



**UFC<sup>o</sup>**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**THIAGO MESQUITA CÂNDIDO**

**AÇÃO ANTIBACTERIANA DA PROPAFENONA: ATIVIDADE ANTIBIOFILME E  
SINERGISMO COM OXACILINA CONTRA *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À  
METICILINA**

**FORTALEZA**

**2022**

THIAGO MESQUITA CÂNDIDO

AÇÃO ANTIBACTERIANA DA PROPAFENONA: ATIVIDADE ANTIBIOFILME E  
SINERGISMO COM OXACILINA CONTRA *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À  
METICILINA

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. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientador: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.  
Coorientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Junior.

FORTALEZA

2022

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)

---

- C223a Cândia, Thiago Mesquita.  
Ação antibacteriana da propafenona: Atividade antibiofilme e sinergismo com oxacilina contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilina / Thiago Mesquita Cândia. – 2022.  
86 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.  
Coorientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.
1. Reposicionamento de fármacos. 2. Propafenona. 3. MRSA. 4. Resistência Antimicrobiana. I. Título.  
CDD 616.9
-

THIAGO MESQUITA CÂNDIDO

AÇÃO ANTIBACTERIANA DA PROPAFENONA: ATIVIDADE ANTIBIOFILME E  
SINERGISMO COM OXACILINA CONTRA *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À  
METICILINA

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. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Aprovado em: 11/03/2022

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira  
Universidade Regional do Cariri (URCA)

---

Prof. Dr. Emmanuel Silva Marinho  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe, por ser a pessoa forte que é, por sua dedicação incondicional a mim.

*In memoriam* do meu pai, que não pode estar aqui, mas ficaria feliz por essa conquista.

A Beatriz Dias, que sempre contribuiu em muitos momentos da minha vida. Obrigado por dedicar seu amor, companheirismo, tempo e por todos os sacrifícios em meu nome.

A minha orientadora Profa. Dra. Cecília Rocha que sempre esteve disponível e procurou trilhar o melhor caminho para mim. Agradeço o convite para ser seu orientando, por seus ensinamentos e valiosos conselhos ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Hélio Vitoriano por sua cordialidade e pela oportunidade no LABIMAN.

A Profa. Dra. Livia Gurgel do Amaral que esteve de perto em todas as etapas deste projeto e por todo o apoio e compreensão dedicados a mim.

Ao Prof. Dr. João Batista por contribuir no meu amadurecimento enquanto mestrando.

A Prof. Dra. Rosana Campos, pelo voto de confiança na indicação do meu nome ao laboratório.

A Lisandra Silva e a Letícia Serpa, por seus valorosos conselhos e experiências passadas a mim.

Ao Daniel Sampaio por sua amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório.

A Amanda Barbosa, por todos os desabafos e conversas profundas.

A Amanda Leitão por me tirar um sorriso até nos momentos mais difíceis.

A Vitoria Cabral por sua amizade, suporte e paciência ao longo de nossa estadia juntos.

Ao Octávio Baccallini por fazer por mim muito mais do que um iniciando científico.

Aos meus amigos e colegas do LABIMAN, Leilson Oliveira, Lara Moreira, Daiana Barroso, Helaine Queiroz, Bruna Nascimento e Thaís Lima, todos vocês que conviveram comigo, cada um de alguma forma foram essenciais na minha caminhada e nunca os esquecerei.

Aos professores Bruno Cavalcante, Emmanuel Silva e Jacilene Silva pela contribuição e ajuda na confecção dos resultados.

Ao corpo docente do PPGMM pelas críticas e ensinamentos ao longo do programa.

Aos demais amigos do PPGMM, Artur Montenegro, Fábio Juan e Rodrigo Guedes pelo companheirismo.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira, Prof. Dr. Emmanuel Silva Marinho e a Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

*“Meu pai me deu esse corpo que é efêmero;  
mas o meu mestre me deu uma vida que é  
imortal.”*

Alexandre, o Grande

## Resumo

Bactérias multirresistentes são causas de diversas enfermidades em todo o globo. A Organização Mundial da Saúde estima que dentre as bactérias multirresistentes, *Staphylococcus aureus* é a segunda maior causa de infecções e ônus econômico no continente europeu. Infecções persistentes, oriundas da formação de biofilme são responsáveis por parte significativa de progressão da doença para sepse em indivíduos hospitalizado que fazem uso de material biomédico. Diante dessa prerrogativa, estratégias para viabilizar uma resposta a resistência antimicrobiana vem sendo traçada, como o reposicionamento de fármacos e interações farmacológicas de antimicrobianos. Nesse contexto de reposicionamento, a propafenona um antiarrítmico 1c bloqueador dos canais de sódio e com atividade  $\beta$ -adrenérgico, surgiu como um fármaco recentemente avaliado com propriedade antimicrobianas, sendo assim um alvo a ser reposicionado para a antibioticoterapia. Diante disso, esse estudo buscou aprofundar o entendimento do mecanismo de ação antimicrobiana da propafenona em cepas *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina na forma planctônica e em biofilme, além de avaliar a interação da substância quando associada a oxacilina e determinar se a propafenona apresentou presença de atividade citotóxica em células eucarióticas. Para determinar o efeito antibacteriano em células planctônicas, foram utilizadas metodologias referentes ao protocolo M7-A9 do CLSI em diluições em caldo na placa de 96 poços. A determinação da ação bactericida da droga foram realizadas pela razão da Concentração Bactericida Mínima (CBM) com a Concentração Inibitória Mínima (CIM) definida pelo *Nível de Tolerância* e através do ensaio Curva de Morte. Para determinar a interação farmacológica com a oxacilina foi utilizado o *checkerboard*. A fim de elucidar mecanismos de ação da droga, utilizou-se a citometria de fluxo para determinação da permeabilidade de membrana e da fragmentação do DNA bacteriano. Os ensaios de toxicidade foram realizados em gel de agarose no ensaio Cometa Alcalino e em placa de 96 poços para o Ensaio Hemólise. Os ensaios *in silico* foram realizados em *software: Lamarkian Genetic algorithm*. A CIM da propafenona ficou definida em 250 em das cepas e 500 ug/mL para o restante. A propafenona apresentou ação sinérgica com a oxacilina contra biofilme e em células planctônicas. Foram evidenciados o aumento da permeabilidade da membrana em decorrência da propafenona, assim como dano ao DNA e ligações moleculares do tipo ponte de hidrogênio na PBP2a e em proteínas nucleares. Não foram evidenciados indícios de citotoxicidade em células eucarióticas de murinos induzidos pela propafenona. A propafenona nesse estudo confirmou sua atividade antimicrobiana em células planctônicas e em biofilme,

além de determinar um provável mecanismo de ação envolvendo a desestabilização do revestimento bacteriano com fragmentação do DNA em MRSA, sem apresentar indícios de citotoxicidade a células eucarióticas. A identificação de um provável mecanismo de ação facilita os estudos posteriores com a droga, na busca por uma futura alternativa de uso como adjuvante na terapia antimicrobiana.

**Palavras-chaves:** Propafenona; MRSA; Resistência antimicrobiana; Reposicionamento de fármacos.

## Abstract

Multidrug-resistant bacteria are causes of several diseases across the globe. The World Health Organization estimates that among multidrug-resistant bacteria, *Staphylococcus aureus* is the second leading cause of infections and economic burden on the European continent. Persistent infections arising from biofilm formation are responsible for a significant part of disease progression to sepsis in hospitalized individuals who make use of biomedical material. Given this prerogative, strategies to enable a response to antimicrobial resistance have been outlined, such as the repositioning of drugs and pharmacological interactions of antimicrobials. In this context of repositioning, propafenone, an antiarrhythmic 1c sodium channel blocker with  $\beta$ -adrenergic activity, emerged as a recently evaluated drug with antimicrobial properties, thus being a target to be repositioned for antibiotic therapy. Therefore, this study sought to deepen the understanding of the antimicrobial action mechanism of propafenone in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in the planktonic form and in biofilm, in addition to evaluating the interaction of the substance when associated with oxacillin and to determine whether propafenone had the presence of activity cytotoxic in eukaryotic cells. To determine the antibacterial effect on planktonic cells, methodologies referring to the CLSI M7-A9 protocol were used in broth dilutions in the 96-well plate. The determination of the bactericidal action of the drug was performed by the ratio of the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) with the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) defined by the Tolerance Level and through the Curve of Death assay. To determine the pharmacological interaction with oxacillin, the checkerboard was used. In order to elucidate drug action mechanisms, flow cytometry was used to determine membrane permeability and bacterial DNA fragmentation. Toxicity assays were performed on agarose gel in the Comet Alkaline assay and on a 96-well plate for the Hemolysis Assay. The *in silico* tests were performed in software: Lamarckian Genetic algorithm. The MIC of propafenone was set at 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the strains and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the remainder. Propafenone showed synergistic action with oxacillin against biofilm and planktonic cells. Increased membrane permeability due to propafenone, as well as DNA damage and molecular hydrogen bonding in PBP2a and nuclear proteins were evidenced. There was no evidence of cytotoxicity in eukaryotic cells of mice induced by propafenone. Propafenone in this study confirmed its antimicrobial activity in planktonic cells and in biofilm, in addition to determining a probable mechanism of action involving the destabilization of the bacterial coat with DNA fragmentation in MRSA, without showing evidence of cytotoxicity to eukaryotic cells. The identification of a probable

mechanism of action facilitates further studies with the drug, in the search for a future alternative for use as an adjuvant in antimicrobial therapy.

**Keywords:** Propafenone; MRSA; Antimicrobial Resistance; Repurposing Drug.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Porcentagem (%) de isolados com resistência a meticilina (SARM) em países do continente europeu em 2019.....	7
Figura 2 - Número de pacientes hospitalizados com infecções pertinentes a MRSA entre 2012 à 2017.....	8
Figura 3 - Porcentagem de resistência a oxacilina em <i>S. aureus</i> em pacientes adultos, pediátricos e em neonatos nos anos de 2012 a 2020. ....	9
Figura 4 - Porcentagem de resistência a oxacilina em <i>S. aureus</i> em pacientes adultos, pediátricos e em neonatos nos anos de 2019.....	10
Figura 5 - Estrutura química da propafenona.....	9
Figura 6 - Fluxograma das metodologias empregadas no estudo.....	22
Figura 7 - Gráfico da cinética de morte bacteriana mostrando a atividade da oxacilina (OXA), vancomicina (VAN) e propafenona (PROP) contra a cepa clínica de MRSA.....	34
Figura 8 - Atividade da propafenona contra biofilme de MRSA avaliada pelo ensaio de redução de MTT.....	35
Figura 9 - Atividade anti-biofilme da propafenona frente a MRSA avaliada pelo ensaio de redução de MTT.....	36
Figura 10 - Efeito citotóxico de drogas na membrana bacteriana, em uma cepa representativa de MRSA avaliada por citometria de fluxo.....	37
Figura 11 - Dano ao DNA de uma cepa representativa de MRSA avaliadas por citometria de fluxo, via teste TUNEL.....	38
Figura 12 - Avaliação do dano ao DNA em célula eucariótica. Efeito após 12 horas de incubação com a propafenona.....	39
Figura 13 - Atividade hemolítica da propafenona em eritrócitos de camundongos. Os eritrócitos de camundongo foram tratados em diluições seriadas de Triton X-100 e propafenona.....	40
Figura 14 - Interações moleculares entre DHFR e a propafenona.....	41
Figura 15 - Interações moleculares entre o complexo DNA-girase e a propafenona.....	42
Figura 16 - Interações moleculares entre a enzima girase e a propafenona.....	43
Figura 17 - Interações moleculares entre o DNA bacteriano e a propafenona.....	44
Figura 18 - Interações moleculares entre a PBP2a e a propafenona.....	46

Figura 19 - Esquema do possível mecanismo de ação antimicrobiano da PROP em MRSA...54

### **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain Heart Infusion*

CaMHB – Caldo Mueller Hinton Cation ajustado

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CDC- Centers for Disease Control and Prevention

CFU - *Colony Forming Unit*

CVC – Cateter venoso central

DHFR - *Dihydrofolate reductase*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDCD - *European Centre for Disease Prevention and Control*

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

E.P.M – Erro padrão da média

EPS - *Extracellular polymeric substances*

ESKAPE – grupo de patógenos: *Enterococcus faecium, S. aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter*)

EUA- Estados Unidos da América

FDA- *Food and Drug Administration*

FICI – *Fractional Inhibitory Concentration Index*

IDSA - *Infectious Diseases Society of America*

IRAS- Infecções Relacionadas a Assistência a Saúde

IPCS- Infecções Primárias na Corrente Sanguínea

LABIMAN – Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas

MMFF94 - *Merck Molecular Force Field 94*

MMS - *Methyl methanesulphonate*

MRSA - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MTT - Solução 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

OXA – Oxacilina

PBP – *Penicillin-binding protein*

PBS - *Phosphate-buffered saline*

PIA - *Polysaccharide intercellular adhesin*

PROP - Propafenona

PSM - *Phenol-soluble modulín*

RMSD - *Root Mean Square Deviation*

SCCmec- Cassete cromossômico estafilocócico

SCoN – *Staphylococcus Coagulase Negativo*

SrtA – Sortase A

TMP-SMX - trimetoprim-sulfametoxazol

TSA – Teste de sensibilidade a antimicrobianos

TSB - *Tryptic Soy Broth*

UFC – Universidade Federal do Ceará

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

VAN – Vancomicina

$\Pi$  – pi

$\mu$  - micro

$\beta$  – beta

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros usados em simulações de ancoragem molecular.....	30
Tabela 2: Concentração inibitória mínima da oxacilina (OXA), vancomicina (VAN), propafenona (PROP) e determinação do nível de tolerância à propafenona contra <i>S. aureus</i> ..	32
Tabela 3: Concentração inibitória mínima da oxacilina (OXA), vancomicina (VAN), propafenona (PROP) e sinergismo entre OXA-PROP contra cepas de <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA).....	33
Tabela 4: Interações moleculares da propafenona com os resíduos de <i>S. aureus</i> .....	48

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1	Infecções bacterianas .....	2
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
2.3	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina (MRSA) .....	4
2.4	Epidemiologia .....	5
2.5	Mecanismos de virulência .....	11
2.5.1	<i>Biofilme</i> .....	12
2.5.2	<i>Mecanismos de resistência</i> .....	13
2.6	Terapêutica .....	15
2.6.1	<i>Tratamento convencional</i> .....	15
2.6.2	<i>Reposicionamento de fármacos - Propafenona</i> .....	17
3	HIPÓTESES .....	20
4.	OBJETIVO .....	21
4.1	Objetivo geral .....	21
4.2	Objetivos específicos .....	21
5	METODOLOGIA .....	22
5.1	Microrganismos e Drogas .....	22
5.2	Testes de Sensibilidade .....	23
5.2.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibacterianos</i> .....	23
5.2.2	<i>Interação farmacológica entre propafenona e oxacilina</i> .....	23
5.2.3	<i>Concentração Bactericida Mínima (CBM)</i> .....	24
5.2.4	<i>Nível de Tolerância</i> .....	24
5.2.5	<i>Curva de Morte</i> .....	24
5.2.6	<i>Atividade Anti-biofilme</i> .....	25
5.2.7	<i>Análise estatística dos testes de sensibilidade</i> .....	26
5.3	Testes realizados por citometria de fluxo .....	26
5.3.1	<i>Preparo das suspensões</i> .....	26
5.3.2	<i>Avaliação da integridade da membrana</i> .....	26
5.3.3	<i>Análise de dano ao DNA</i> .....	27
5.4	<i>Análise de dano ao DNA por intermédio do Cometa Alcalino</i> .....	27

5.5	<b>Ensaio Hemólise</b> .....	28
5.6	<b>Ancoragem Molecular</b> .....	28
5.6.1	<i>Preparação dos Alvos</i> .....	29
5.6.1.1	<i>Sítios alvos do S. aureus</i> .....	29
5.6.2	<i>Docagem Molecular</i> .....	29
5.6.3	<i>Crítérios de Seleção e validação</i> .....	30
6	<b>RESULTADOS</b> .....	31
6.1	<b>Testes de sensibilidade</b> .....	31
6.1.1	<i>Atividade antibacteriana da propafenona isolada e em combinação com a oxacilina</i> .....	31
6.1.2	<i>Determinação da CBM e nível de tolerância da propafenona</i> .....	31
6.1.3	<i>Cinética de morte bacteriana</i> .....	33
6.1.4	<i>Redução do biofilme maduro por intermédio da propafenona isolada e em associação a oxacilina</i> .....	34
6.1.5	<i>Ação antibiofilme da propafenona isolada e em combinação com a oxacilina</i>	35
6.2	<b>Citometria de fluxo</b> .....	36
6.2.1	<i>Permeabilidade da membrana</i> .....	36
6.2.2	<i>Análise do dano ao DNA através do TUNEL</i> .....	37
6.3	<b>Análise do dano ao DNA através do Teste Cometa Alcalino</b> .....	38
6.4	<b>Perfil de hemólise</b> .....	39
6.5	<b>Análise da docagem molecular em alvos do DNA</b> .....	40
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	47
8	<b>CONCLUSÃO</b> .....	55
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos é contínua e natural (BOCKSTAEEL; VAN AERSCHOT, 2009). Entretanto o uso exacerbado e indiscriminado de antimicrobianos, seja por equívocos no diagnóstico ou por automedicação aliados a outras situações como falsificações de medicamentos, controle de distribuição falho, uso intenso de antibacterianos na linha de produção animal e na agricultura são alguns dos fatores que propiciam um cenário de maior pressão seletiva a microrganismos multirresistentes (AYUKEKBONG; NTEMGWA; ATABE, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Bactérias multirresistentes são causas frequentes de aumento dos custos de tratamento, e incremento na taxa de morbidade e mortalidade. Em 2017 a Organização Mundial da Saúde emitiu uma lista global envolvendo patógenos com resistência a antimicrobianos designados como prioritários. Esses patógenos são elencados na nomenclatura ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* spp.) (TACCONELLI et al., 2018 DE OLIVEIRA, 2020).

Dentre essas bactérias do grupo ESKAPE, *S. aureus* com perfil de resistência a meticilina é a segunda maior causa de infecções e ônus econômico em países do continente europeu, com 150 mil infecções, incluindo endocardite, osteomielite, pneumonia, sepse, entre outras e números de óbitos superior a 7 mil por ano (BORG; CAMILLERI, 2021; GOEL et al, 2021). Não muito diferente do continente europeu, no Brasil a *Staphylococcus aureus* constantemente aparece entre os quatro principais patógenos associados a infecções primárias da corrente sanguínea, segundo dados da Anvisa (2021).

Ademais, os custos para pesquisa e produção de novos fármacos pela indústria farmacêutica são dispendiosos, podendo consumir mais de uma década de pesquisa e envolver custos com valores superiores a US\$ 1 bilhão (THANGAMANI; YOUNIS; SELEEM, 2015).

Diante da problemática, o reposicionamento de fármacos aparece como uma estratégia terapêutica menos onerosa e mais prática na descoberta de novos antimicrobianos, devido ao precursor conhecimento farmacocinético e citotóxico do fármaco (THANGAMANI; YOUNIS; SELEEM, 2015; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). Uma alternativa que vem mostrando-se viável é o uso combinado de fármacos que pode promover vantagens como retardar o processo de resistência antimicrobiana e a diminuição da toxicidade dos fármacos de utilização isolada (CHEESMAN, 2017; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018; AYAZ,

2019). Nesse contexto, o potencial antimicrobiano de fármacos antiarrítmicos já foi evidenciado em alguns trabalhos (PETROVIĆ et al, 2020, KRUSZEWSKA et al, 2021).

Diante desses estudos precursores demonstrando seu efeito antibacteriano, o cloridrato de propafenona é comumente apresentado como um fármaco amplamente utilizado no tratamento de arritmia supraventricular e ventricular, pertencente a classe dos antiarrítmicos 1c, possuindo ampla absorção oral, com tempo de meia vida entre 2 a 10 horas. Sua ação clássica é devido ao bloqueio dos canais de sódio e  $\beta$ -adrenérgicos (CHEN et al, 2019; FARAG et al, 2019).

