemotherapy**, v. 14, n. 1, p. 47–53, 2002.

ARGUDÍN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. p. 1751–1773, 2010.

AUNG, M. S. et al. Prevalence and genetic characteristics of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus argenteus* isolates harboring panton-valentine leukocidin, enterotoxins, and TSST-1 genes from food handlers in Myanmar. **Toxins**, v. 9, n. 8, p. 1–13, 2017.

BAHMANI, M. et al. The synergistic effect of hydroalcoholic extracts of *Origanum vulgare*, *Hypericum perforatum* and their active components carvacrol and hypericin against *Staphylococcus aureus*. **Future Science OA**, v. 5, n. 3, 2019.

BATISTA, B. G. Novas cefalosporinas como alternativa no tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 5, n. 2, p. 94–99, 2015.

BENDER, A.B.; KRISTIANSEN J.E. Antimicrobial effects of anesthetics and analgesics. **Ugeskr Laeger**, v. 26, n. 4, p. 307–320, 1999.

BATISTA DE ANDRADE NETO, J. et al. A mechanistic approach to the in-vitro resistance modulating effects of fluoxetine against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, n. December 2018, p. 335–340, 2019.

BES, T. M. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in individuals from the community in the city of Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 60, n. September, p. 1–5, 2018.

BROWN, A. F. et al. *Staphylococcus aureus* colonization: Modulation of host immune response and impact on human vaccine design. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. DEC, p. 1–20, 2013.

CAMERON, J. K. et al. Incidence of community onset MRSA in Australia: Least reported where it is Most prevalent. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2019.

CAVALCANTI, S. M. D. M. et al. Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, n. 4, p. 436–446, 2006.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 781–791, 1997.

CHAN, E. W. L. et al. Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, n. 2010, p. 70–

74, 2017.

CHOO, E. J.; CHAMBERS, H. F. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Infection and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 267–273, 2016.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249–261, 2004.

CONLON, B. P. et al. Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 5, 2016.

COOKSON, B. Five decades of MRSA: Controversy and uncertainty continues. **The Lancet**, v. 378, n. 9799, p. 1291–1292, 2011.

COSTA, E. M. et al. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 1081–1086, 2014.

DA SILVA, C. R. et al. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691–1700, 2013.

DASTIDAR, S. G. et al. The anti-bacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 3, p. 249–251, 2000.

DE MOURA, J. P. et al. Resistência à mupirocina entre isolados de *staphylococcus aureus* de profissionais de enfermagem. **ACTA Paulista de Enfermagem**, v. 23, n. 3, p. 399–403, 2010.

DELEO, F. R. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 375, n. 9725, p. 1557–1568, 2010.

DIEKEMA, D J M A PFALLER, F J SCHMITZ, J SMAYEVSKY, J BELL, R N JONES, M.

B. Survey of Infections Due To Staphylococcus Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, Latin America, Europe and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 10, n. 5, p. 294, 2001.

DIMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: New estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**, v. 22, n. 2, p. 151–185, 2003.

DUTTA, N. K. et al. In vitro and in vivo antimycobacterial activity of antiinflammatory drug, diclofenac sodium. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, n. 9, p. 922–927, 2004.

DUTTA, N. K. et al. Potential management of resistant microbial infections with a novel non-antibiotic: the anti-inflammatory drug diclofenac sodium. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 3, p. 242–249, 2007.

DWYER, D. J. et al. Antibiotic-Induced Bacterial Cell Death Exhibits Physiological and Biochemical Hallmarks of Apoptosis. **Molecular Cell**, v. 46, n. 5, p. 561–572, 2012.

ENRIGHT, M. . Tackling Chinese upgrading through experimentalism and pragmatism: The case of China's wind turbine industry. **Journal of Current Chinese Affairs**, v. 99, n. 11, p. 7687–7692, 2002.

EUN KYUNG JUNG, Y. S. L. Synergistic Effect between Baicalein and Antibiotics against Clinic Methicillin and Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus. **Chemotherapy: Open Access**, v. 04, n. 01, p. 1–11, 2014.

EVANGELISTA, S. DE S.; DE OLIVEIRA, A. C. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a global problem. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 68, n. 1, p. 136–143, 2015.

FARRELL, D. J. et al. In vitro activity of ceftaroline against multidrug-resistant staphylococcus aureus and streptococcus pneumoniae: A review of published studies and the AWARE

surveillance program (2008-2010). **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. SUPPL. 3, p. 206–214, 2012.