Ainda que evidenciado estudos na literatura utilizando o fármaco ou derivados, a quantidade de trabalhos avaliando a atividade antimicrobiana dessa classe de fármacos é baixa, ademais não há dados suficientes a respeito da ação antibiofilme dessa droga e sobre a compreensão de seu mecanismo de ação em MRSA (ABONIA et al, 2018; PETROVIC et al, 2020; KRUSZEWSKA, 2021). Diante da escassez de dados acerca do tema, esse estudo procurou demonstrar a atividade *in vitro* do cloridrato de propafenona frente a células planctônica e em biofilme de cepas de *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina (MRSA), identificar potenciais sítios ligantes por intermédio da docagem molecular e elucidar os possíveis mecanismos de ação ainda desconhecidos.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Infecções bacterianas**

As bactérias podem ser encontradas nos mais diferentes habitats da Terra, desde campos e pradarias a oceanos e regiões inóspitas. Nos humanos, as bactérias podem apresentar-se de maneira inofensiva, colonizando diversas regiões do corpo, servindo de maneira a auxiliar na obtenção de nutrientes ou em defesa de patógenos invasivos (SANTOS, 2004). Algumas bactérias apresentam maior virulência, conseqüentemente possuem grande capacidade de invadir, destruir tecidos do corpo humano e ocasionar doenças com maior frequência. Outras bactérias chamadas de oportunistas, aproveitam condições preexistentes como imunossupressão para provocar enfermidade. Infecções ocasionadas por bactérias surgem a todo momento e podem ser provenientes de diversos microrganismos, sendo resultado do dano causado pela bactéria e o decorrer da resposta imune à infecção (MURRAY et al., 2015; GARRIDO et al., 2018).

Doenças infecciosas são causas de sérios problemas de saúde, e um dos grandes fatores de morbidade no mundo (GEORGIA et al., 2015). Até o início do século XX, as

doenças infecciosas, provenientes de diversos patógenos, entre eles as bactérias, constituíam as principais causas de morte. O advento dos antimicrobianos, melhorias no saneamento e hábitos de higiene, modificaram o antigo cenário de mortalidade ocasionada principalmente por infecções bacterianas (MADIGAN, 2016).

O ambiente hospitalar é o local com maior possibilidade de encontrar microrganismos resistentes, principalmente nas unidades de terapia intensiva (UTI). Devido a quantidade de procedimentos invasivos, uso de antibacterianos e imunossupressores que os pacientes são submetidos, somados a longos períodos de internação e contato com diversos profissionais da saúde, levam a uma expressiva ameaça à vitalidade do paciente, sobretudo aos enfermos com idade avançada ou recém-nascidos que imunologicamente são mais susceptíveis (VAN BUUL et al., 2012; PERNA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018).

Constituindo um grave problema de saúde pública, as infecções hospitalares geram impacto na mortalidade e morbidade, no tempo de internação e nos gastos referentes a diagnóstico e terapêutica. Apesar de que a UTI tenha possibilitado uma sobrevivência a pacientes em estado crítico, o que é bastante positivo, acaba por colocar esses indivíduos em risco de exposição a microrganismo resistentes (PERNA et al., 2015).

Os agentes etiológicos mais prevalentes na UTI são as bactérias. Destas destacam-se *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus* coagulase negativa e a *Staphylococcus aureus* (ROCHA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2018).

## **2.2 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não esporulada, aparecendo em arranjos na forma usual de cachos (LIMA et al., 2015). É catalase e coagulase positiva, sendo esta última a enzima que a diferencia das demais bactérias do gênero, embora um pequeno número de espécies não - *aureus* também produza coagulase (PEACOCK; PATERSON, 2015).

Considerada uma bactéria normal da microbiota humana, estima-se que um terço da população mundial é colonizado por *Staphylococcus aureus*, preferencialmente em mucosas superficiais e pele (ONDUSKO; NOLT, 2018).

Em um antigo estudo realizado por Noble, Valkenburg e Wolters (1967), no Central Public Health Laboratory, Inglaterra; verificou-se uma grande incidência de colonização na região da mucosa nasal, sugerindo a época que haveria uma influência genética responsável

pela predisposição em alguns indivíduos em um mesmo núcleo familiar (NOBLE; VALKENBURG; WOLTERS, 1967).

Embora seja comprovadamente verdadeiro que a mucosa nasal seja um dos sítios preferenciais para colonização por *S. aureus*, estudos mais recentes como o realizado por Liu et al., (2015), propõe uma visão alternativa a ideia de que a influência genética seja responsável por uma predisposição a colonização por *S. aureus*. Segundo Liu et al., (2015) existe sim influência, essa associada mais a densidade bacteriana nasal, sendo então a colonização atribuída ao fator fenótipo ambiental, este apresentando maior relevância para justificar a colonização por *S. aureus*.

A colonização por *Staphylococcus aureus*, não necessariamente implica dizer que o indivíduo desenvolverá patologia referente a bactéria, entretanto representa um fator de risco para o desenvolvimento de infecção, considerando que a infecção geralmente ocorre com a mesma cepa de *S. aureus* que coloniza o indivíduo. Em geral a transmissão ocorre por contato direto com o indivíduo colonizado ou infectado, através do tato, frequentemente mediante as mãos de profissionais de saúde que ocasionalmente são transitoriamente colonizados (LOWY, 1998; ONDUSKO; NOLT, 2018).

Infecções oriundas por *Staphylococcus aureus* apresentam amplo espectro de doenças, incluindo infecções de pele, tecidos moles, pneumonia, endocardite, bacteremia, osteomielite e infecção alimentar (SOWASH; UHLEMANN, 2013; HO et al., 2018).

### **2.3 *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA)**

*Staphylococcus aureus* é um dos principais patógenos com capacidade para desenvolver rápida resistência a antibacterianos. Inicialmente limitado aos hospitais, o MRSA vem apresentando crescente presença na comunidade nos últimos anos (RIBEIRO et al. 2014).

Os primeiros casos relatados de infecção por MRSA adquirida na comunidade, foram datadas em 1980, quando surtos de infecções ocorreram em usuários de drogas intravenosa em Detroit, conforme relatado nos trabalhos de Saravolatz (1982) e Levine, Crane e Zervos (1986). No final da década de 1990, as infecções por MRSA na comunidade passaram a ser reconhecida com uma distinta clínica devido ao acometimento da doença por indivíduos jovens e saudáveis, assim como seu histórico genético distinto e padrões de sensibilidade antimicrobiana relativamente preservados (SOWASH; UHLEMANN, 2013).

Após 1996, algumas cepas de MRSA com o menor cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) surgiram na comunidade. Estas cepas de MRSA abrigam menos genes resistentes aos não- $\beta$  lactâmicos, podendo ser susceptíveis a macrolídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas, lincosamidas e inibidores da via folato (ZETOLA et al., 2005; HO et al., 2018). Atualmente, infecções nosocomiais podem resultar dessas cepas de MRSA que já foram consideradas limitadas à comunidade (HO et al., 2018).

A frequência de infecções por MRSA tem apresentado grande impacto clínico e econômico, ocasionado pelo crescente número em escala mundial de casos em instituições hospitalares (VASCONCELLOS et al., 2015).

Kapadia et al., (2016) em estudo realizado em uma clínica nos Estados Unidos, analisou que pacientes infectados por MRSA apresentam significativo aumento em custos totais de tratamento comparado aos não infectados pelo tipo resistente. \$108,286 dólares contra \$73,330 dólares, com um tempo médio de permanência aumentado 1,8 vezes a mais comparado ao tempo de pacientes que não foram infectados por MRSA.

Segundo Center for Disease Control and Prevention (CDC) o gasto anual com pacientes hospitalares em tratamento para MRSA nos Estados Unidos da América é estimado em \$1.7 bilhões de dólares (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al., 2019).

Alguns fatores são responsáveis pelo aumento do custo em infecções por MRSA; o longo período de estadia do paciente com a alternância do tratamento adequado, maior número de exames laboratoriais e alguns efeitos adicionais sofridos por indivíduos infectados, como o choque séptico que leva a mais gastos, como demonstrado nos trabalhos de Barrero et al., (2014) e Rubio-Torres et al., (2010). Tomar medidas para minimizar a alta taxa de infecção e disseminação por MRSA, torna-se essencial para diminuir o impacto econômico e social.

## **2.4 Epidemiologia**

Muito presente em superfícies de próteses sintéticas ou ao tecido biológico durante a cirurgia ou pós-operatório, a existência de *S. aureus* nesses materiais pode desencadear uma gama de infecções. Nos Estados Unidos, o percentual de óbitos vinculados a infecções por *S. aureus* é de 3,2%, aproximadamente 10.600 óbitos em um ano. Quando esse quadro é vinculado a bacteremia ocasionada por MRSA, o percentual sobe drasticamente, ocasionando

na fatalidade de 28% a 38% dos pacientes em até 30 dias (ARGENZIANO et al., 2017; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al., 2019).

Em outro estudo, Cavalcante et al., (2017) demonstraram índices semelhantes de mortalidade quando comparado ao de Argenziano et al., (2017), com aproximadamente 20% das letalidades sendo correlacionadas a infecções associadas a cuidados de saúde e MRSA (CAVALCANTE et al., 2017).

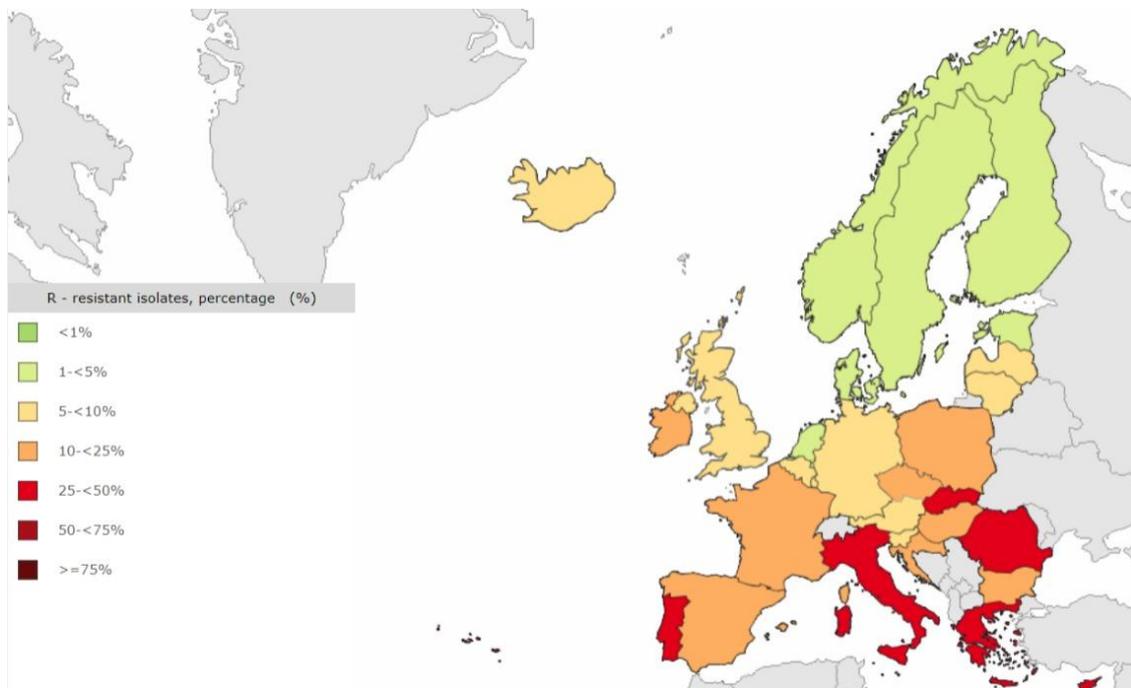
Mundialmente, a *Staphylococcus aureus* todo ano é causa de infecções em 2 bilhões de pessoas (ANDERSEN, 2019).

Na Europa, a média de isolados com resistência a meticilina é em torno de 14,92%, excluindo alguns países que não possuem dados disponibilizados. Entretanto, há considerável discrepância entre os países do continente europeu. Os melhores índices estão entre os países da Escandinávia (Suécia, Dinamarca, Noruega e Finlândia) com as respectivas porcentagens: 1,8%, 2,2%, 1,1% e 2,1% seguido por Estônia com 3% e Holanda com 1,6%, destacados em verde na Figura 1. Excetuando-se a Estônia, nenhum desses outros países obtiveram índices percentuais superiores a 3,3% entre 2001 à 2019 (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2020).

Diferentemente dos países mais localizados no hemisfério norte, Grécia, Portugal, Itália, Romênia, Eslováquia e Chipre apresentam os piores índices de resistência a meticilina respectivamente: 37,6%; 34,8%; 34,3%; 46,7%; 27,2% e 36,2%. Todos esses países citados apresentam índices superiores a 20% desde 2001, com exceção da Eslováquia. Este país é o único que tem apresentado uma curva ascendente do ano de 2001 com valores referentes a 5,4% até os valores atuais de 27,2% em 2019 (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2020).

Majoritariamente há um predomínio de diminuição do número de isolados com resistência a meticilina nos países do continente europeu, como a Itália, Reino Unido, França, Alemanha, Espanha, Bulgária e outros. Em 2001 a média do continente era estimada em 18,77% de isolados com resistência a meticilina (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2020).

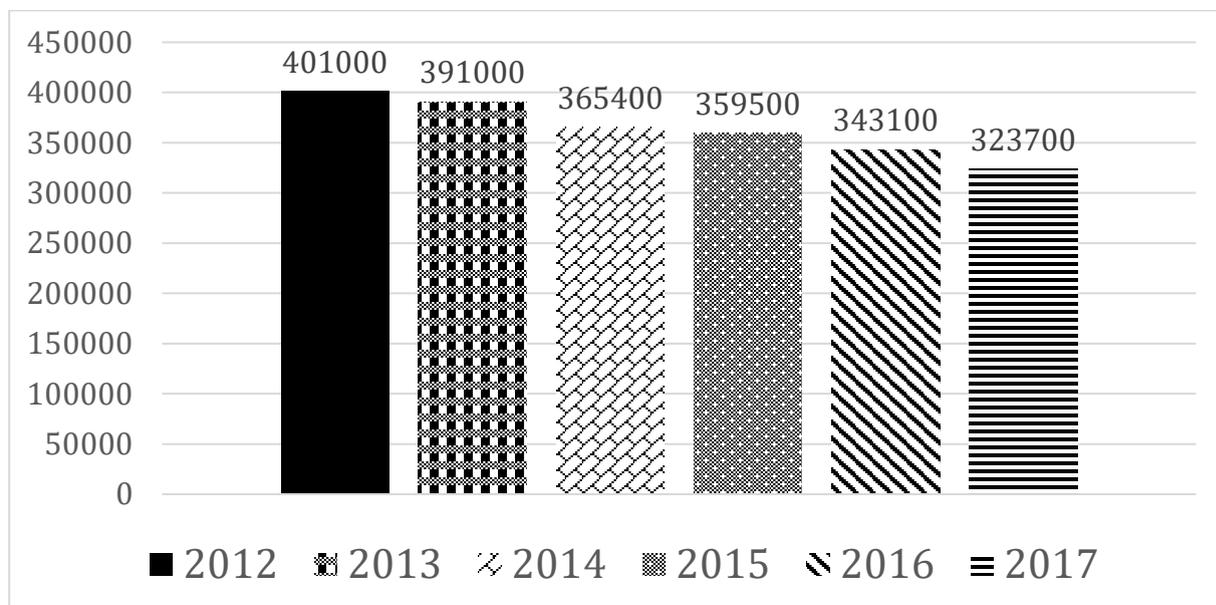
Figura 1: Porcentagem (%) de isolados com resistência a meticilina (SARM) em países do continente europeu em 2019.



Fonte: Modificado de *European Centre for Disease Prevention and Control* (2019).

Não muito diferente do continente europeu, os Estados Unidos da América (EUA) também obtiveram uma diminuição no número de casos segundo dados da *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), (2019). Em 2012 o número estimado de casos de MRSA em hospitais foi de 401.000 e em 2017 alcançou o total de 323.700 casos. Como pode ser visto na Figura 2, ano após ano o número de casos de internação vem diminuindo nos EUA, assim como vem ocorrendo na maioria dos países da Europa. A transmissão comunitária tem caído 7% ao ano e a hospitalar tem apresentado maior redução com 17% ao ano (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al., 2019).

Figura 2: Número de pacientes hospitalizados com infecções pertinentes a MRSA entre 2012 à 2017



Fonte: Modificado de *Centers for Disease Control and Prevention* (2020)

Essa queda vertiginosa segundo o CDC, pode ser compreendida por novas estratégias assistenciais adotadas pelos hospitais em conformidade as recomendações propostas pelo CDC durante esse período. Assim como enfoque na biossegurança, como o maior uso de luvas, gorros e lavagem de mãos em ambiente hospitalar (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al., 2019).

Em âmbito nacional a *Staphylococcus aureus* apresenta forte relevância por estar frequentemente entre os microrganismos mais vinculados a Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (IRAS). De 2012 a 2020 a Anvisa, (2021) emite boletins epidemiológicos no qual é possível evidenciar a constante presença da MRSA em ampla faixa etária associadas a Infecções Primárias na Corrente Sanguínea (IPCS). Essa associação é possivelmente a mais descrita, devido a bacteremia ser recorrente de infecções por *Staphylococcus aureus* em ambiente hospitalar (TONG et al., 2015).

De maneira geral os dados da Anvisa são de fácil acesso, contudo em valores absolutos alguns dados não estão disponíveis, tornando-se difícil estipular os números de isolados obtidos, ainda que disponibilizados os valores relativos das três categorias contempladas: Adultos, Pediátricos e Neonatos (ANVISA, 2021)

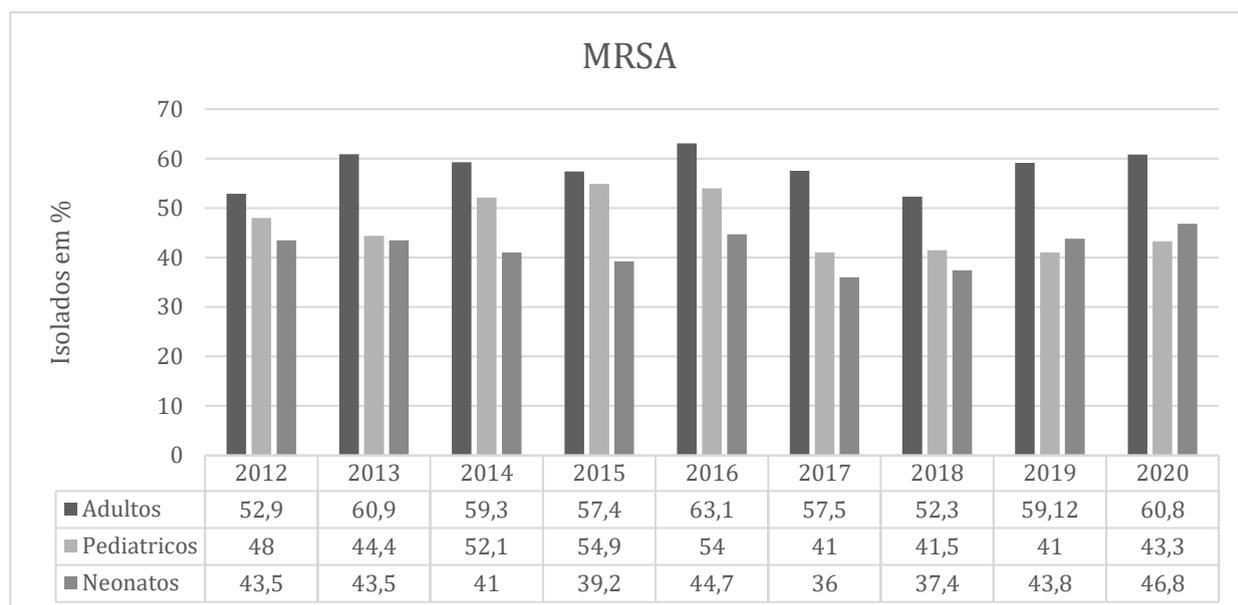
Independente do perfil de resistência, a *S. aureus* tem ocupado com frequência os postos de 3º ou 4º microrganismo mais presente em bacteremias ao longo desses 8 anos. Em

adultos no ano de 2015, representou 13,2% dos casos de internação em UTI adulta por etiologia microbiana, atrás somente de *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus Coagulase negativo (SCoN)* com 16,9% e 16,5% respectivamente (Figura 3) (ANVISA, 2021).

Cinco anos depois poderia ser bastante diferente, mas o que pode ser visto na Figura 3 é justamente a continuação do cenário de 2015. Em 2020, *Staphylococcus aureus* representou 11,5% dos microrganismos vinculados a IRAS, atrás novamente dos mesmos microrganismos em 2015 (ANVISA, 2021).

Diferentemente da tendência na Europa e nos EUA, a porcentagem de resistência a oxacilina em *S. aureus* no Brasil continua constante. Entre 2012 a 2020, a presença de perfil de resistência variou de 52,9% a 60,8% conforme visto na Figura 4. Em números absolutos, 1515 de 2572 isolados foram identificados com resistência a oxacilina e 94 de 2572 isolados com resistência a vancomicina, equivalente a 4,4%. (ANVISA, 2021).

Figura 3: Porcentagem de resistência a oxacilina em *S. aureus* em pacientes adultos, pediátricos e em neonatos nos anos de 2012 a 2020.



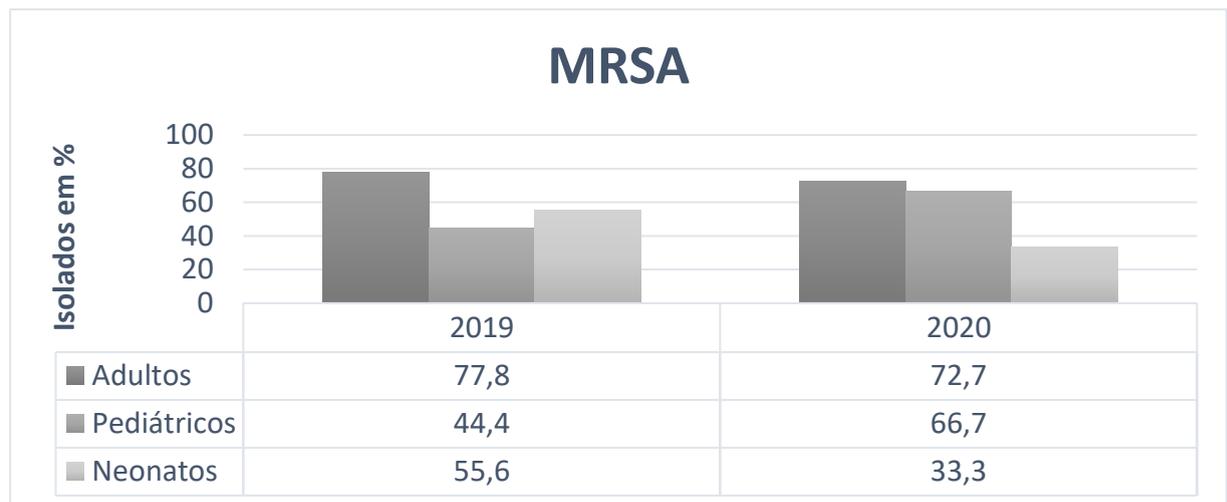
Fonte: Modificado de Anvisa, (2021).

No âmbito estadual o Ceará obteve impacto menor quando comparado ao nacional, com 10,35% e 8,75% das internações envolvendo a *Staphylococcus aureus* correspondendo respectivamente aos anos de 2019 e 2020 (ANVISA, 2021).

No Ceará, no tocante ao perfil de resistência ao *Staphylococcus aureus*, o estado possui maior porcentagem em média com relação ao perfil nacional, obtendo em 2019 o

percentual de 77,8% e em 2020 o percentual de 72,7% de resistência a oxacilina. Superior a maior média nacional de 63,1% em adultos no ano de 2016 (ANVISA, 2021).

Figura 4: Porcentagem de resistência a oxacilina em *S. aureus* em pacientes adultos, pediátricos e em neonatos nos anos de 2019



Fonte: Modificado de Anvisa, (2021).

A quantidade escassa de dados envolvendo pacientes neonatos e pediátricos impossibilita uma análise mais profunda desses dados em alguns estados, nos restringindo aos valores referentes a pacientes adultos dos quais englobam uma maior faixa etária.

A nível municipal, não há dados oficiais dos órgãos governamentais. Entretanto publicações como o estudo realizado por Freire et al (2020) que traçou o perfil microbiológico, observou a pouca presença de bactérias Gram positivas. De 490 culturas analisadas, apenas 96 positivaram. Deste total, 74% das bactérias foram identificadas como Gram-negativas e 19,8% como Gram-positivas. Entre as Gram-positivas, houve maior predomínio de *Enterococcus* spp. (78,9%) seguido por *Staphylococcus* spp (15,8%), do qual apenas 1,6% dos isolados positivados foram identificados como MRSA.

Em outro estudo, no município de Fortaleza, conduzido por Farias Ribeiro et al., (2014) no período de agosto a dezembro de 2011 em estudantes universitário não hospitalizados, foram coletadas 204 amostras de swab nasal e das mãos, igualmente distribuídas entre 102 estudantes; a prevalência de *S. aureus* foi de 38,2% e de MRSA foi 5,9%. Embora o número esteja dentro dos limites usuais da literatura, fluando entre 20 a 40% de incidência, a presença de alunos com *S. aureus*, não hospitalizados ou com fatores predisponentes a bactéria demonstra a presença da MRSA associada a comunidade.

## 2.5 Mecanismos de virulência

*S. aureus* possui alguns mecanismos de virulências que podem resultar em infecções severas. A catalase, uma enzima intrínseca para sobrevivência intracelular, funciona quebrando uma das defesas do hospedeiro, o peróxido de hidrogênio, em oxigênio e água (ONDUSKO; NOLT, 2018).

Revestindo a camada mais externa da parede celular, há uma cápsula de polissacarídeo, responsável por inibir a fagocitose bacteriana e encobrir as opsoninas, resultando em aumento de virulência, capacidade de invasão tecidual e aumento de bacteremia. As proteínas superficiais como a coagulase, atuam como catalisador de fibrinogênio para fibrina, e os fatores de aglutinação, que causam a coagulação (LIMA et al. 2015, ONDUSKO; NOLT, 2018).

Toxinas e substâncias extracelulares, incluindo hemolisinas e leucocidinas, responsáveis por lise eritrocitária e necrose cutânea respectivamente; toxinas esfoliativas e enterotoxinas B e C são encarregadas pela propagação da resposta inflamatória sistêmica (ONDUSKO; NOLT, 2018). A  $\alpha$ -toxina, ou  $\alpha$ -hemolisina como também é conhecida, é secretada pela maioria das cepas de *Staphylococcus aureus* como um monômero solúvel em água de 33,2 kDa. Quando em contato com a membrana do hospedeiro, havendo essa ligação, o monômero é capaz de oligomerizar em uma nova estrutura, tornando-se um heptâmero de 232,4 KDa inserido por membrana (BERUBE; WARDENBURG, 2013; SILVA et al., 2017). Essa toxina formadora de poros é relatada como importante proteína responsável por danos teciduais e no comprometimento de diversas linhagens celulares, incluindo células T, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e endoteliais (BERUBE; WARDENBURG, 2013, SILVA et al., 2017, HODILLE et al., 2017).

Outro mecanismo de virulência está vinculado ao grupo de enzima denominado Sortases. Essas enzimas, especificamente a Sortase A (SrtA), estão envolvidas na aderência estafilocócica ao tecido hospedeiro, sendo indispensáveis nesse aspecto (SILVA et al., 2017). A proteína A, quando ligada a porção Fc da molécula de imunoglobulina G, participa da produção de efeitos anticomplementares, quimiotáticos, antifagocitários com geração de histamina, reações de hipersensibilidade, lesão plaquetária e pode capturar as imunoglobulinas servindo de camuflagem durante invasão tecidual do hospedeiro (VERINGA; VERHOEF, 1986; HODILLE et al., 2017)

Proteínas como a Proteína A, proteínas do fator de agregação e proteínas ligadas a fibronectina dependem das enzimas Sortases para serem fixadas a parede celular. Por

possuírem alto grau de relevância para estruturação funcional de proteínas de superfície, constituem valor primordial tanto para infecções sistêmicas quanto localizadas (MAZMANIAN, 1999; WEISS, 2004; SILVA et al., 2017).

### **2.5.1 Biofilme estafilocócico**

A definição clássica de biofilme é definida por uma comunidade microbiana estruturada que está ligada a uma superfície abióticas ou bióticas e encoberta por matriz extracelular polimérica ou substância extracelular polimérica, da sigla em inglês: EPS. (SCHILCHER; HORSWILL, 2020)

A primeira descrição de biofilme foi realizada em 1683 por Antoni van Leeuwenhoek quando este analisava o material de seu próprio dente em um microscópio rudimentar. Foi aproximadamente 300 anos depois, que os biofilmes passaram a ser um assunto de interesse médico. Esse interesse foi despertado devido a recorrentes relatos de persistência das infecções que os pacientes acometidos de fibrose cística mantinham (VESTBY et al., 2020).

Com o biofilme, as bactérias conseguem se adaptar bem ao ambiente com variações nutricionais ou a falta destes. Alterações metabólicas, de expressão de genes e na produção de proteínas, conseguem reduzir o processo de divisão celular, ocasionando na redução do gasto metabólico. Essas mudanças não interferem apenas na adaptação a ambientes com pouca variedade nutricional, servem também para incrementar a resistência a antimicrobianos, seja por inativação das moléculas antibacterianas ou por redução da atividade celular no qual o antibacteriano atua (VESTBY et al., 2020).

Em biofilmes estafilocócicos, além da diminuição do metabolismo, estes também podem levar ao comprometimento do desempenho do sistema imune, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias assim como causando um influxo de fagócitos. Ademais o EPS possui alta densidade que é suficiente para dificultar a penetrabilidade de fármacos ou das próprias células de defesa do hospedeiro, e os polissacarídeos intracelulares de aderência (PIA) promovem resistência ao processo de fagocitose (OTTO, 2018).

Ainda que muitas bactérias e fungos possam produzir o biofilme, a produção deste por espécies estafilocócicas, principalmente pelo *S. epidermidis*, permite diferenciar o biofilme estafilocócico com suas especificidades em relação a outros. O gene regulador Agr, através de um mecanismo de comunicação célula por célula, o “quorum sensing” funciona coordenando a produção de proteases e Modulinas Solúveis em Fenol, do inglês: PSM. Estas modulinas são

as principais contribuidoras do processo de maturação do biofilme de *S. aureus* e de *S. epidermidis* (SHARMA; MISBA; KHAN, 2019; SCHILCHER; HORSWILL, 2020).

O processo de produção do biofilme estafilocócico envolve três etapas: aderência, maturação e destacamento. Dependendo da superfície, a aderência da bactéria pode ser via interações hidrofóbicas com superfícies abióticas ou por ligação entre proteínas de superfícies da bactéria com as proteínas do hospedeiro. Durante a fase de maturação, há o crescimento do biofilme, com produção de polissacarídeos de aderência intracelular (PIA), eDNA e a produção de EPS, estabilizando o biofilme. Por último há a fase de destacamento, no qual com ação de proteases, nucleases endógenas e três peptídeos chamados de PSM ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), que possuem ação semelhante a surfactantes e conseguem romper as ligações não covalentes entre os componentes da matriz extracelular desvinculando as bactérias umas às outras (FORMOSA-DAGUE et al., 2015; OTTO, 2018; SCHILCHER; HORSWILL, 2020).

Bem documentado é a presença de *SCoN* e de *S. aureus* produzindo o conhecido “*slime material*”, no qual é a denominação usual para a matriz do biofilme em dispositivos biomédicos como o cateter, marcapassos, entre outros, podendo desencadear processos infecciosos como sepse e endocardites (OTTO, 2018). Geralmente estes processos infecciosos acontecem em procedimentos cirúrgicos, pois estas distintas bactérias apresentam a característica de serem colonizadoras de nossos corpos. Ademais, a recorrente presença destas bactérias é devido a este aspecto, como a exemplo da ubiquidade de *S. epidermidis* (OTTO, 2018; SCHILCHER; HORSWILL, 2020).

O impacto do biofilme estafilocócico em dispositivos biomédicos é enorme. Em estudo envolvendo 49 hospitais por um período de 7 anos, demonstrou que houve um predomínio da presença de *SCoN* (31%) e de *S. aureus* (20%) em detrimento de outras bactérias. (WISPLINGHOFF et al., 2004) A consequência do uso desses dispositivos, muitas vezes é a bacteremia vinculada ao uso de cateter venoso central (CVC), caracterizando-se como a principal complicação em consequência do biofilme. A evolução natural para a sepse é uma consequência problemática que desencadeia milhares de mortes todos os anos (OTTO, 2018).

### **2.5.2 Mecanismos de resistência**

A resistência de *Staphylococcus aureus* aos antibacterianos surgiu um pouco depois da descoberta e uso da penicilina G, no começo de 1942, dois anos após início dos tratamentos (PEACOCK; PATERSON, 2015).

Inicialmente algumas cepas resistentes foram reconhecidas em um estudo realizado por Rammelkamp e Maxon (1942), com 29 cepas de *S. aureus*. Ficou observado que 4 cepas das 29 resistiram a exposição crescente e contínua à penicilina, apesar de haver uma ligeira variação de suscetibilidade à penicilina entre as cepas de *Staphylococcus aureus*, que a concentração e o uso crescente do antibacteriano em longo período, provocaria o aumento da resistência bacteriana à penicilina (RAMMELKAMP; MAXON, 1942).

A aquisição de mecanismos de resistência por parte da *S. aureus* pode ser através de elementos genéticos móveis, que transmitem virulência e resistência de outras espécies bacterianas ou estirpes estafilocócicas. A utilização abusiva e prolongada de antibacterianos pode proporcionar a seleção de colônias suscetíveis a tornar-se resistentes (ONDUSKO; NOLT, 2018). O gene *blaZ*, oriundo de um plasmídeo que rapidamente se propagou entre a população de bactérias, é o responsável pela resistência a penicilina e aos demais antibióticos instáveis a penicilinase, como ampicilina, amoxicilina, ticarcilina e piperacilina (HO et al., 2018).

Essa resistência ao fármaco acontece devido a produção da enzima  $\beta$  lactamase ou penicilinase, que hidrolisa o anel  $\beta$ -lactâmico resultando na inutilização do efeito antimicrobiano causado pela penicilina a bactéria. Atualmente a utilização desse antibacteriano é praticamente inútil para tratamento de infecções por *S. aureus*, atingindo um pouco mais de 90% na taxa de resistência (BONDI; DIETZ, 1945; PEACOCK; PATERSON, 2015).

A parede celular da bactéria *Staphylococcus aureus* conta com a presença de proteínas ligantes a penicilina (PBPs), importantes para a síntese da parede celular, que são os alvos preferenciais de antibacterianos  $\beta$  lactâmicos (LIMA et al. 2015). A resistência à meticilina acontece devido a aquisição do gene *mecA*, que codifica PBPs diferentes e transcreve genes reguladores divergentes. Os genes regulatórios diferenciados proporcionam que a síntese da parede celular produza variantes das proteínas de ligação a penicilina (PBPs), chamadas de PBP2 ou PBP2a, possuindo a mesma função fisiológica, porém com afinidade dos receptores diminuída a todos os  $\beta$  – lactâmicos com exceção da cefalosporina ceftarolina fosamil de quinta geração (LIMA et al. 2015; GUSHIKEN et al., 2016; PARTRIDGE et al., 2018).

O gene *mecA*, está presente em um elemento genético móvel, do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*SCCmec*), variando em diversos tipos de *SCCmec*, de modo que onze tipos já foram identificados, além de numerosos subtipos e variações (LIU et al., 2016).

Em 2007, um novo gene de origem zoonótica, homólogo ao gene *mecA* foi descoberto, o *mecC*. Ele possui considerável similaridade ao *mecA* na codificação da enzima transpeptidase, estando vinculado ao *SCCmec* tipo XI. Ainda que semelhantes, o gene *mecC* permite que as alterações da PBP sejam suficientemente diferentes para receber a nomenclatura de PBP2c e apresentando algumas diferenças como a menor termoestabilidade da proteína e melhor afinidade pela oxacilina e menor com a cefoxitina em comparação a PBP2a. Com isso o perfil de suscetibilidade dentre essas variantes é distinto (PATERSON HARRISON; HOLMES, 2014; BARBOZA et al., 2019)

Alguns desses tipos contêm genes determinantes para resistência de diversas classes de antibacterianos como macrolídeos, aminoglicolídeos, tetraciclina, lincosaminas e estreptograminas, além dos  $\beta$  - lactâmicos, diferenciando-se por quantidade de genes em sua estrutura genética, onde através da tipagem sequencial é possível analisar e correlacionar polimorfismos com a diminuição da sensibilidade aos fármacos. À vista disso uma bactéria quando adquire um *SSCmec*, poderá expressar diversos fenótipos de resistência a antibacterianos (MCCULLOCH et al., 2015; GUSHIKEN et al., 2016).

A semissintética penicilinase-resistente  $\beta$ -lactâmico ou simplesmente metilina, surgiu como alternativa para o tratamento de infecções por *S. aureus* em 1959, com o intuito de contornar a resistência a penicilina. Atualmente embora a metilina não seja mais produzida, o termo *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) ainda é utilizado para designar todas as bactérias *S. aureus* resistentes a  $\beta$ -lactâmicos, com exceção da última geração de cefalosporina (RODVOLD; MCCONEGHY, 2013; PEACOCK; PATERSON, 2015).

## **2.6 Terapêutica**

### **2.6.1 Tratamento convencional**

A resistência intrínseca a antibacterianos como oxacilina, nafticilina, carbapenêmicos, entre outros  $\beta$  lactâmicos, limitou a busca à fármacos alternativos, pertencentes a outras classes de antibacterianos a exemplo dos glicopeptídeos e oxazolidinonas, como a vancomicina e a linezolida respectivamente. A oxacilina, análogo a metilina é o antibacteriano atualmente referenciado, quando utilizado o termo em inglês MRSA ou SARM

em português. (CULOS; CANNON; GRIM, 2013; EVANGELISTA; OLIVEIRA, 2015; VANEPEREN; SEGRETI, 2016).

O MRSA continua sendo um dos patógenos do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*), com maior dificuldade de tratamento, apesar da ampla gama de antimicrobianos disponíveis na última década (RODVOLD; MCCONEGHY, 2013).

Definir a susceptibilidade em geral de cepas MRSA não é algo prático. Conforme Paterson; Harrison; Holmes, (2012) a presença de diferentes genes e SCCmec impõe um gama de possibilidades de combinações de genes que induzirão a resistência, variando assim a susceptibilidade de cepa para cepa.

Didaticamente a antibioticoterapia pode ser dividida entre novos e clássicos agentes. Clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX), doxiciclina, minociclina e tetraciclina são os fármacos clássicos utilizados usualmente para tratamento de MRSA na comunidade. Todavia tais fármacos, apresentam uma série de limitações na utilização clínica, seja por reações de hipersensibilidade, risco de coloração do esmalte dentário em crianças, ou por maior risco de resistência induzida, além das variações de patologias referentes ao *S. aureus*, implicando na escolha da terapia antimicrobiana (LIU et al., 2011; RODVOLD; MCCONEGHY, 2013).

Empiricamente, a vancomicina é bastante utilizada, constituindo a base da terapia parenteral ao longo de cinquenta anos em virtude da eficácia contra cepas resistentes e sensíveis à metilina. Entretanto, existe recomendações de organizações como a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), onde em casos de pacientes identificados com cepa sensível a metilina, mudem o tratamento para um  $\beta$  – lactâmico, como cefazolina ou oxacilina, em razão da demora na erradicação do *S. aureus* pela vancomicina (LIU et al., 2011; MCDANEL et al., 2015).