FERREIRA, N. DO C. Caracterização da Resistência à Mupirocina em *Staphylococcus haemolyticus* de Origem Nosocomial. **Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2010.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

FLUIT, A. C. et al. Epidemiology and Susceptibility of 3 , 051 *Staphylococcus aureus* Isolates from 25 University Hospitals Participating in the European SENTRY Study. v. 39, n. 10, p. 3727–3732, 2001.

FORTES, C. Q. et al. First Reported Case of Infective Endocarditis Caused by Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Not Associated With Healthcare Contact in Brazil. v. 12, p. 2007–2009, 2008.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Bacteria Isolated in Brazilian Hospitals Participating in the SENTRY Program ( 2005-2008 ). v. 13, p. 90–98, 2009.

GALLIANA. Infección por *Staphylococcus aureus* metilino resistente adquirido en la comunidad. v. 74, n. 1, p. 26–29, 2003.

GAN, T. J. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. **Curr Med Res Opin**. v. 26, n. 7, p. 1715–1731, 2010.

GELATTI, L. C.; BECKER, A. P. *Staphylococcus aureus*. v. 84, n. 5, p. 501–506, 2009.

GELLER, M. et al. Utilização do diclofenaco na prática clínica: revisão das evidências terapêuticas e ações farmacológicas. **Revista Brasileira De Clinica Médica**, v. 10, n. 1, p. 29–38, 2012.

GÓMEZ-LECHÓN, M. J. et al. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 11, p. 2155–2167, 2003.

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. v. 10032, n. Suppl 5, 2008.

GORWITZ, R. J. et al. Changes in the Prevalence of Nasal Colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004 . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 9, p. 1226–1234, 2008a.

GORWITZ, R. J. et al. Changes in the Prevalence of Nasal Colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States , 2001 – 2004. v. 197, p. 2001–2004, 2008b.

GREER, N. D. Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylycine class of antibiotics. v. 75246, p. 155–161, [s.d.].

HADDAD, O. et al. Comparative study of virulence factors among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 4–11, 2018.

HAMILTON, F.; MACGOWAN, A. ANTIMICROBIAL RESISTANCE A long history of  $\beta$  - lactams for MRSA. **Nature Microbiology**, v. 4, n. October, p. 1604–1605, 2019.

HASSOUN, A.; LINDEN, P. K.; FRIEDMAN, B. Incidence , prevalence , and management of MRSA bacteremia across patient populations — a review of recent developments in MRSA management and treatment. p. 1–10, 2017.

HUSEBY, M. et al. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8719–8726, 2007.

HUSSEIN, A.; AL-JANABI, S. In Vitro antibacterial activity of ibuprofen and acetaminophen . **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 105, 2010.

HUSSEIN, N.; SALIH, R. S.; RASHEED, N. A. Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Hospitals and Community in Duhok , Kurdistan Region of Iraq. v. 6, n. 2, p. 10–13, 2019.

JOSINO, M. A. A. et al. Development and in vitro evaluation of microparticles of fluoxetine in galactomannan against biofilms of *S. aureus* methicilin resistant. **Carbohydrate Polymers**, v. 252, n. October 2020, 2021.

KARA, A. et al. Evaluation of the effect of diclofenac sodium and 5-fluourasil in a 3D cholesteatoma cell culture model. **Otology and Neurotology**, v. 40, n. 8, p. 1018–1025, 2019.

KÉROUANTON, A. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 369–375, 2007.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. crossm. v. 31, n. 4, p. 1–103, 2018.

LAUDY, A. E. Non-antibiotics, efflux pumps and drug resistance of gram-negative rods. **Polish Journal of Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 129–135, 2018.

LENCASTRE; OLIVEIRA; TOMASZ. NIH Public Access. v. 10, n. 5, p. 428–435, 2007.

LÉONE, M.; AYEM, M. L.; MARTIN, C. Revue générale Les glycopeptides. p. 177–187, 2000.

LESSA, F. C. et al. Comparison of Incidence of Bloodstream Infection with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* between England and United. v. 51, p. 925–928, 2010.

LI, Y. Y.; JONES, S. J. M. Drug repositioning for personalized medicine. 2012.

LIMA, J. S.; REZA, D. D. LA. Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas. p. 225–233, 2003.

LIU, C. et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin- Resistant Staphylococcus aureus Infections in Adults and Children. v. 52, 2011.

LIU, C. et al. Molecular characteristics and virulence factors in methicillin-susceptible, resistant, and heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus from central-southern China. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, n. 5, p. 490–496, 2015.

LOUREIRO, M. M. et al. Molecular Epidemiology of Methicillin Resistant S taphylococcus aureus Isolated from Newborns in a Hospital in Rio de Janeiro , Brazil. v. 95, n. 6, p. 777–782, 2000.