Embora a vancomicina tenha preferência de utilização, ela não é a única alternativa de tratamento para essa classe. Outra opção terapêutica é a teicoplanina, no qual é pouco lembrada e tem perfil de ação, assim como apresenta padrão de sensibilidade no TSA similar a vancomicina (PARADISI; CORTI; MESSERI, 2001). De maneira geral, essa classe atua na inibição da síntese de peptídeoglicano, entretanto, diferentemente de um  $\beta$  – lactâmico, a ligação para a quebra da parede é na Lipid II, proteína precursora presente na membrana e que atua na incorporação da parede celular a membrana (BLASKOVICH et al., 2018). Devido a supracitada longevidade dessa classe frente a MRSA, constantes implementos são introduzidos sinteticamente no intuito de produzir moléculas com menor grau de toxicidade e

maior eficácia. A exemplo da dalbavancina e a oritavancina, impondo maior sobrevida a essa classe de antibacterianos (BLASKOVICH et al., 2018).

Linezolida, daptomicina, tigeciclina, telavancina e ceftarolina, estão entre os fármacos mais recentes disponibilizados para tratamento de infecções por MRSA. A linezolida destaca-se devido a sua otimizada biodisponibilidade, sendo administrada da forma oral ou intravenosa, estabelecendo uma definitiva vantagem econômica quando administrada por via oral. Sua superior eficácia frente a vancomicina, foi evidenciado em estudos realizados por Weigelt et al., (2005) e Sharpe, Shively e Polk (2005) (ANSTEAD; CADENA; JAVERI, 2013).

Até o presente momento, na classe das oxazolidinonas, apenas Linezolida e tedizolida são utilizáveis. Onde o segundo fármaco quando comparado a linezolida, a apresenta CIM inferior e tempo de terapia mais curto. Independente da escolha as oxazolidinonas possuem diferenças em relação aos glicopeptídeos. O mecanismo de ação diferente, focado na quebra da síntese proteica bacteriana e não na parede celular e diferentemente da vancomicina por exemplo, ambos os fármacos das oxazolidinonas podem ser utilizadas via oral. (BLASKOVICH et al., 2018; HALL et al., 2018).

Posterior a aprovação da tedizolida em 2014, a delafloxacina foi recentemente aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2017 na forma oral e intravenosa, como o novo antibacteriano fluoroquinolona para controle de infecções bacterianas agudas da pele, incluindo ocasionadas por MRSA (SARAVOLATZ; STEIN, 2018). Entretanto, embora dentro do aporte de medicamentos anti-MRSA, as fluoroquinolonas a depender de sua geração, quando utilizadas empiricamente estão vinculadas ao maior risco de seleção de cepas MRSA como evidenciado em trabalhos de Weber et al., (2003) e Alseqely et al., (2021).

Na classe dos  $\beta$ -lactâmicos, a ceftarolina representa a quinta geração de cefalosporina. Sua eficácia a cepas resistentes a metilina é explicada pela alta afinidade do composto em relação a maioria das PBP, incluindo a PBP2a (FRAMPTON, 2013; ISNARD et al., 2018).

### **2.6.2 Reposicionamento de fármacos - Propafenona**

A dificuldade na aprovação de novos fármacos pela FDA, devido aos elevados custos, potencialmente alcançando US \$ 800 milhões ou ultrapassando US \$ 1 bilhão na pesquisa de novas drogas, que podem exigir entre 10 a 17 anos no confuso e burocrático processo de certificação do medicamento, despertou um renovado interesse ao redirecionamento de

fármacos já existentes, conforme refletido em estudos recentes. (RAJAMUTHIAH et al., 2015; THANGAMANI et al., 2015).

O redirecionamento de fármacos é uma alternativa terapêutica que apresenta diversas vantagens, incluindo evitar altos custos, reduzindo os gastos em quase 40%, dispensando em grande parte o trabalho pré-clínico e as fases iniciais de ensaios, especialmente a análise toxicológica e farmacológica dos medicamentos, evitando também o longo tempo no desenvolvimento de novos antimicrobianos, otimizado com a utilização de compostos com propriedades farmacêuticas já conhecidas (RANGEL-VEGA et al., 2015; THANGAMANI et al., 2015).

A propafenona (Figura 5) é um fármaco amplamente utilizado no tratamento de arritmia supraventricular e ventricular, com ação bloqueadora de canais de sódio e atividade fraca como  $\beta$ -adrenérgico. Como fármaco pertencente a classe dos antiarrítmicos 1c, com via administrativa intravenosa e oral, a propafenona possui ampla absorção na modalidade oral (90%), com tempo de meia vida entre 2 a 10 horas, atingindo concentração plasmática máxima entre 2 a 3 horas. A droga sofre extensa metabolização de primeira passagem, possuindo fraca biodisponibilidade (4 a 12%) e sua ligação as proteínas plasmáticas varia entre 77 a 89%. (HARRON; BROGDEN., 1987; CHEN et al., 2019; FARAG et al., 2019).

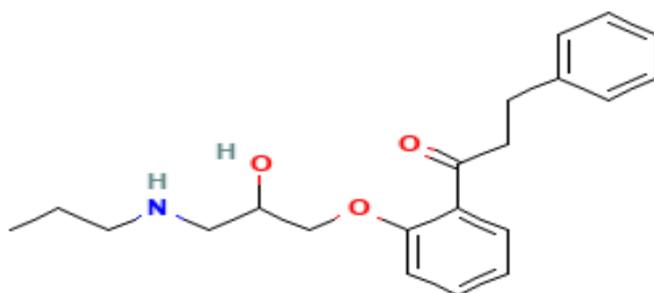
O perfil de toxicidade da propafenona é considerado brando, com raros casos de efeitos colaterais com o uso do fármaco em alta dosagem. A dosagem considerada alta é de 900 mg por dia e de baixa dosagem por 450 mg (HILL et al., 1986; BIFFI et al., 1999). A nível celular a propafenona não apresenta resultados citotóxicos em células epiteliais esofágicas, conforme verificado por Zheng et al., (2017). Utilizando a faixa de dosagem de 10 a 20 mg por kg, in vivo, em camundongos o fármaco não demonstrou indícios de toxicidade na concentração de 120 mg.

A existência de relatos na literatura demonstrando a ação antimicrobiana de drogas pertencentes a classe dos antiarrítmicos, posiciona a propafenona como possível candidato como evidenciado, em estudo coordenado por Kruszewska et al., (2021) envolvendo a ação antimicrobiana de diversos fármacos não-antibióticos, verificando a ação antimicrobiana da propafenona em microrganismos diversificados entre leveduras a bactérias.

Ao longo das últimas décadas, Cederlund e Mårdh (1993), Kruszewska et al., (2006), Thangamani et al., (2015) e Moraes; Ferreira-pereira (2019) apresentaram minuciosos trabalhos avaliando diversas classes de fármacos e a atividade antimicrobiana destas. Entretanto em nenhum destes trabalhos a propafenona demonstrou ser alvo dos estudos e a classe dos antiarrítmicos pouco foi explorada. Diante disso, o presente estudo elucida a

retomada da pesquisa com a classe dos antiarrítmicos como possíveis agentes antimicrobianos, evidenciando a propafenona como promissora candidata ao redirecionamento de fármacos.

Figura 5: Estrutura química da propafenona.



Fonte: Adaptado de Pubchem., (2022).

### 3 HIPÓTESES

3.1 Propafenona apresenta atividade antimicrobiana *in vitro*, frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

3.2 Propafenona apresenta atividade quando associado a oxacilina frente a cepas planctônicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina

3.3 Propafenona apresenta atividade antimicrobiana frente a biofilme maduro de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina.

3.4 Propafenona apresenta ação antibiofilme em biofilme em formação de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina.

3.5 Propafenona apresenta atividade antibacteriana quando associada a oxacilina em biofilme em formação e em biofilme formado de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina.

3.6 Propafenona danifica o DNA bacteriano e as estruturas de envoltório celular bacteriano.

3.7 Propafenona não apresenta indícios de citotoxicidade em células de mamíferos.

3.8 Propafenona não apresenta atividade antimicrobiana frente a MSSA e MRSA.

## 4. OBJETIVO

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antimicrobiano da propafenona frente cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) na forma planctônica e em biofilme.

### 4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Determinar Concentração Inibitória Mínima (CIM) da propafenona e da oxacilina.

4.2.2 Verificar a interação farmacológica da combinação entre oxacilina + propafenona em células planctônicas e em biofilme de *Staphylococcus aureus*.

4.2.3 Verificar alterações de viabilidade celular em biofilme maduro de *Staphylococcus aureus* desencadeada pela propafenona isolada e em associação com a oxacilina.

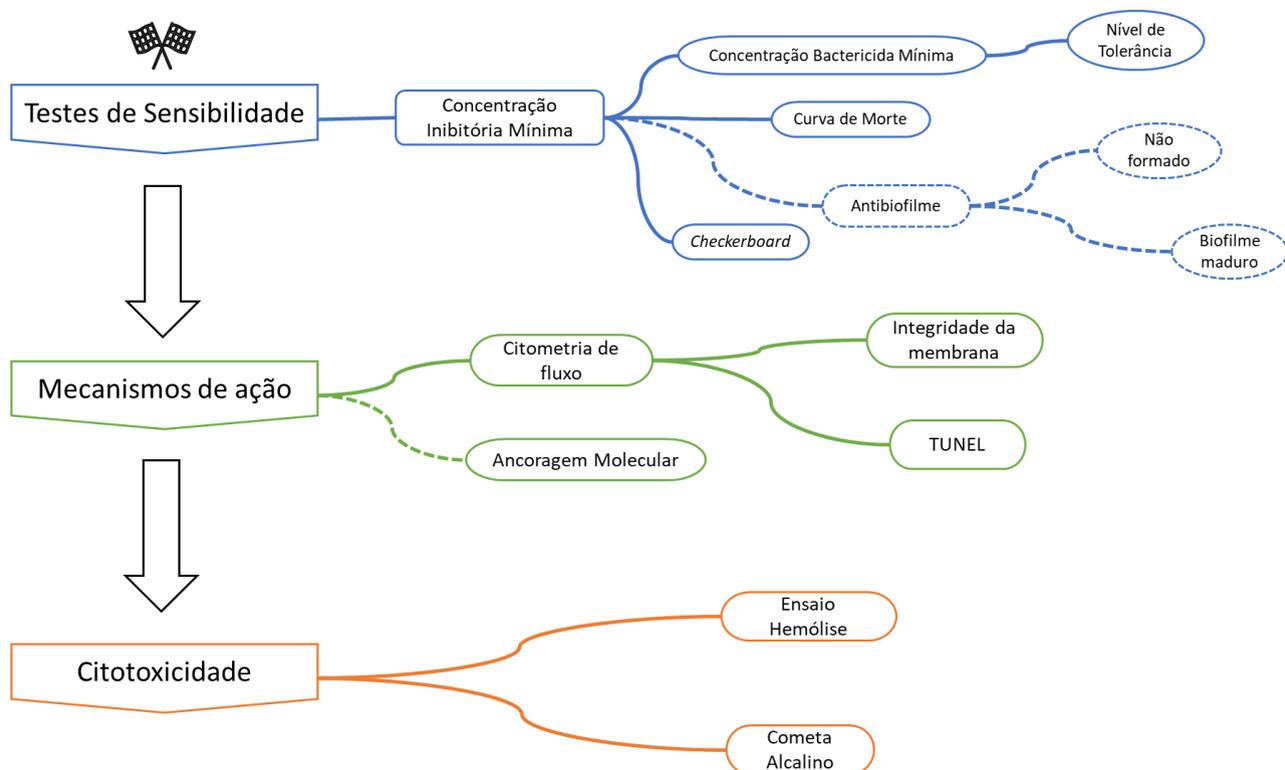
4.2.4 Avaliar o efeito antibiofilme em *Staphylococcus aureus* da propafenona isolada e em associação com a oxacilina.

4.2.5 Avaliar o possível mecanismo de ação da propafenona frente a cepas de MRSA.

4.2.6 Avaliar o possível efeito citotóxico da propafenona em células de mamíferos.

## 5 METODOLOGIA

Figura 6: Fluxograma das metodologias empregadas no estudo.



Fonte: Autoria própria

### 5.1 Microrganismos e Drogas

Este estudo experimental utilizou um total de 14 cepas, divididas em cepas clínicas de MRSA (7), cepas sensíveis (5) e cepas ATCC® (2) (MRSA 65398TM e *S. aureus* 6538P). Os isolados clínicos provem de variados sítios de coleta, como sangue, líquido pleural, ponta de cateter, secreção de abscesso e secreção ocular. Todas as cepas pertencem à bacterioteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Todo o procedimento foi realizado sob normas de biossegurança nível 2.

As drogas utilizadas foram a propafenona (PROP), vancomicina (VAN) e a oxacilina (OXA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). A PROP foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) a 2,5% em todos os ensaios. Já a OXA e a VAN em água destilada.

## 5.2 Testes de Sensibilidade

### 5.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibacterianos

A determinação da CIM seguiu diretrizes do protocolo M7-A9 (CLSI, 2012) para Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) por microdiluição em caldo para bactérias aeróbicas. A PROP a foi avaliada na faixa de concentração de 1.95-1000  $\mu\text{g/mL}$ ; a VAN foi utilizado como controle positivo, na faixa de 0.03-16  $\mu\text{g/mL}$  e a OXA na faixa de concentração de 0.125-512  $\mu\text{g/mL}$ . Os inóculos foram preparados na escala de 0,5 MacFarland, posteriormente diluídos em Caldo Mueller Hinton Cátion ajustado (CaMHB) para a celularidade de  $10^5$ . Os 96 poços das microplacas foram incubadas a  $35^\circ\text{C}$  por 24h em meio CaMHB. A CIM foi definida como a menor concentração de droga capaz de inibir 99% do crescimento microbiano. O controle negativo foi definido apenas com o meio de cultura sem o inóculo e o controle positivo, o meio de cultura com o inóculo. Todos os testes foram feitos em triplicata, em dias alternados.

### 5.2.2 Interação farmacológica entre propafenona e oxacilina

Por intermédio da técnica de *checkerboard*, cada poço conteve uma combinação única de diferentes concentrações dos fármacos testados (PROP + OXA), mediante as CIM obtidas anteriormente no TSA. A interação entre os fármacos foi avaliada a partir da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) o qual é obtido pela soma da Concentração Inibitória Fracionária (CIF) de cada fármaco, que se trata da relação entre a CIM de cada fármaco utilizado em combinação e a CIM do mesmo fármaco utilizado sozinho (ODDS, 2003).

Os testes de sensibilidade *in vitro* foram realizados em triplicata em diferentes dias. Logo, as médias geométricas foram utilizadas estatisticamente para comparar os resultados da CIM. Para o sinergismo, a interação entre as drogas foi classificada como sinérgica (ICIF)  $<0,5$ , indiferente (IND) ( $0,5 < \text{ICIF} \leq 4,0$ ), ou antagônica (ANT) ( $\text{ICIF} > 4,0$ ) (ODDS, 2003; JI et al., 2013).

$$\text{ICIF} = \text{CIF(A)} + \text{CIF(B)}$$

Onde:  $\text{CIF(A)} = \text{CIM fármaco A em combinação} / \text{CIM fármaco A isoladamente}$

$\text{CIF(B)} = \text{CIM fármaco B combinação} / \text{CIM fármaco B isoladamente}$

### 5.2.3 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima foi definida conforme adaptação a metodologias já empregada por, Das et al., (2016) e Neto et al., (2019). Após a realização do TSA, foi retirada uma alíquota de 10 µL das suspensões presentes na microplaca na qual os poços não apresentaram turvação. As concentrações presentes nos poços variaram entre 250-2000 µg/mL. As alíquotas foram despejadas no centro das placas de ágar Mueller Hinton e inoculadas a 35°C por 24h. No dia posterior foram observados vestígios de crescimento bacteriano na placa e valorado qual a menor concentração da PROP requerida para a completa morte bacteriana.

### 5.2.4 Nível de Tolerância

O Nível de Tolerância foi definido conforme metodologia descrita por Das et al., (2016) pelo valor da CBM dividido pela CIM obtido no TSA. Valores da razão entre CBM/CIM,  $\geq 16$  são definidas por ação bacteriostática na cepa e valores inferiores à média de  $\leq 4$  são descritas com ação bactericida referente a cepa observada.

### 5.2.5 Curva de Morte

A Curva de Morte foi baseado nas metodologias já descritas por Petersen; Jones; Bradford, (2007), Haste et al., (2011) e Rand; Houck (2004) com adaptações. Para determinar a cinética de morte bacteriana, foi utilizado uma cepa representativa (MRSA 1) em intervalos de tempo estabelecidos (0, 1, 2, 4, 8 e 24 horas), com as drogas elencadas (OXA, VAN e PROP) nas seguintes concentrações. A PROP foi testada nos valores de 250 e 500 µg/mL, a OXA em 16 µg/mL e a VAN em 1 µg/mL.

A cepa foi incubada em CaMHB por 24 horas a 35°C. Posteriormente foi preparado um inóculo na escala de 0,5 McFarland ( $10^8$  CFU/mL) e diluído para a celularidade aproximada entre  $10^5$  -  $10^6$  CFU/mL.

A cada intervalo de tempo, foi retirado uma alíquota de 10 µL de cada um dos tubos contendo as drogas e o tubo controle sem adição de fármaco, sendo seguidamente transferidos as alíquotas para as respectivas placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton e realizado o semeio do tipo *spread plate*. Em seguida as placas foram incubadas por 24 horas a 35°C e no dia seguinte foi realizado a contagem de unidades formadoras de colônias (CFU).

O ensaio foi feito em triplicata e a análise dos dados foi realizada de acordo com Rand; Houck (2004). A atividade bactericida ou bacteriostática foi definida de acordo com

seguinte critério: A diminuição de CFU entre 4 a 24 horas  $\geq 10^3$  demonstra efeito bactericida; já uma redução de CFU  $\leq 10^3$  demonstra ação bacteriostática em relação ao inóculo inicial.

### 5.2.6 Atividade Anti-biofilme

A formação do biofilme foi realizada utilizando placas de microtitulação de 96 poços com fundo chato, baseada nas metodologias descritas por Schillaci et al., (2008) e Av sá et al., (2020) com algumas modificações. As duas melhores cepas formadoras de biofilme de MRSA foram escolhidas para a formação do biofilme de 24 horas em caldo Mueller Hinton adicionado de Cations (CaMHB). A propafenona foi testada nas concentrações referentes a CIM, CIMx2 e duas concentrações subinibitórias: 250; 500; 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. A VAN foi testada em concentração referente a CIM (1  $\mu\text{g/mL}$ ) e a OXA foi utilizada em valores da CIM (16 e 256  $\mu\text{g/mL}$ ) e em concentrações subinibitórias (8 e 128  $\mu\text{g/mL}$ ). O controle positivo foi definido como o inóculo adicionado ao meio e o controle negativo foi determinado apenas com o meio sem adição do inóculo.

Na primeira etapa para avaliação da atividade das drogas em biofilme formado, as cepas selecionadas foram anteriormente cultivadas em *Tryptic Soy Broth* (TSB), (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 24 horas a 35°C. Posteriormente as cepas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS (Tampão fosfato salino) e posteriormente foi realizada a diluição do inóculo na concentração 1.0 da escala de Macfarland ( $3 \times 10^8$ ) em CaMHB para serem distribuída nos poços (200 c) da microplaca e incubada por 24 horas a 35° C conforme descrição de Schillaci et al., (2008). No dia posterior, os poços foram lavados e foi adicionada as drogas (200  $\mu\text{L}$ ) nos poços anteriormente contendo o inóculo. No dia posterior, a droga foi retirada dos poços e a atividade metabólica do biofilme foi avaliada por ensaio colorimétrico mediado pela solução 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT; 1 mg mL<sup>-1</sup>) aplicado 150  $\mu\text{L}$  em cada poço e incubada a placa a *overnight* em 35°C. Posteriormente o MTT foi retirado dos poços e lavados com DMSO P.A por 10 minutos e o conteúdo presente nos poços foram transferidos (100  $\mu\text{L}$ ) para outra placa estéril. Em seguida a placa estéril que recebeu foram lidas no espectro de onda na densidade óptica (DO) de 490 nm em espectrofotômetro.

Em relação a inibição da formação do biofilme, a diferença metodológica consiste na adição das drogas aos poços (100  $\mu\text{L}$ ) conjuntamente ao inóculo bacteriano em CaMHB. Após 24 horas de formação do biofilme as demais etapas metodológicas são semelhantes a descrita para o biofilme maduro (24 horas).

### 5.2.7 *Análise estatística dos testes de sensibilidade*

Os dados obtidos foram analisados a partir da média  $\pm$  E.P.M (Erro Padrão da Média) de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados serão comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguidos pelos testes de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## 5.3 **Testes realizados por citometria de fluxo**

### 5.3.1 *Preparo das suspensões*

A fim de entender os mecanismos de ação da PROP, foram realizadas análises por intermédio da citometria de fluxo com o intuito de avaliar a integridade da membrana bacteriana e o dano do fármaco ao DNA. Uma única cepa, a MRSA 1 foi escolhida devido a homogeneidade dos valores obtidos da CIM.

As suspensões celulares foram preparadas a partir de culturas em fase de crescimento exponencial, incubadas em *Brain Heart Infusion broth* (BHI) a 35 °C por 20h. As células foram colhidas, centrifugadas (1600 g por 10 min a 4°C) e lavadas duas vezes com uma solução salina 0.85% (1200g por 5 min a 4°C), e então ressuspensas ( $\sim 10^6$  células/mL) com tampão HEPES (N-(2-hidroxietil)piperazinaN'-(2-acido etanosulfônico) (Sigma Chemical Co.) suplementado com glicose 2%, pH 7.2. As suspensões celulares foram submetidas a tratamento com OXA (CIM e CIMx2), PROP (CIM e CIMx2) e a associação entre OXA com PROP (CIM de ambas). A vancomicina (CIMx3) foi utilizada como parâmetro comparativo com as drogas alvos do estudo (OXA e PROP).

Ambos os experimentos foram realizados em duplicata, em dias alternados (AV SÀ et al., 2020).

### 5.3.2 *Avaliação da integridade da membrana*

A integridade de membrana e a morfologia celular foram avaliadas pelo método de exclusão com iodeto de propídio (2  $\mu$ g/mL). A fluorescência celular foi determinada pelo citômetro de fluxo *FACS Calibu Flow Cytometer* (Becton Dickinson, San José, CA, USA) e o

software *CytoSoft* 4.1. Um total de 10,000 eventos foram elucidados por análise ( $n = 2$ ) e os detritos celulares foram omitidos (NETO et al., 2014).

### 5.3.3 *Análise de dano ao DNA*

Por intermédio do The terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL), foi possível analisar o dano ao DNA ocasionado pelas drogas testes.

Primeiramente as células foram tratadas e fixadas com paraformaldeído a 7%. Em seguida as células fixadas submetidas ao composto Triton X-100 a 1% em gelo por 10 minutos e posteriormente incubadas com o TUNEL por 1h a 37° C. Por último, para determinar a porcentagem de células positivas, duzentas células foram contadas em microscópio de fluorescência em análise do tipo duplo cega (Olympus, Tokio, Japão) (DWYER et al., 2012; BATISTA DE ANDRADE NETO et al., 2019).

## 5.4 *Análise de dano ao DNA por intermédio do Cometa Alcalino*

O ensaio do cometa alcalino foi realizado conforme Cavalcanti et al., (2020). Após tratamento com PROP por 12 horas, as células comerciais do tipo fibroblasto de murino – L929 foram lavadas em PBS resfriadas, tripsinizadas e ressuspensas no meio CaMHB. Uma alíquota da suspensão celular ( $0,7 \times 10^5$  células/mL) foi aplicada em agarose em baixo ponto de fusão a 0,75% e instantaneamente espalhada em lâmina de vidro do microscópio já previamente contendo uma camada de agarose no ponto de fusão normal a 1%. Em “Lysis” solução gelada (2.5M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, e 10% DMSO, pH 10.0) a 4° C por 1 hora.

Na etapa contínua, as lâminas foram retiradas da solução de *Lysis* e enxaguadas três vezes com “enzyme buffer” (40 mM Hepes, 100 mM KCL, 0.5 Mm Na<sub>2</sub>EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0), e incubadas com formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) por 30 minutos a 37°C. Após incubação, as lâminas foram ajustadas a unidade de eletroforese horizontal e incubadas com solução *fresh buffer* (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13.0) a 4° C por 20 minutos. A condução utilizada foi a 25V (94 V/cm). Todas as etapas anteriormente descritas foram conduzidas utilizando luz amarela ou no escuro no intuito de evitar exposição adicional de dano ao DNA. As lâminas foram neutralizadas (0.4 M Tris, pH 7.5) e coradas com prata de acordo com a metodologia descrita por Nadin; Vargas-Roig; Ciocca, (2001). A seguir os géis foram deixados para descansar em temperatura ambiente em *overnight* e

posteriormente analisados em microscópio óptico. O *Methyl methanesulphonate* (MMT) serviu como controle positivo para a reação de fragmentação do DNA e o DMSO a 2,5% foi utilizado como controle negativo, indicativo integridade do DNA.

Todo o experimento foi realizado em duplicata e um total de 100 células foram selecionadas, codificadas e analisadas de forma duplo cego para a migração de DNA.

## 5.5 Ensaio Hemólise

Conforme metodologia descrita por Cavalcanti et al., (2020) o ensaio foi adaptado e replicado em placa de 96 poços com cada poço contendo 50  $\mu$ L de NaCl a 0,85% contendo 10mM de  $\text{CaCl}_2$ . O primeiro poço conteve DMSO a 2,5% funcionando como controle negativo, o último poço recebeu 50  $\mu$ L do composto Triton-X a 0,2% ocasionando a hemólise por completo das células e atuando como controle positivo do teste. O segundo poço recebeu a mistura de 50  $\mu$ L da droga teste com 50  $\mu$ L de DMSO a 2,5%, onde posteriormente sofreu diluição seriada até o décimo primeiro poço. A concentração inicial foi definida em 500  $\mu$ g/mL. Todos os poços receberam 100  $\mu$ L de suspensão de eritrócitos de camundongos a 2% em salina contendo 10 mM  $\text{CaCl}_2$ .

Por fim, a placa foi incubada a 25° C por 1 hora e posteriormente centrifugada, onde o sobrenadante foi realocado para outra placa e a presença de hemoglobina foi mensurada através do leitor de placas com densidade óptica na faixa de 540 nm. Os ensaios foram feitos em duplicata em dias alternados.

## 5.6 Ancoragem Molecular

A estrutura química da PROP (CID4932) foi selecionada no repositório Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), otimizada em pH fisiológico a partir do protocolo de minimização de energia Akdemir et al., (2019) utilizando algoritmo steepest descente com ciclos de 50 interações e campo de força MMFF94 (Merck Molecular Force Field 94) (MOLECULAR; FIELD; HALGREN, 2000) estabelecidos nos códigos Marvin Sketch (2019) e Hanwell et al., (2012). As enzimas foram obtidas no banco de dados de proteínas *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>), PDBs IDs: 2W9G, 2XCT, 5BS3, 453D e 3ZFZ.

### 5.6.1 *Preparação dos Alvos*

#### 5.6.1.1 *Sítios alvos do S. aureus*

Foram preparados quatro alvos de DNA e um de parede celular. O alvo DHFR (*dihydrofolate reductase*) é um alvo essencial na conversão do ácido e redução do THF (tetrahydro-folic acid), essencial na cadeia de síntese do DNA (EL-SHERSHABY et al., 2021). Em *S. aureus wild-type*, o inibidor co-cristalizado e as moléculas de água foram removidos, o NADPH foi mantido na enzima por ser um cofator necessário para a catálise (HEASLET et al., 2009; EL-SHERSHABY et al., 2021).

A DNA girase, enzima crucial no processo de transcriptação e replicação, foi complexada ao DNA de *S. aureus* e teve o seu inibidor co-cristalizado removido e os íons de Mn foram mantidos na enzima DNA girasse (EL-SHERSHABY et al., 2021). De maneira similar ao DNA complexado a girase, a enzima não complexada também teve removidas o seu inibidor co-cristalizado, os íons sulfato e as moléculas de água, os íons de Mn foram mantidos na DNA girase.

A DNA (5'-D(\*CP\*GP\*CP\*GP\*AP\*AP\*TP\*TP\*CP\*GP\*CP\*G)-3') teve todos os seus resíduos removidos da enzima.

Para a Acyl-PBP2a da MRSA foram removidas as moléculas de água e o inibidor co-cristalizado (AI8) da enzima. Os íons de Cl, de Cd e o ácido murâmico foram mantidos. O antibacteriano anti-MRSA  $\beta$ -lactâmico (1W8) também foi mantido na enzima por sua capacidade de estimular a abertura alostérica do sítio ativo (OTERO et al., 2013).

Os hidrogênios polares foram adicionados em todas as enzimas alvo.

### 5.6.2 *Docagem Molecular*

As rotinas de simulação foram realizadas utilizando o *Lamarckian Genetic algorithm*. Todas as simulações foram realizadas utilizando o *multithreading* de 3 vias e espaço grid box delimitado para cada alvo (Tabela 1) Os códigos utilizados foram o UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004) e AutodockTools (ADT, 2013).

Tabela 1: Parâmetros usados em simulações da ancoragem molecular.

Parâmetros <i>grid box</i>	DNA				Parede Celular
	Wild-type <i>S. aureus</i> DHFR	<i>S. aureus</i> girase complexada com DNA	<i>S. aureus</i> girase	DNA (5'- D(*CP*GP*CP*G P*AP*AP*TP*TP* CP*GP*CP*G)-3')	Acyl-PBP2a da MRSA
<i>center_x</i>	-4.854	17.747	-2.314	14.674	1.716
<i>center_y</i>	-27.055	37.969	-28.737	21.536	38.268
<i>center_z</i>	4.446	24.799	-27.418	9.84	44.556
<i>size_x</i>	90	126	126	52	116
<i>size_y</i>	90	126	126	52	84
<i>size_z</i>	86	126	126	86	126
<i>spacing</i>	0.553	1.000	0.831	0.519	1.000
<i>exhaustiveness</i>	50	50	50	50	50

Fonte: Autoria própria

Foram realizadas 50 simulações independentes, configurados para a obtenção de 20 poses por simulação. Foram selecionadas 16 simulações independentes para validação dos resultados. As simulações de encaixe foram realizadas no código AutoDock Vina (versão 1.1.2) (TROTT; OLSON, 2009), as renderizações 2d e 3d geradas utilizando os visualizadores Discovery Studio Visualizer (Biovia, 2019) e UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004).

### 5.6.3 Critérios de Seleção e validação

Como critério de triagem foram selecionadas as simulações que apresentaram energia livre de ligação igual ou inferior a -6.0 kcal/mol e RMSD (*Root Mean Square Deviation*) até 2.0 Å, (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014; YUSUF et al., 2008).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Testes de sensibilidade

#### **6.1.1 Atividade antibacteriana da propafenona isolada e em combinação com a oxacilina**

A PROP apresentou atividade antibacteriana na faixa de 250 µg/mL a 500 µg/mL em todas as 14 cepas testadas. Em 13 cepas o valor da CIM foi de 250 µg/mL e uma única cepa apresentou CIM de 500 µg/mL. Ademais os valores de CIM pertinentes a VAN e a OXA variaram entre 0,5 a 2 µg/mL e 0,25 a 512 µg/mL respectivamente. VAN teve seu uso como controle positivo das cepas (Tabela 2).

A PROP apresentou interação farmacológica do tipo sinérgica com a OXA em 85,7% das cepas de MRSA testadas, com redução da CIM em até 96,9% (32 vezes) conforme verificado na Tabela 3.

#### **6.1.2 Determinação da CBM e nível de tolerância da propafenona.**

A concentração bactericida mínima da PROP variou entre 250 e 500 µg/mL. O nível de tolerância não ultrapassou o valor de 2, definindo a droga com efeito bactericida (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração inibitória mínima da oxacilina (OXA), vancomicina (VAN), propafenona (PROP) e determinação do nível de tolerância à propafenona contra *S. aureus*.

Cepas♥	CIM (µg/ml)♦					
	Droga			Nível de Tolerância		
	PROP	OXA	VAN	CBM	CBM/CIM♣	Interpretação
MRSA 1♠	250	16	1	250	1	Bactericida
MRSA 2	500	128	1	500	1	Bactericida
MRSA 3	250	256	1	500	2	Bactericida
MRSA 4	250	256	1	250	1	Bactericida
MRSA 5	250	37,3	2	500	2	Bactericida
MRSA 6	250	64	0,5	250	1	Bactericida
MRSA 7	250	512	0,5	250	1	Bactericida
MRSA ATCC 65398	250	8	2	500	2	Bactericida
<i>S. Aureus</i> ATCC 6538p	250	0,25	0,5	250	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 1	250	0,5	0,5	250	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 2	250	0,5	0,5	500	2	Bactericida
<i>S. aureus</i> 3	250	0,5	1	250	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 4	250	0,25	0,5	500	2	Bactericida
<i>S. aureus</i> 5	250	0,25	0,5	250	1	Bactericida

♥Cepas de *Staphylococcus aureus* da bacterioteca.

♠ Cepa selecionada para os testes que utilizam citometria de fluxo.

♣ Média do CBM/CIM  $\geq 16$  (bacteriostático);  $\leq 4$  (bactericida).

♦ CIM requerido para inibição completa do crescimento (99%) das bactérias após incubação de 20 h.

PROP: Propafenona; OXA: Oxacilina; VAN: Vancomicina; CBM: Concentração bactericida mínima; CIM: Concentração inibitória mínima.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3: Concentração inibitória mínima da oxacilina (OXA), vancomicina (VAN), propafenona (PROP) e sinergismo entre OXA-PROP contra cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA).

Cepas♥	CIM (µg/ml)♦						
	Sozinha♣			Combinada♣‡			
	PROP	OXA	VAN	PROP	OXA	FICI‡‡	Interpretação
MRSA 1♣	250	16	1	31,25	2	0,25	Sinergismo
MRSA 2	500	128	1	125	32	0,5	Sinergismo
MRSA 3	250	256	1	62,5	64	0,5	Sinergismo
MRSA 4	250	256	1	62,5	64	0,5	Sinergismo
MRSA 5	250	37,3	2	7,81	1,16	0,06	Sinergismo
MRSA 6	250	64	0,5	31,25	8	0,25	Sinergismo
MRSA 7	250	512	0,5	62,5	128	0,5	Sinergismo
MRSA ATCC 65398	250	8	2	250	8	2	Indiferente

♥Cepas de MRSA da bacterioteca.

♣Cepa selecionada para os testes que utilizam citometria de fluxo.

♣ A microdiluição em caldo foi feita de acordo com o CLSI, protocolo M07-A9 para drogas isoladas.

♦ CIM requerido para inibição completa do crescimento (99%) das bactérias após incubação de 20 h..

‡ Combinação da propafenona com a oxacilina..

‡‡ Índice de concentração inibitória fracionária.

PROP: Propafenona; OXA: Oxacilina; VAN: Vancomicina; CIM: Concentração inibitória mínima.

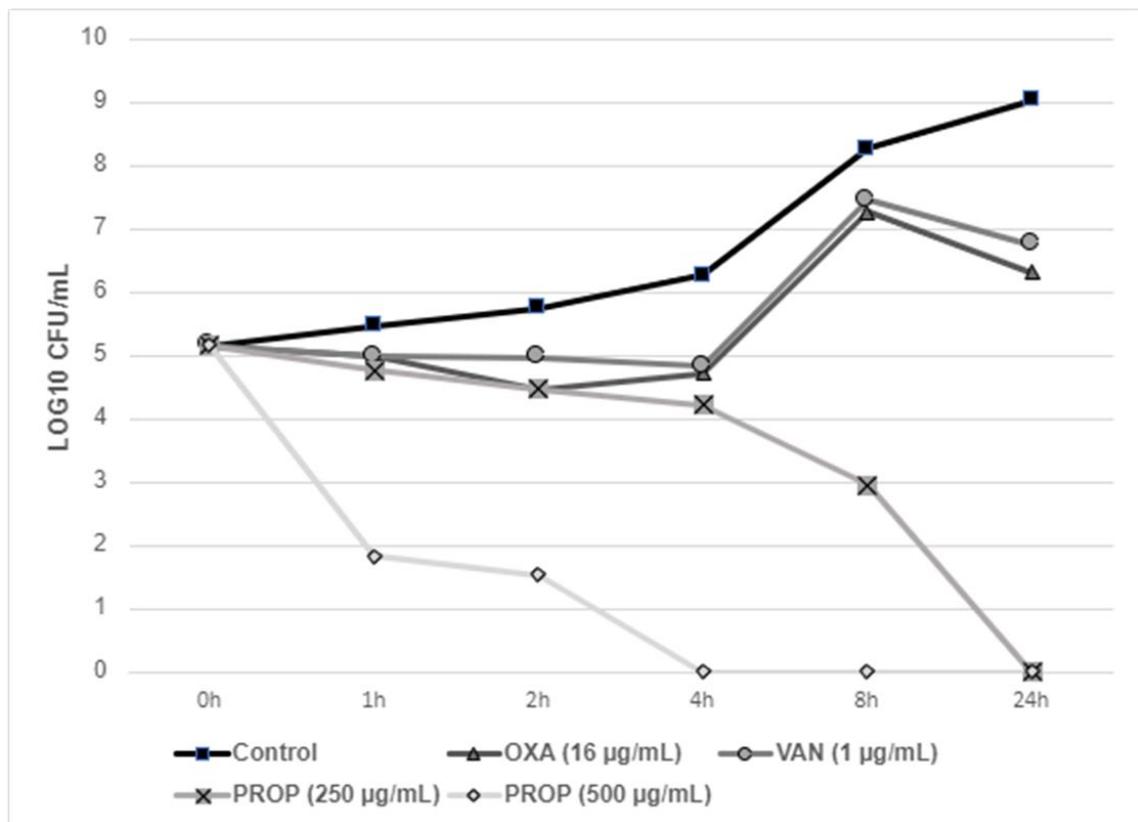
Fonte: Autoria própria.

### 6.1.3 Cinética de morte bacteriana

A trajetória cinética dos fármacos nos valores da CIM da VAN e da OXA foram semelhantes. Ambas apresentaram efeito bacteriostático em relação ao inóculo inicial.

A PROP mostrou-se como o único fármaco com ação bactericida em relação a inóculo inicial nas concentrações de 250 a 500 µg/mL, ambos os valores levando a aniquilação da bactéria em 24 horas, e o segundo valor em menos de 12 horas (Figura 7).

Figura 7: Cinética de morte bacteriana mostrando a atividade da oxacilina (OXA), vancomicina (VAN) e propafenona (PROP) contra a cepa clínica de MRSA.