LOWY, F. D. Staphylococcus aureus Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520–532, 20 ago. 1998.

LUNA, C. M. et al. Treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Latin America. [s.d.].

LUO, K. et al. Molecular characteristics of antimicrobial resistance and virulence determinants of Staphylococcus aureus isolates derived from clinical infection and food. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 32, n. 7, p. 2–9, 2018.

MARIA, I. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Repurposing ibuprofen to control Staphylococcus aureus bio fi lms. v. 166, p. 197–205, 2019.

MARUSINA, K. et al. partnership model for drug repositioning. p. 1–13, 2012.

MAZIGI, O. et al. Protein A superantigen: Structure, engineering and molecular basis of antibody recognition. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 32, n. 8, p. 359–366, 2019.

MAZUMDAR, K. et al. The anti-inflammatory non-antibiotic helper compound diclofenac : an

antibacterial drug target. p. 881–891, 2009.

MCCORMACK, P. L.; SCOTT, L. J. Diclofenac Sodium Injection ( Dyloject ® ) In Postoperative Pain. v. 68, n. 1, p. 123–130, 2008.

MEÍJA; ZURITA; GUZMÁN; BLANCO. resistente à meticilina na América Latina. p. 79–86, [s.d.].

MILOSHEV, G.; MIHAYLOV, I.; ANACHKOVA, B. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 513, n. 1–2, p. 69–74, 2001.

MOHSEN, A. et al. Antibacterial , Anti-biofilm Activity of Some Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs and N-acetyl Cysteine against Some Biofilm Producing Uropathogens. v. 3, n. 1, p. 1–9, 2015.

MOREIRA, M. et al. Efeito da infecção hospitalar da corrente sanguínea por Staphylococcus aureus resistente à oxacilina sobre a letalidade e o tempo de hospitalização. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 263–268, 1998.

NETO, B. D. A.; BARROSO, D.; S, I. DE. Synergistic effects of ketamine and azole derivatives on Candida spp . resistance to fluconazole. v. 15, p. 177–188, 2020.

NETO, J. B. A. et al. Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds in vitro against fluconazole-resistant strains of different Candida species: A special emphasis on mechanisms of action on Candida tropicalis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014.

NETO, J. B. A. et al. Original Research Article Screening of Antimicrobial Metabolite Yeast Isolates Derived Biome Ceará against Pathogenic Bacteria , Including MRSA : Antibacterial Activity and mode of Action Evaluated by Flow Cytometry. v. 4, n. 5, p. 459–472, 2015.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1–1, 2003.

OH, E. et al. Antioxidant-based synergistic eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms with bacitracin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 1, p. 96–99, 2018.

ORTEGA, E. et al. Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 2117–2131, 2010.

OYAMA, T. et al. BiofiOyama, T., Miyazaki, M., Yoshimura, M., Takata, T., Ohjimi, H., & Jimi, S. (2016). Biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* survive in kupffer cells and exhibit high virulence in mice. *Toxins*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/toxins80>. **Toxins**, v. 8, n. 7, 2016.

PADMA, R.; YALAVARTHY, P. D. Screening of Diclofenac for Antibacterial activity against Pathogenic Microorganisms. **International Journal Of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 554–558, 2015.

PETTI, C. A.; FOWLER, V. G. *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis. **Cardiology clinics**, v. 21, n. 2, p. 219–233, 2003.

PINKERTON, D. M. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of synthetically derived tambjamines C and E-J, BE-18591, and a related alkaloid from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, n. 5, p. 1311–1324, 2010.

RAYGADA, J. L.; LEVINE, D. P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A growing risk in the hospital and in the community. **American Health and Drug Benefits**, v. 2, n. 2, p. 86–95, 2009.

REAUME, A. G. Drug repurposing through nonhypothesis driven phenotypic screening. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 8, n. 3–4, p. 85–88, 2011.

REŚLIŃSKI, A.; DĄBROWIECKI, S.; GŁOWACKA, K. The impact of diclofenac and ibuprofen on biofilm formation on the surface of polypropylene mesh. **Hernia**, v. 19, n. 2, p. 179–185, 2015.

REYNOLDS, P. E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 943–950, 1989.

RIBEIRO, A. et al. First Report of Infection with *Staphylococcus aureus* in South America. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1985–1988, 2005.

RIGI, G.; GHAEDMOHAMMADI, S.; AHMADIAN, G. A comprehensive review on staphylococcal protein A (SpA): Its production and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 66, n. 3, p. 454–464, 2019.