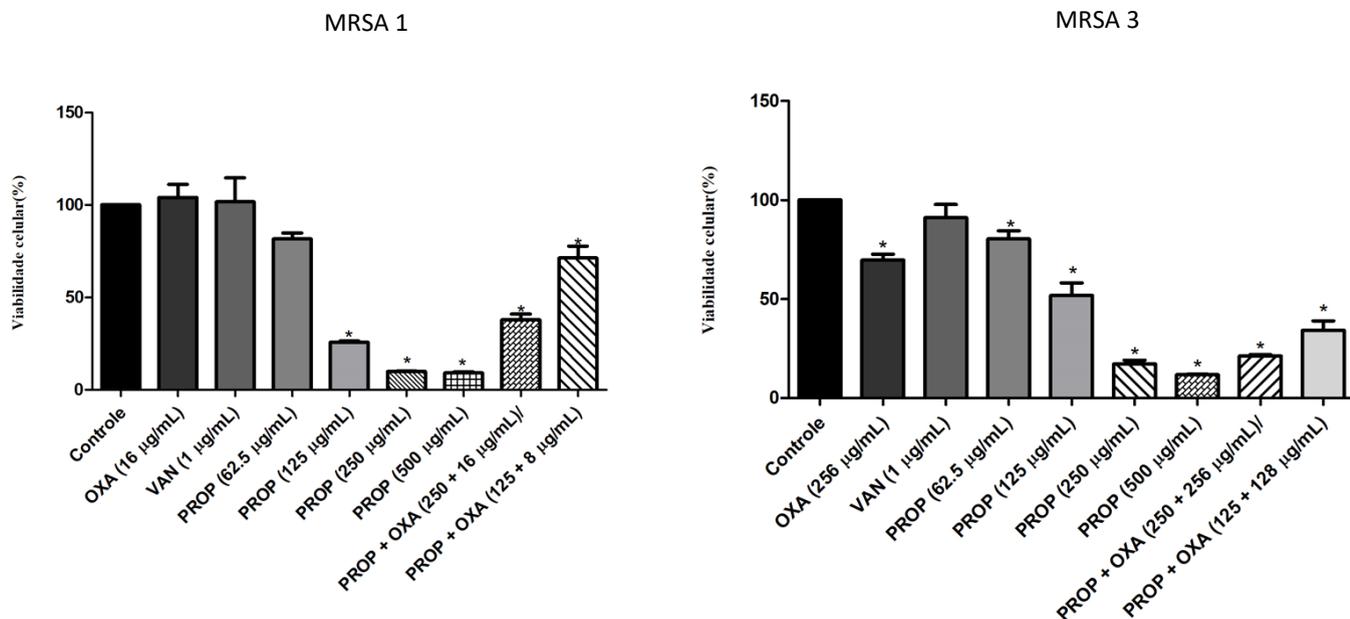
Fonte: Autoria própria.

#### 6.1.4 Redução do biofilme maduro por intermédio da propafenona isolada e em associação a oxacilina

De acordo com a Figura 8, foi constatado uma redução na viabilidade celular de biofilmes maduros quando em contato com as substâncias utilizadas no estudo. A PROP isoladamente foi eficaz reduzindo em 48,25% da viabilidade celular a partir de 125 µg/mL na MRSA 3 e em 74,3% na MRSA 1 quando comparado ao grupo controle. Não houve significância ( $P < 0.05$ ) entre a redução do biofilme ocasionada pelos valores: 250 µg e 500 µg, entretanto em ambas as situações a redução da viabilidade celular aconteceu em valores de 90,1% na cepa MRSA 1 e de 82,72% na MRSA 3 para a concentração de 250 µg. Em 500 µg, a redução na MRSA 1 foi de 91% e a cepa MRSA 3 foi reduzida em 88,2%.

A redução da viabilidade celular observada na interação entre o PROP e a OXA, obteve valor mínimo de 65,78% em concentrações subinibitórias conjuntas na cepa MRSA 3. A OXA e a VAN em valores referentes as suas respectivas CIM's não apresentaram significativa redução do biofilme em 24 horas.

Figura 8: Atividade da propafenona contra biofilme de MRSA avaliada pelo ensaio de redução de MTT



Fonte: Autoria própria.

\* $p < 0.05$  Comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

ANOVA: Análise da variância; PROP: Propafenona; OXA: Oxacilina; VAN: Vancomicina.

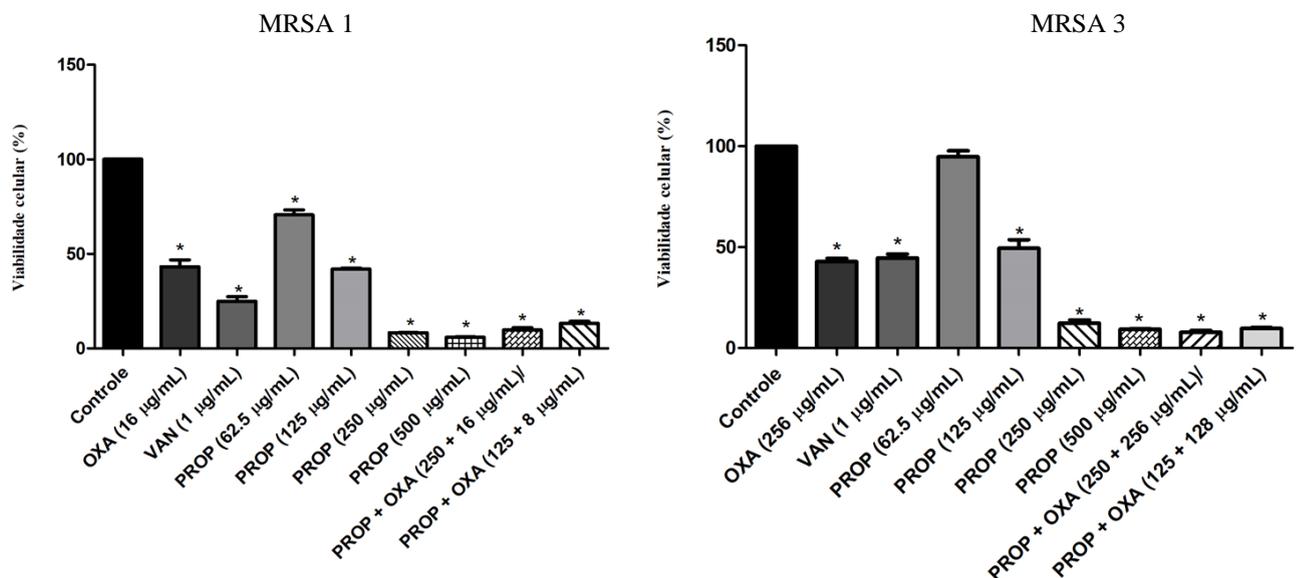
### 6.1.5 Ação antibiofilme da propafenona isolada e em combinação com a oxacilina

A PROP agiu inibindo em formação do biofilme em no mínimo 30% da viabilidade celular na cepa MRSA 1 no menor valor utilizado da droga (62.5 µg), apresentando inibição considerável ( $P < 0.05$ ) em qualquer dos valores testados (62.5, 125 e 250 µg) em relação ao controle da cepa MRSA 1. Na cepa MRSA 3 a menor quantidade de droga necessária para reduzir significativamente a formação do biofilme foi de 125 µg, levando a redução de 50,6% da viabilidade celular. A maior inibição do biofilme aconteceu em concentrações equivalentes a 500 µg, levando a uma redução de viabilidade celular de 94,1% na cepa MRSA 1 e 90,8% na cepa MRSA 3 conforme observado na Figura 9.

A utilização conjunta da PROP + OXA também se mostrou estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) em ambos os valores combinados na MRSA 1 (250 + 16 µg/mL e 125 + 8 µg/mL, respectivamente) e na MRSA 3 (250 + 256 µg/mL e 125 + 128 µg/mL, respectivamente). A OXA apresentou semelhante percentual de inibição da formação de biofilme com redução da viabilidade celular em 56,7% e 57,2% para as respectivas cepas

MRSA 1 e MRSA 3. A VAN inibiu a formação do biofilme, reduzindo a viabilidade celular em 75% e 55,5% nas cepas MRSA 1 e MRSA 3 respectivamente (Figura 9).

Figura 9: Atividade anti-biofilme da propafenona frente a MRSA avaliada pelo ensaio de redução de MTT.



Fonte: Autoria própria.

\* $p < 0.05$  Comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

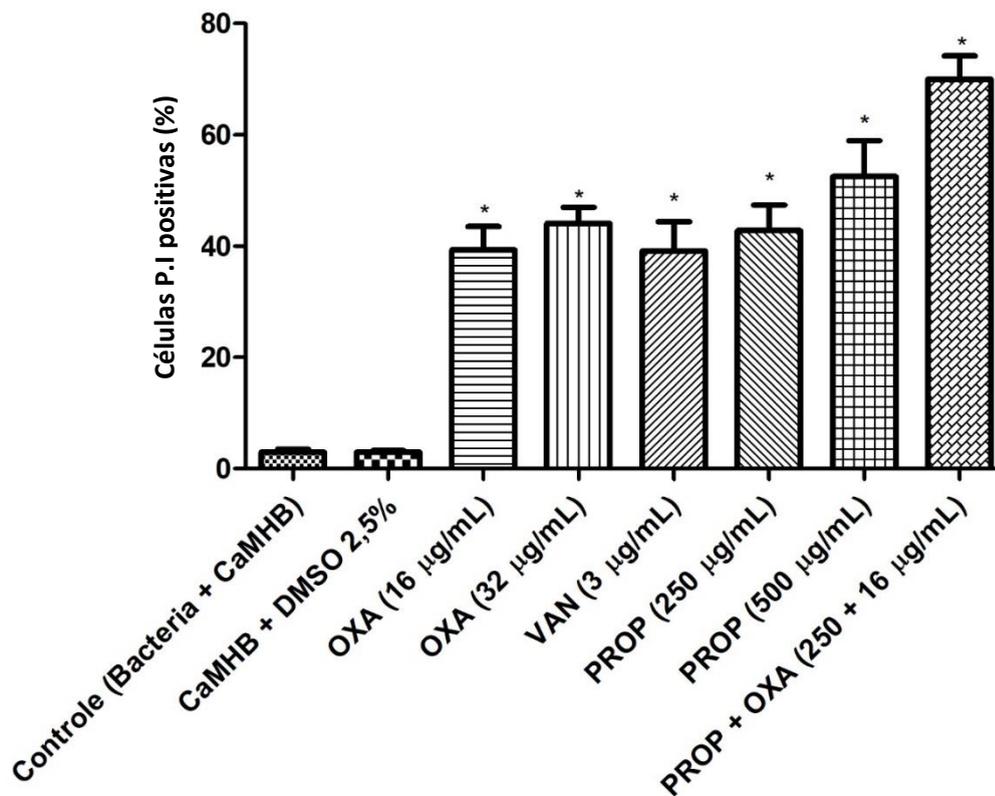
ANOVA: Análise da variância; PROP: Propafenona; OXA: Oxacilina; VAN: Vancomicina.

## 6.2 Citometria de fluxo

### 6.2.1 Permeabilidade da membrana

Conforme a Figura 10, todas as concentrações testadas apresentaram valor estatístico significativo em relação ao controle. A OXA em 16 µg/mL e 32 µg/mL demonstrou valores em porcentagem de 39,3% e 44,1% de citotoxicidade. A VAN em 3 µg/mL obteve 39,1% de citotoxicidade na membrana. A PROP isoladamente apresentou citotoxicidade na membrana em valores: 42,8% e 52,5% para 250 µg/mL e 500 µg/mL respectivamente. Já em associação, a PROP + OXA apresentou acentuada diferença estatística ( $P < 0.05$ ) na viabilidade celular em relação a todas as demais drogas isoladas e ao controle, com o valor de 70% de citotoxicidade. O controle do meio adicionado do solvente DMSO a 2,5% não demonstrou nenhum valor estatisticamente significativo.

Figura 10: Efeito citotóxico de drogas na membrana bacteriana, em uma cepa representativa de MRSA avaliada por citometria de fluxo.



Fonte: Autoria própria.

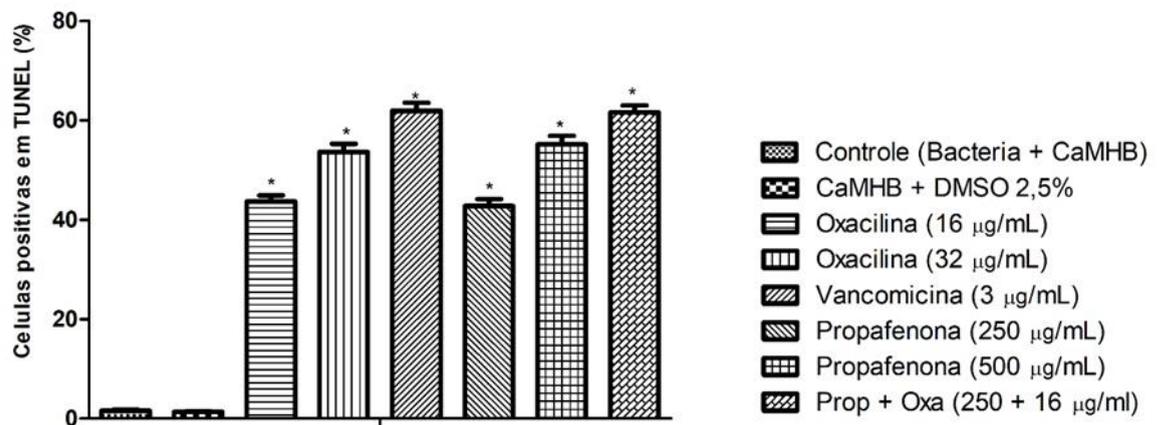
\* $p < 0.05$  Comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

ANOVA: Análise da variância; PROP: Propafenona; Control: Caldo Mueller-Hinton Cation Ajustado; OXA: Oxacilina; VAN: Vancomicina.

### 6.2.2 Análise do dano ao DNA através do TUNEL

Conforme Figura 11, todas as concentrações testadas causaram danos ao DNA bacteriano de forma significativa quando comparadas com o controle. O dano ao DNA mensurada por reação positiva de TUNEL ocasionada pela combinação de PROP + OXA foi de 61,5%, não apresentando diferença estatística significativa quando comparada ao controle positivo (VAN) com 61,9%.

Figura 11: Dano ao DNA de uma cepa representativa de MRSA avaliadas por citometria de fluxo, via teste TUNEL.



Fonte: Autoria própria.

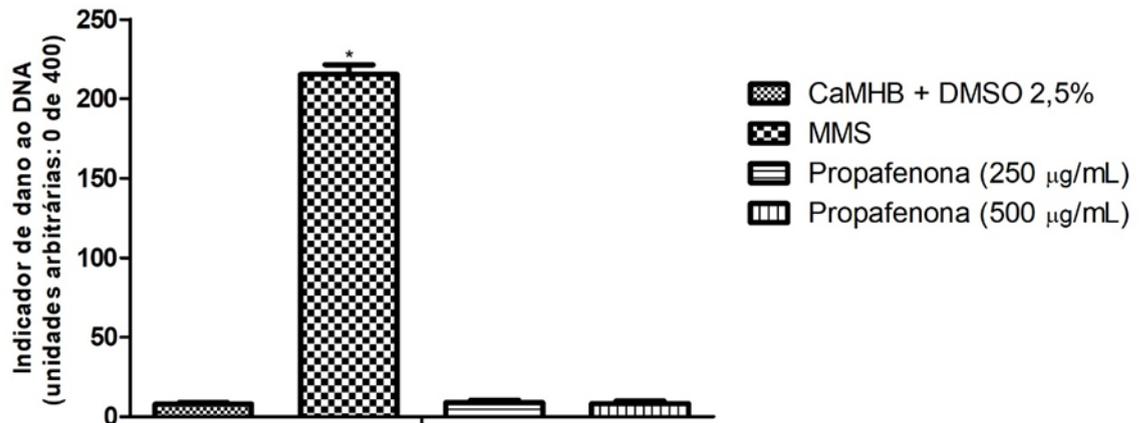
\* $p < 0.05$  Comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

ANOVA: Análise da variância; PROP: Propafenona; CaMHB: Caldo Mueller-Hinton Cation Ajustado; OXA: Oxacilina; VAN: Vancomicina.

### 6.3 Análise do dano ao DNA através do Teste Cometa Alcalino

Não houve indícios estatisticamente significativos ( $P < 0.05$ ) de dano ao DNA de células eucarióticas de murino ao longo de 12 horas de exposição a ambas as concentrações testadas (250 e 500 µg/mL) quando comparadas a amostra não tratada, como observado na Figura 12. Apenas o methyl methanesulphonate (MMS) obteve diferença estatística significativa frente a amostra não tratada.

Figura 12: Avaliação do dano ao DNA em célula eucariótica. Efeito após 12 horas de incubação com a propafenona.



Fonte: Autoria própria.

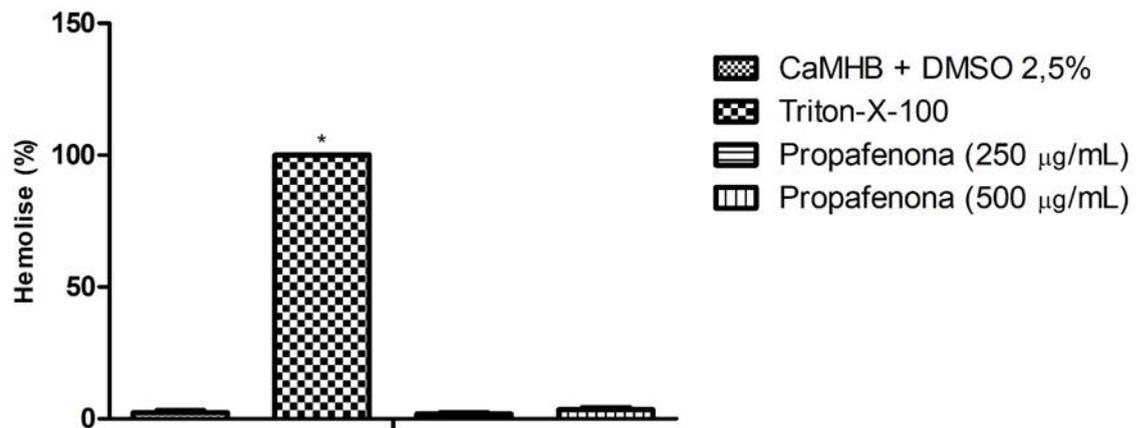
\* $p < 0,05$  comparado ao controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

ANOVA: Análise de variância; PROP: Propafenona; CaMHB: caldo Mueller-Hinton Cation ajustado; MMS: Metanossulfonato de metilo.

#### 6.4 Perfil de hemólise

Conforme demonstrado na Figura 13, em até 1 hora de incubação, a PROP nas duas concentrações analisadas (250 e 500 µg/mL), não apresentaram diferença estatística significativa ( $P < 0.05$ ) em relação ao perfil hemolítico quando comparado ao controle negativo.

Figura 13: Atividade hemolítica da propafenona em eritrócitos de camundongos. Os eritrócitos de camundongo foram tratados em diluições seriadas de Triton X-100 e propafenona



Fonte: Autoria própria.

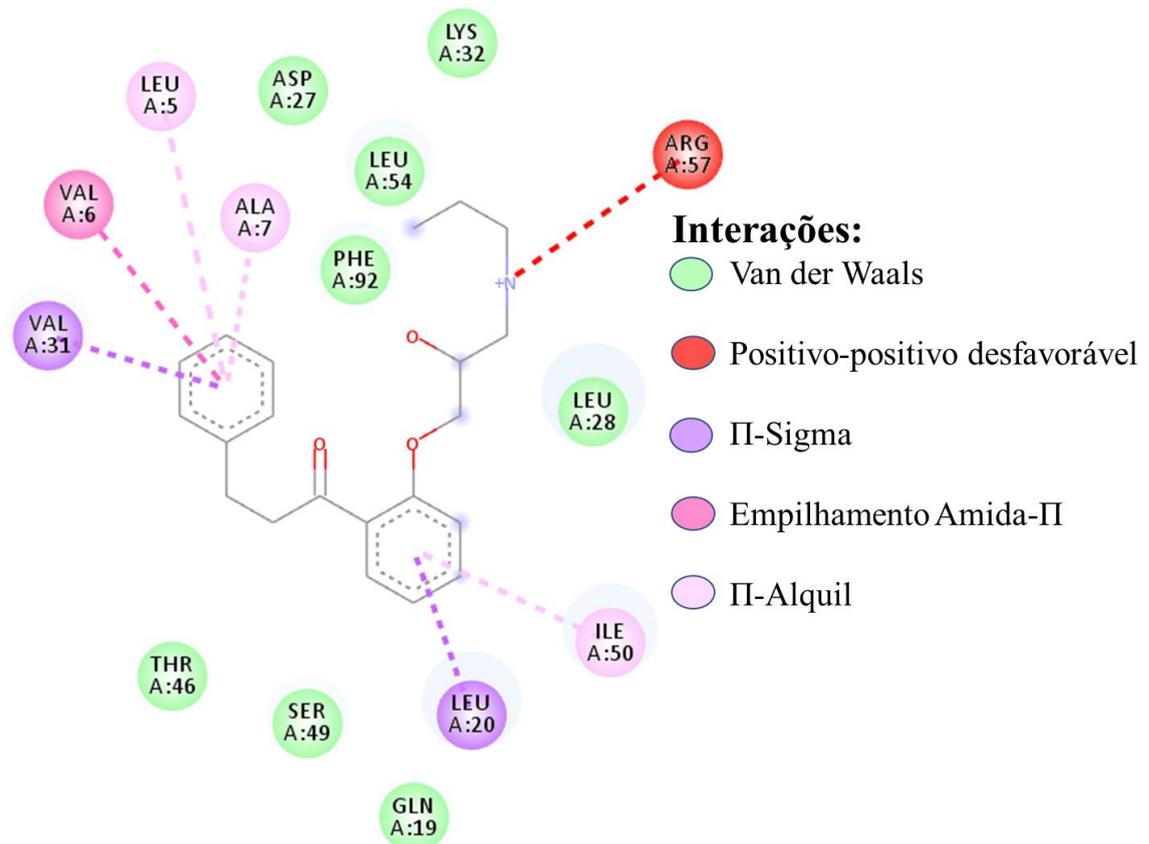
\* $p < 0,05$  comparado ao controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

ANOVA: Análise de variância; PROP: Propafenona; CaMHB: caldo ajustado ao cátion Mueller-Hinton.

## 6.5 Análise da docagem molecular em alvos do DNA

O complexo *Wild-type S. aureus* DHFR – propafenona mostrou interações com resíduos do sítio ativo da DHFR (Leu5, Asp27 e Phe92) e com dois resíduos do loop “Met20” (Gln19 e Leu20) (Figura 14).

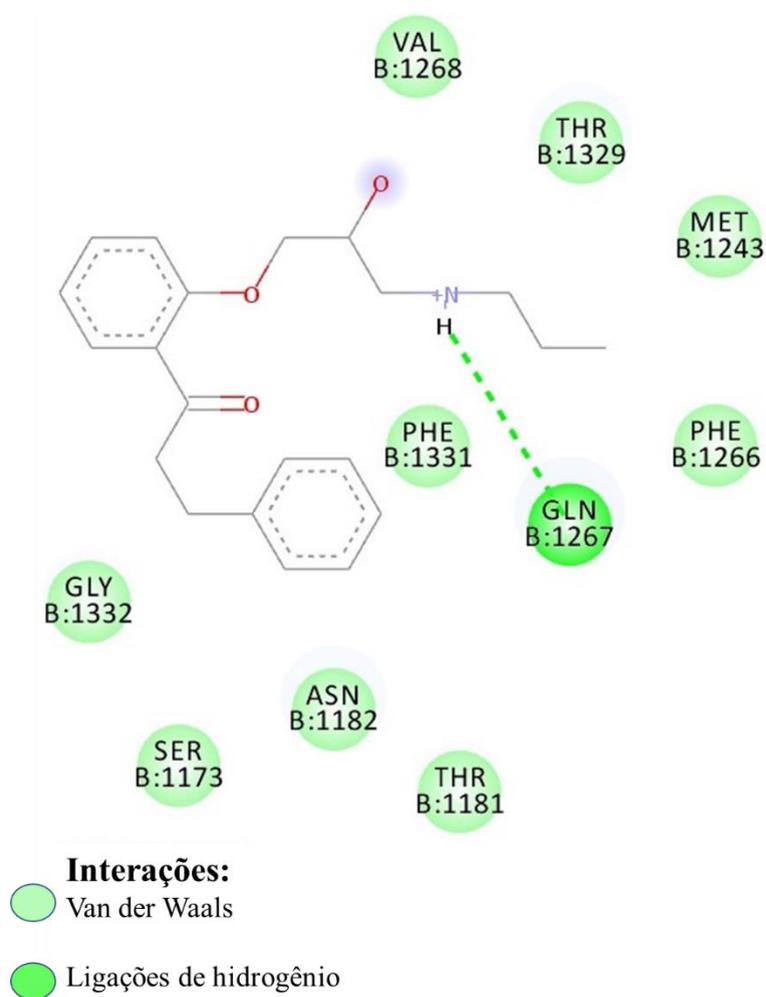
Figura 14: Interações moleculares entre DHFR e a propafenona.



Fonte: Autoria própria

Não foram observadas interações entre a PROP e os resíduos do sítio de ligação do inibidor co-cristalizado (CPF) na *S. aureus gyrase complex with DNA*. Também não foram observadas interações com os resíduos do domínio TOPRIM. Ainda assim a PROP apresentou uma ligação de hidrogênio (Gln1267) e nove interações do tipo van der Waals com a enzima (Figura 15).

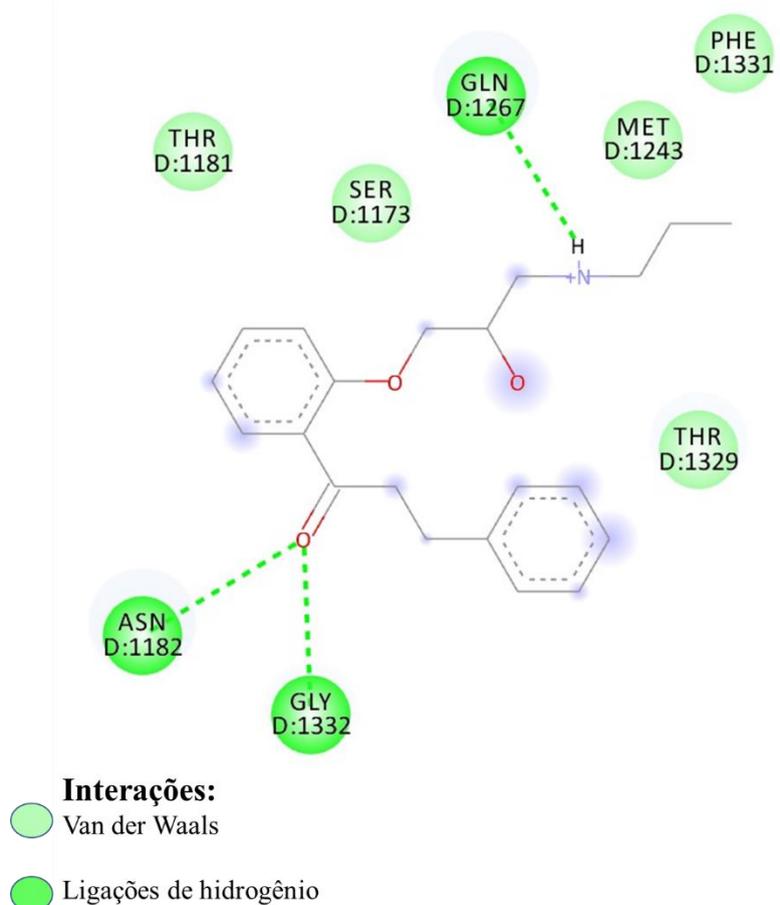
Figura 15: Interações moleculares entre o complexo DNA-girase e a propafenona.



Fonte: Autoria própria.

Não foram observadas interações entre a PROP e os resíduos da *S. aureus gyrase* que compõem o sítio de ligação do inibidor co-cristalizado (WCP). Ainda assim, foram observadas interações do tipo van der Waals e ligações de hidrogênio com a enzima (Figura 16).

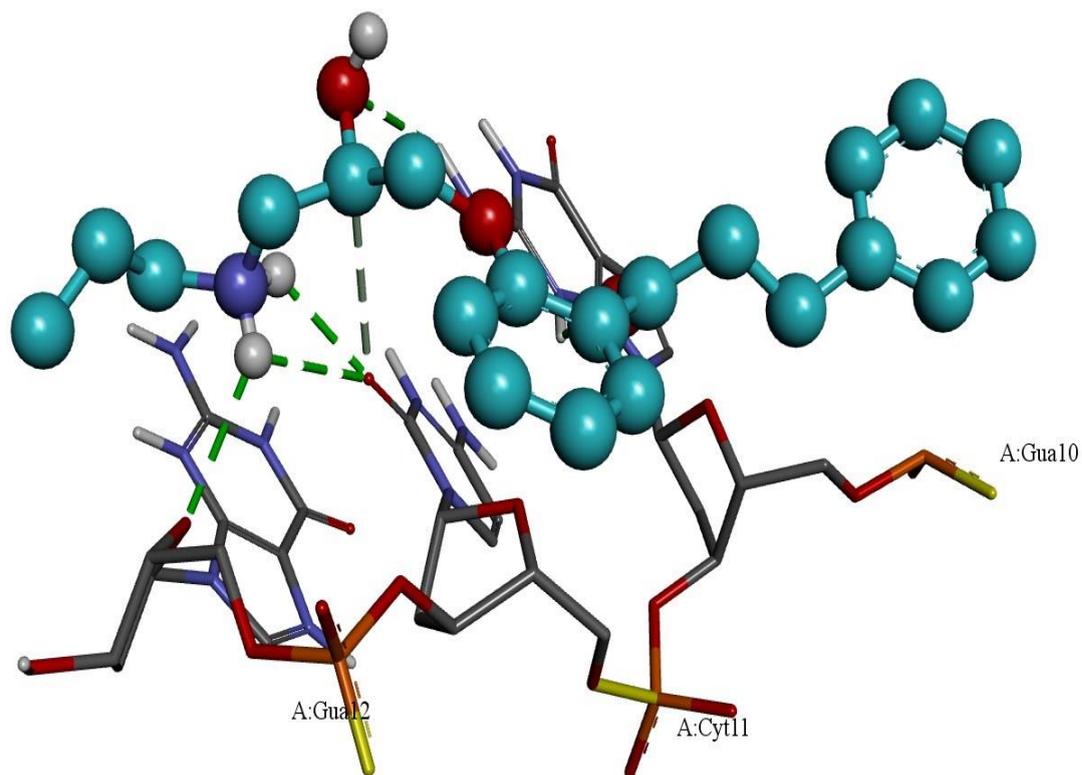
Figura 16: Interações moleculares entre a enzima girase e a propafenona.



Fonte: Autoria própria.

Foram observadas sete ligações de hidrogênio entre a PROP e as bases nitrogenadas Gua10 (três ligações), Cyt11 (três ligações) e Gua12 (uma ligação) do DNA (5'-D(\*CP\*GP\*CP\*GP\*AP\*AP\*TP\*TP\*CP\*GP\*CP\*G)-3') (Figura 17).

Figura 17: Interações moleculares entre o DNA bacteriano e a propafenona.



Fonte: Autoria própria

As ligações de hidrogênio observadas entre a PROP e os alvos DNA são interações fracas do tipo eletrostática. Todas as ligações podem ser encontradas na Tabela 4.

Tabela 4: Interações moleculares da propafenona com os resíduos de *S. aureus*.

Receptor	Resíduo	Interação	Distancia (Å)	RMSD (Å)	Afinidade (Kcal/mol)
<i>S. aureus</i> girase complexada com DNA <sup>a</sup>	Gln1267B	Ligação de Hidrogênio	2.63	1.982	-7,8
<i>S. aureus</i> girase <sup>b</sup>	Gln1267D	Ligação de Hidrogênio	2.39		
	Gly1332D	Ligação de Hidrogênio	2.44	1.755	-7,9
	Asn1182D	Ligação de Hidrogênio	2.83		
Wild-type <i>S. aureus</i> DHFR <sup>c</sup>	Leu5A	$\pi$ -Aquila	3.85		
	Leu20A	$\pi$ -Sigma	3.55		
	Val31A	$\pi$ -Sigma	3.62	1.963	-7,6
	Ile50A	$\pi$ -Aquila	3.82		
	Ala7A	$\pi$ -Aquila	5.01		
Acyl-PBP2a da MRSA <sup>d</sup>	Val6A	Empilhamento $\pi$ -Amida	4.86		
	Glu447A	$\pi$ -Sigma	3.65		
	Thr582A	$\pi$ -Sigma	3.51		
	His583A	Ligação de Hidrogênio	2.30		
	Ser598A	Ligação de Hidrogênio	2.13	1.825	-7,8
	Thr600A	Ligação de Hidrogênio	1.91		
	Tyr446A	Empilhamento- $\pi$	4.14		
	Met641A	$\pi$ -Enxofre	4.67		
DNA (5'-D (*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') <sup>e</sup>	Gua10A	Ligação de Hidrogênio	2.58		
	Gua10A	Ligação de Hidrogênio	2.93		
	Gua10A	Ligação de Hidrogênio	3.09		
	Cyt11A	Ligação de Hidrogênio	2.41	1.067	-7,7
	Cyt11A	Ligação de Hidrogênio	2.92		
	Cyt11A	Ligação de Hidrogênio	3.68		
	Gua12A	Ligação de Hidrogênio	2.74		

a. A estrutura cristalina do *S. aureus* girase complexada com o DNA - PDB ID: 2XCT.

b. A estrutura cristalina do *S. aureus* girase - PDB ID: 5BS3.

c. A estrutura cristalina do Wild-type *S. aureus* DHFR - PDB ID: 2W9G.

d. A estrutura cristalina do Acyl-PBP2a do resíduo MRSA -PDB ID: 3ZfZ.

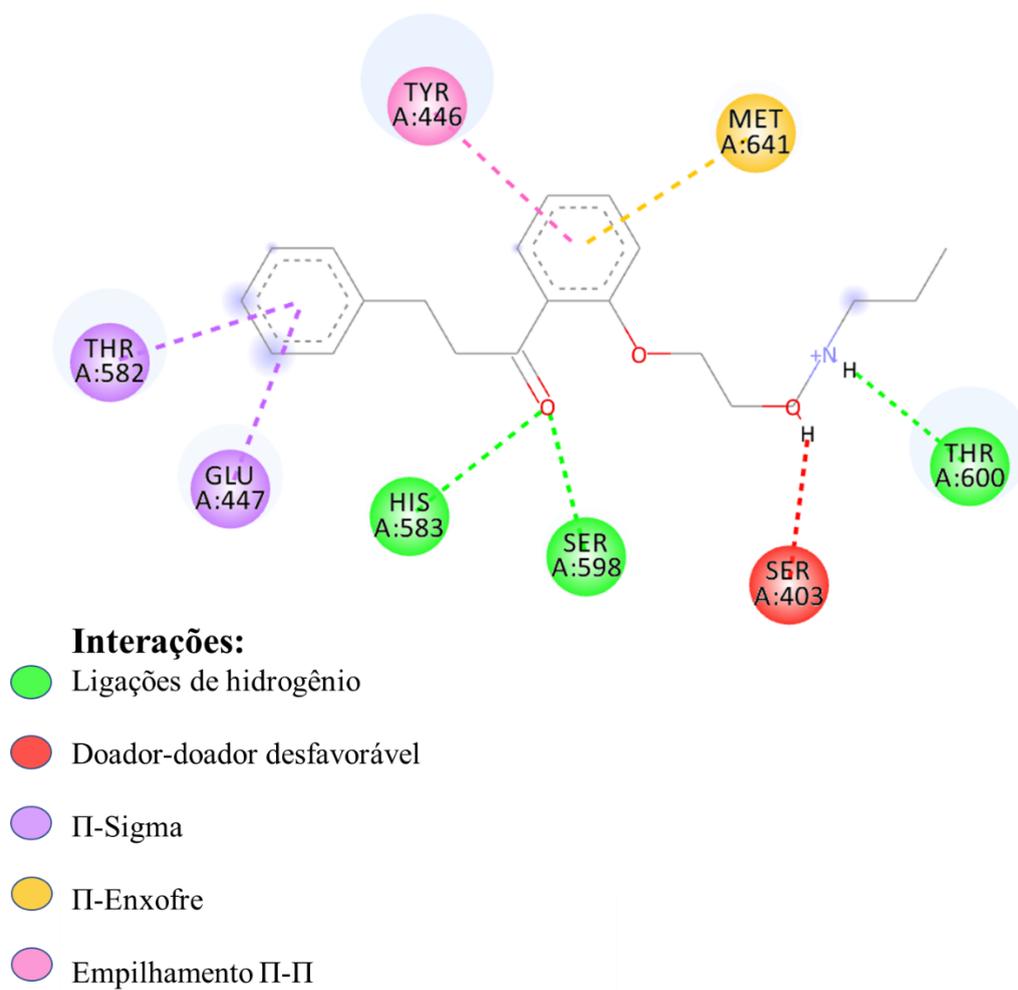
e. A estrutura cristalina do DNA (5'-D(\*CP\*GP\*CP\*GP\*AP\*AP\*TP\*TP\*CP\*GP\*CP\*G)-3') - PDB ID: 453D.

Fonte: Autoria própria

## 6.11 Análise da docagem molecular em alvo da parede celular

A PROP se ligou no sítio ativo da enzima, mesmo sítio de ligação do AI8 (ligante co-cristalizado). Conforme visualizado na Figura 18, o complexo formado mostrou interações com os resíduos do sítio ativo (Ser 403, Tyr446, His583, Ser598, Thr600 e Met641). Na Tabela 4 e na Figura 18 são observadas três ligações de hidrogênio, sendo uma ligação de hidrogênio fraca do tipo eletrostática com His583 e duas ligações de hidrogênio moderadas principalmente eletrostáticas com Ser598 e Thr600. Também foram observadas interações hidrofóbicas (Glu447 e Thr582), Empilhamento- $\pi$  (Tyr446) e  $\pi$ -Enxofre (Met641).

Figura 18: Interações moleculares entre a PBP2a e a propafenona.



Fonte: Autoria própria.

## 7 DISCUSSÃO

Recentemente a PROP apareceu sendo alvo de estudos em análises envolvendo *screening* e determinação da CIM ou inibindo alguns fatores de virulência e biofilme (PETROVIC et al., 2020). Entretanto há um enorme espaço a ser explorado no tocante ao mecanismo de ação desse fármaco em microrganismos. Kruszewska et al (2021) identificou a CIM da PROP para diversos microrganismos, entre eles *Candida albicans* e alguns do grupo ESKAPE como *E. coli* e *S. aureus* com valores de CIM correspondentes a 400, 1600 e 400 µg/mL respectivamente. Esses achados corroboram com os nossos dados obtidos frente a *S. aureus*. Em estudo precursor, Abonia et al., (2018) já utilizou compostos análogos a PROP na busca de possível ação fungicida.

Assim como em nosso resultado, no qual a propafenona apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações de 250 e 500 µg/mL, Petrovic et al., (2020) utilizou derivados da PROP em concentrações idênticas as utilizadas em nossos ensaios. Embora a faixa de concentração de seus compostos tenha variado entre 500 a 62,5 µg/mL, os valores de 250 e 500 µg/mL demonstraram forte ação antibacteriana em *P. aeruginosa*.

Diante do difícil cenário da escassez de soluções antimicrobianas, o número de estudos buscando uma associação sinérgica entre antimicrobianos e compostos naturais ou fármacos reposicionados é grande (FARHA; BROWN, 2019).

A interação farmacológica entra a PROP e a OXA demonstrou-se sinérgica. Diante disso, é possível mensurar a diminuição da dosagem de ambos os fármacos, desencadeando a atenuação de efeitos adversos e toxicidade destes fármacos (CHEN, 2017). Ademais a OXA é um antibacteriano que vem apresentando bom histórico de associações sinérgicas com fármacos de diferentes classes e indicações terapêuticas como relatado por Queiroz et al., (2021), Av Sá et al., (2020) Buommino et al., (2021) e Shahzad et al., (2018).

A PROP apresentou atividade frente a biofilme formado e biofilme em formação, ainda que haja uma escassa presença de estudos publicados envolvendo o uso da PROP e sua atividade em biofilme de *S. aureus*. O modelo comparativo mais próximo encontrado que tenha utiliza derivados da PROP foi o estudo de Petrovict et al. (2020) com *P. aeruginosa*, no qual as concentrações utilizadas foram similares as nossas (31.2, 62.5, 125, 250 e 500 µg/mL) e testadas para inibir a formação de biofilme.