ROCH, M. et al. Thermosensitive PBP2a requires extracellular folding factors PrsA and HtrA1 for *Staphylococcus aureus* MRSA  $\beta$ -lactam resistance. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2019.

ROGERS, C. et al. Duration of colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an acute care facility: A study to assess epidemiologic features. **American Journal of Infection Control**, v. 42, n. 3, p. 249–253, 2014.

S. SAMPAIO, L. et al. Ibuprofen Antifungal Activity on Both Planktonic and Biofilm Forms of Fluconazole-Resistant *Candida* spp. Strains and its Mechanism of Action Evaluated by Flow Cytometry. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 03, p. 2063–2073, 2018.

SAID, K. B. et al. Molecular characterization and susceptibility screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* reveals the dominant clones in a tertiary care hospital in Al Qassim, Saudi Arabia. **International journal of health sciences**, v. 14, n. 1, p. 9–19, [s.d.].

SALEM-MILANI, A. et al. Antibacterial Effect of Diclofenac Sodium on *Enterococcus faecalis*. v. 10, n. 1, p. 16–22, 2013.

SALGADO-PABÓN, W. et al. *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -toxin production is common in strains

with the  $\beta$ -toxin gene inactivated by bacteriophage. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 5, p. 784–792, 2014.

SANTOS, A. L. DOS et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar Staphylococcus aureus: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007.

SANTOS, H. B. DOS. Tese De Doutorado Colonização Por Staphylococcus Aureus Meticilina-Resistente (Mrsa) E Seus Fatores Associados, Em Pacientes Clínicos Admitidos No Hospital De Clínicas De Porto Alegre. p. 1–158, 2009.

SHE, P. et al. Synergistic microbicidal effect of auranofin and antibiotics against planktonic and biofilm-encased *S. aureus* and *E. faecalis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. OCT, p. 1–12, 2019.

SHI, L. et al. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. **Cytometry Part A**, v. 71, n. 8, p. 592–598, 2007.

SHIM, J. S.; LIU, J. O. Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 7, p. 654–663, 2014.

SHITTU, A. O.; UDO, E. E.; LIN, J. Phenotypic and molecular characterization of Staphylococcus aureus isolates expressing low- and high-level mupirocin resistance in Nigeria and South Africa. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, p. 10, 2009.

SHIVAEI, A. et al. Does biofilm formation have different pathways in Staphylococcus aureus? **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 10, p. 1147–1152, 2019.

SHOKRI, R.; SALOUTI, M.; ZANJANI, R. S. Anti protein A antibody-gold nanorods conjugate: a targeting agent for selective killing of methicillin resistant Staphylococcus aureus using photothermal therapy method. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 116–121, 2015.

SHUKLA, S. K. et al. Virulence genes and genotypic associations in nasal carriage,

community-associated methicillin-susceptible and methicillin-resistant USA400 *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3582–3592, 2010.

SILES, S. A. et al. High-throughput screening of a collection of known pharmacologically active small compounds for identification of *Candida albicans* biofilm inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3681–3687, 2013.

SILVA, F. et al. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: Its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 1479–1486, 2011.

SIT, P. S. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection and the molecular characteristics of MRSA bacteraemia over a two-year period in a tertiary teaching hospital in Malaysia. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2017.

STEFANI, S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Global epidemiology and harmonisation of typing methods. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 4, p. 273–282, 2012.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

STRYJEWSKI, M. E.; COREY, G. R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An evolving pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. SUPPL. 1, p. 10–19, 2014.

PINA-VAZ, C. et al. Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against *Candida* species. **J Med Microbiol.**, v. 49, n. 9, p. 831–840, 2000.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.

UMARU, T. et al. Antimicrobial activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs with respect to immunological response: Diclofenac sodium as a case study. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 25, p. 7332–7339, 2009.

VAN BAMBEKE, F. et al. Glycopeptide antibiotics: From conventional molecules to new derivatives. **Drugs**, v. 64, n. 9, p. 913–936, 2004.

WERTHEIM, H. F. L. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 751–762, 2005.

WORTHINGTON, R. J.; MELANDER, C. Combination Approaches to Combat Multi-Drug Resistant Bacteria The problem of multi drug-resistant bacteria. **Trends Biotechnol.**, v. 31, n. 3, p. 177–184, 2012.

WORTHINGTON, R. J.; MELANDER, C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 177–184, 2013.

ZENG, D. et al. Approved glycopeptide antibacterial drugs: Mechanism of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 12, 2016.