Quantificando a biomassa, Petrovict et al. (2020) observou a completa inibição em 500 µg/mL do 5OF e 5CF3 em 10/10 e 4/10 cepas testadas. Ademais, a quantidade a partir de 125

$\mu\text{g/mL}$  foi suficiente para levar a redução da produção do biofilme na maioria das cepas. Considerando a espécie diferente de microrganismo, nossos resultados ainda sim, são similares tanto na redução de biofilme a partir de  $125 \mu\text{g/mL}$ , assim como na redução quase completa na concentração de  $500 \mu\text{g/mL}$ .

Em estudo similar ao nosso conduzido por Av Sá., et al (2020), observamos a redução da viabilidade celular de biofilme formado em contato com o etomidato em valores variando entre 20 a 80% nas concentrações das CIM's. De mesmo modo, De Andrade Neto et al. (2021) utilizando a curcumina aplicada a biofilme formado, obteve viabilidade celular de 54.51% e 31.73% utilizando valores próximos a CIM e CIMx4 respectivamente.

Diferentemente desses resultados, a PROP ainda em concentrações subinibitórias (CIM/2) diminuiu a viabilidade celular para 25.74%, e com valores referentes ao CIM a viabilidade chegou a cair até atingir 9.90%, demonstrando uma forte ação deletéria ainda em concentração inferior ao CIM em biofilmes já formados.

A busca por demonstrar uma associação sinérgica entre a OXA e outros fármacos reposicionados ou com variados compostos aplicados a biofilme não é uma novidade, sendo recentemente visto na literatura alguns trabalhos a redução da viabilidade celular de maneira significativa. Nossos resultados demonstrando redução da viabilidade do biofilme da associação entre OXA e PROP vão de encontro aos demais estudos precursores (LIU et al., 2018; ROSATO et al., 2020; QUEIROZ et al., 2021)

De maneira similar a ação em biofilme maduro, a PROP obteve superior inibição da formação do biofilme quando comparado a VAN nos respectivos valores referentes ao CIM. A maior expressividade de redução da viabilidade celular nos nossos ensaios de inibição de formação do biofilme é facilmente sustentada pela ausência ou pouca presença de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) já produzidas no biofilme maduro, levando ao aumento da resistência aos fármacos e dificultando a penetrabilidade destes na célula bacteriana (YÜKSEL et al., 2018).

De forma clara, é possível entender essa diferença de resistência do biofilme quando comparamos os nossos resultados da VAN em biofilme formado e em formação. Cargill; Upton, (2009) estipularam uma possível estimulação do crescimento do biofilme quando em contato com doses subinibitórias de VAN, além de já evidenciado na literatura a necessidade de doses superiores a CIM para a VAN efetivamente destruir o biofilme (POST et al., 2017).

Rajamuthiah et al. (2015) associou os valores obtidos do CBM com a curva de morte, de modo a reforçá-los mutualmente. Semelhantemente, nossos resultados da curva de morte

corroboram a forte ação bactericida da PROP ainda na sua concentração referente a CIM, correspondendo muitas vezes ao mesmo valor da CBM.

É muito comum as curvas de morte trabalharem com valores superiores a CIM, principalmente para demonstrar atividade bactericida em 24 horas ou menos. Mesmo compostos com potente atividade bactericida como a endolisina de bacteriófago HY-133 demonstrada por Knaack et al., (2019) apenas na CIMx16 que conseguiu erradicação durante 24 horas. As demais concentrações diminuíram a carga bacteriana, porém não a ponto de erradicar, levando ao recrescimento bacteriano.

A VAN teve como intuito, servir como comparativo a PROP a fim de demonstrar a diferença de atividade bactericida entre uma droga referência no tratamento e a PROP, ambas em valores equivalentes a CIM. De Foster et al., (1986) em 1986 a Tran; Rybak, (2018) em 2018, é possível observar a ineficácia da VAN como bactericida atuando em cepas MRSA em concentrações referentes a CIM. Sumon et al., (2019) necessitou de 5x o valor da CIM e mesmo assim não obteve propriedade bactericida. Em outras situações já foi necessário concentrações superiores em 10 a 20 vezes o valor da CIM para a completa aniquilação, como vista em Haste et al., (2011).

Em relação aos efeitos tóxicos da PROP são bem relatados na literatura desde a década de 80, sendo normalmente associados a indivíduos com deficiência da enzima CYP450, doses superiores a 950 mg por dia e a interações medicamentosas com outras substâncias que utilizem a via metabólica hepática do citocromo P450, em especial fármacos inibidores da CYP2D6 (ALSAAD et al., 2016; FUNCK-BRENTANO et al., 1990)

Em nossos estudos a membrana eritrocitária não é danificada quando em contato com a PROP. Recentemente Chen et al., (2019), relatou casos de hematúria descritos desde 1991 associados ao uso da PROP. Ainda que relatados, a correlação entre hematúria e a PROP não foram elucidadas e em alguns dos casos descritos por Chen et al., (2019) como o estudo de caso de Zeng; Zhu, (1991), não houve causalidade estabelecida para o uso da PROP e a presença de hematúria ou hemólise.

Ainda a nível celular para eucariotos, a PROP não apresentou resultados citotóxicos em células epiteliais esofágicas humanas, conforme verificado por Zheng et al (2017). Utilizando a faixa de dosagem de 10 a 20 mg por kg, *in vivo*, em camundongos o fármaco não demonstrou indícios de toxicidade na dosagem de 120 mg.

Referente a genotoxicidade, nosso resultado com o Teste Cometa Alcalino em 12 horas de incubação não evidenciou qualquer indício significativo de dano ao DNA da célula eucarionte induzida pela PROP. Correlato a isso, Snyder; Green, (2001) em grande estudo

envolvendo diversos fármacos inseridos no mercado, classificou as drogas quanto a presença de mutagenicidade de acordo com os testes as quais foram submetidas. Até 2001 a PROP teria apresentado resultados negativo em diversos ensaios genotóxicos como: Teste de Ames, citogenética *in vitro* e *in vivo* e no Dominante Letal. Ainda hoje a PROP continua a ser um fármaco considerado seguro, inclusive para uso pediátrico. Ainda que em 2013, SAKR; ZOAIL; EL-SHAFFEY (2013) por intermédio do Teste Cometa evidenciou indício significativo de fragmentação do DNA por parte da PROP na dosagem de 13,5 mg por quilo do animal em linfócitos de rato.

Embora nenhum outro antiarrítmico da classe 1c tenha tido evidências de ação antimicrobiana, na natureza há relatos da presença de compostos como o Pursilin com propriedades antiarrítmicas e antibacterianas (SHEN et al., 2020). Ademais, temos a lidocaína que é um fármaco que acumula ambas as propriedades: antiarrítmica e antimicrobiana (KESICI; DEMIRCI; KESICI, 2019). Embora já relatado o bloqueio dos canais de íons na membrana bacteriana, ainda não sabemos se há alguma relação entre isto e uma suposta ação antimicrobiana (LEE; GOODCHILD; AHERN, 2012).

Zheng et al (2017), sugeriu a possibilidade da PROP atuar na desregulação da membrana mitocondrial, ocasionando apoptose celular. Ciente da existência de similaridade entre os canais de íons presentes na membrana mitocondrial e na membrana bacteriana, especialmente em bactérias Gram negativas (PETRONILLI; SZABÒ; ZORATTI, (1989). Logo é plausível inferir que existe ação da PROP comprometendo a viabilidade da membrana da MRSA, conforme nossos dados apontam. Além disso, Petrovisk et al., (2020) menciona a elevada afinidade de ligação de um metabólito derivado da PROP (5OF) a porinas transportadoras presentes na membrana bacteriana.

Diante disto a redução da viabilidade da membrana observada com auxílio de citometria de fluxo, reforça a hipótese de interferência da PROP na integridade da membrana bacteriana, principalmente quando observado o maior pico de redução da viabilidade da membrana desencadeada pela associação entre os dois fármacos (PROP + OXA). Um maior dano a membrana também foi observado em interações sinérgicas envolvendo a OXA a outros fármacos como descrito na literatura (AV SÁ et al., 2020; QUEIROZ et al., 2021)

O princípio do teste TUNEL é baseado na fragmentação do DNA, logo o dano ao DNA bacteriano das células tratadas com a droga teste poderá desencadear um processo de morte celular nos permitindo entender um pouco do mecanismo de ação da droga MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, (2018). Diante disso, nós percebemos a semelhança de valores entre a CIM da OXA e o da PROP, ambos com porcentagem inferior a VAN em concentração

triplicada, utilizada como valor referencial para forte indução de apoptose. Contudo a combinação de CIM entre OXA e PROP ficou semelhante a VAN.

Os resultados obtidos por TUNEL foram associados aos resultados da ancoragem molecular. Como descrito na literatura, as ligações de hidrogênio são um dos tipos de ligações mais relevante do tipo eletrostática para demonstrar forte afinidade entre os ligantes (PANTSAR; POSO, 2018). Ainda que sejam ligações eletrostática do tipo H-ligante fracas, a quantidade de ligações entre a PROP e os sítios alvos do DNA na docagem da *S. aureus*, reforçam os nossos resultados obtidos com a PROP em TUNEL. Ademais, as ligações do tipo  $\pi$  entre a PROP e a enzima DHFR, apresentam relevância na capacidade de reconhecimento molecular entre o fármaco e a enzima alvo e no empilhamento dos nucleotídeos, demonstrando que há atuação da PROP no material genético bacteriano (MARTINEZ; IVERSON, 2012; RILEY; HOBZA, 2013).

A energia de ligação adquire um papel mais relevante do que a quantidade de ligações entre as moléculas, sendo as ligações do tipo hidrogênio e hidrofóbicas as mais proeminentes (RAGI et al., 2021). Devido a maior presença de energia de ligação, as pontes de hidrogênio são um tipo de interação de difícil quebra e que muitas vezes é relacionada a interações do tipo proteína-proteína em complexos inibidores de protease (KURODA; GRAY, 2016).

Como bem conhecido, as pirimidinas como o trimetoprim são uma classe de fármacos com ação antibacteriana direcionada a inibição da síntese de DHFR. Enzima esta importante no precursor processo de síntese de purinas e outros metabólitos relevantes para replicação celular (RAGI et al., 2021). Em estudo conduzido por Rashid et al., (2016) utilizando derivados do trimetoprim, é relatado a relevância de interações do tipo pontes de hidrogênio entre o composto e a LEU5, ASP27 e PHE92. De modo semelhante, a PROP também apresentou interação com esses sítios, entretanto com interações do tipo hidrofóbica e do tipo  $\pi$ , ligações importantes para manter a constante da afinidade de ligação entre a molécula e a enzima (CARDO; HANNON, 2018).

De mesmo modo a DHFR, a DNA girase é outra enzima relevante no processo de formação de ácidos nucleicos. Zeleke et al., (2020) testou diversos compostos *in silico* com variadas energias de afinidade de ligações entre -6.2 a -7.3 Kcal/mol na qual foram considerados bons ligantes ao complexo DNA girase da bactéria *E. coli*. Assim como Zeleke et al., (2020) a PROP apresentou interações do tipo pontes de hidrogênio com a DNA girasse e afinidade de ligação -7,9 Kcal/mol. Quanto ao complexo girasse-DNA, a PROP apresentou diversas interações do tipo van der Waals e apenas uma interação de ponte de hidrogênio com

1.982 Å de RMSD, enquanto a ciprofloxacina obteve a média de 2.48 Å (HASAN et al., 2021).

Neto et al., (2021) em estudo envolvendo alvos semelhantes do DNA da *S. aureus*, a curcumina apresentou apenas duas interações (CYT9 e GUA10) no DNA (5'-D(\*CP\*GP\*CP\*GP\*AP\*AP\*TP\*TP\*CP\*GP\*CP\*G)-3'), enquanto a PROP obteve 7 ligações do tipo ligação de hidrogênio, incluindo 3 ligações no aminoácido GUA10. Entretanto todas estas ligações foram do tipo eletrostática fraca (2.58 Å; 2.95 Å; 3.90 Å).

Por fim o sítio PBP2a foi o alvo com melhor interação com a PROP, apresentando diversas ligações hidrofóbicas, ligações não covalentes e três ligações de hidrogênio. Diferentemente da PROP, antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos normalmente formam uma ligação covalente com o aminoácido SER403 do sítio da PBP2a em MRSA, levando a uma inibição irreversível da proteína e resistência ao fármaco. De forma que a ausência de ligações covalentes com esse aminoácido é uma boa premissa (NEGI et., 2016).

Goel et al, (2021) cita os sítios SER403, SER598, THR600 e LYS597 como cruciais para a ligação ao sítio ativo da PBP2a. Destes, a PROP apresentou ligações de hidrogênio moderadas com os sítios SER598 (2.13) e THR600 (1.91) com distância semelhante ao encontrado no estudo de Goel et al., (2021) 2.0 e 2.6 respectivamente. Em outro estudo, conduzido por Negi et., (2016) envolvendo a análise *in silico* de um composto híbrido de metronidazol-triazolico. Dos cinco sítios alvos de docagem desse composto considerado efetivo contra MRSA, quatro foram idênticos ao presente nas ligações dentre PBP2a e a PROP (THR600, SER598, HIS583 e TYR446).

Em nossa análise, a PROP conseguiu ligar-se no mesmo sítio ativo do co-inibidor cristalizado Ceftarolina, uma cefalosporina de 5ª geração. Ademais, o conjunto de ligações diversificadas envolvendo interações de hidrogênio, hidrofóbicas e não covalentes são importantes no projeto de novos compostos (CARDO; HANNON, 2018). As ligações do tipo empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e  $\pi$ -sigma observadas entre a PROP e a PBP2a, reforçam a boa afinidade entre o arcabouço molecular da enzima e a droga. Em adição a isso, ligações não covalentes do tipo  $\pi$ -ânion são reconhecidas pela contribuição na estabilidade de ligação (Kcal/mol), contribuição que pode ser semelhante as ligações de hidrogênio (SALONEN; ELLERMANN; DIEDERICH, 2011; DAEFFLER; LESTER; DOUGHERTY, 2012).

Recentemente a PROP foi alvo de estudo para docagem molecular envolvendo outros alvos de docagem, como a glicoproteína P de camundongo, que obteve energia de ligação entre 11.9 – 14.2 kcal/mol, superior a energia de ligação de 9.2 kcal/mol observada entre a Rodamina 123 – glicoproteína P. Nessa ocasião foi sugerida que uma inibição competitiva

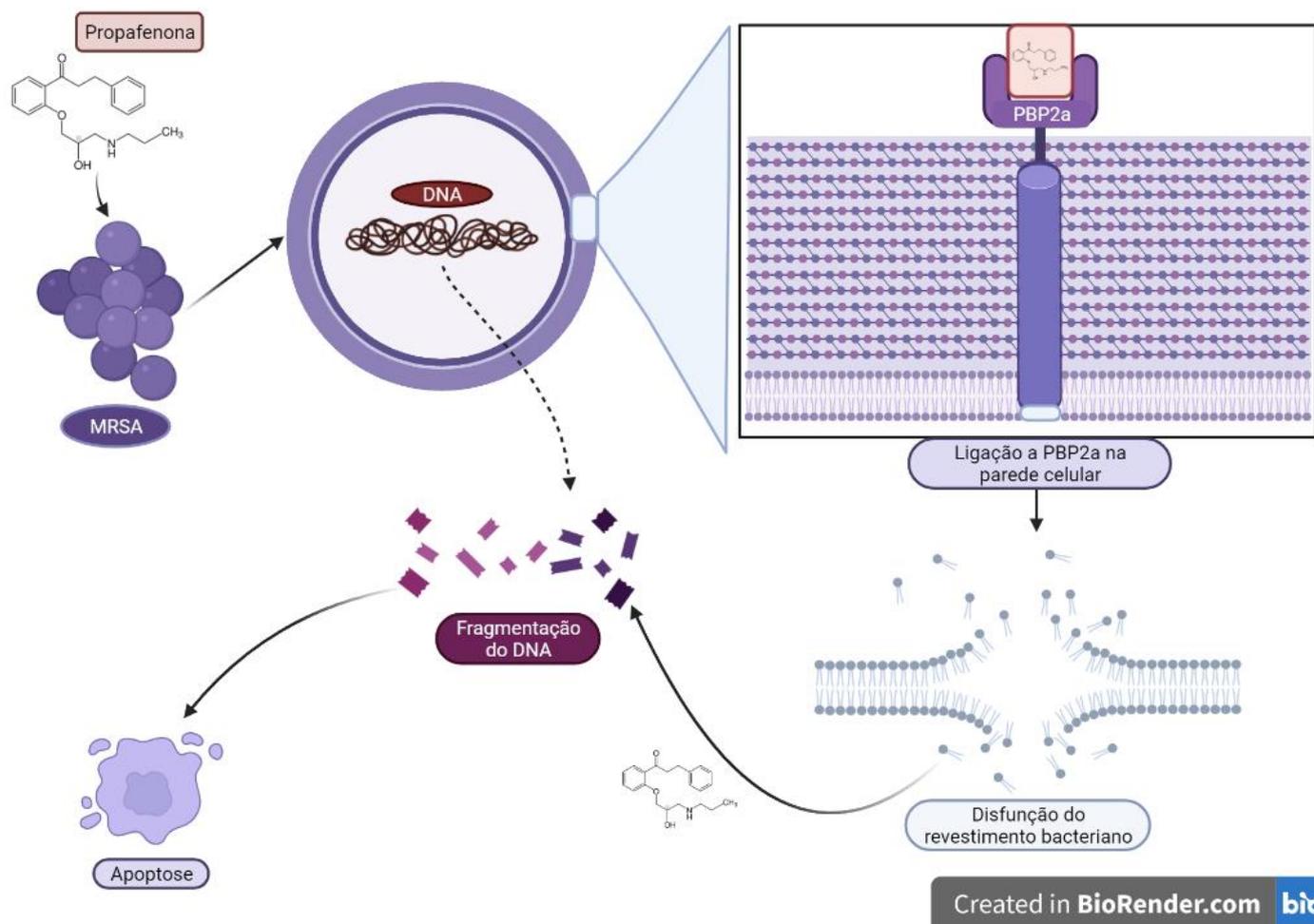
envolvendo a maior afinidade de ligação dentre os moduladores contribuiria para uma diminuição da motilidade da proteína transmembranar, afetando a hidrólise de ATP (RAMASWAMY et al., 2017).

Ainda que a glicoproteína P não tenha sido um alvo de docagem em nosso estudo. Faz notar-se a relação entre a glicoproteína P com a obtenção de ATP e com a presença de mecanismos de virulência como bombas de efluxo em MRSA, ainda que em menor evidência na literatura (HASSANZADEH et al., 2017). Soma-se a isso o nosso resultado de citotoxicidade na membrana da MRSA conjunto a evidenciado registro da ligação de derivados da PROP a porinas transportadoras no estudo de Petrovic et al., (2020). Logo, a membrana da MRSA evidencia-se como um interessante alvo futuro para aprofundamento dos mecanismos de ação da droga.

Na Figura 19 é demonstrado o possível mecanismo de ação da PROP em MRSA. Diante dos dados nos quais dispomos, é imprescindível relacionar que o mecanismo de ação da PROP passe pela sólida ligação da molécula com a PBP2a. Diante de relatos prévios da interação molecular da PROP com alvos da membrana plasmática abordados em Ramaswamy et al., (2017) e Petrovic et al., (2020), em conjunto aos nossos resultados obtidos da citotoxicidade de membrana e aliados a estável ligação da PROP com a PBP2a na ancoragem molecular, é possível supor uma desestabilização do revestimento bacteriano e a permissiva entrada da molécula no DNA bacteriano, desencadeando a fragmentação deste e induzindo a morte bacteriana por apoptose. Ainda que tenha estável ligação a PBP2a, não é possível afirmar se há ou não um rompimento e inativação da parede celular bacteriana, ainda que haja similaridade da molécula com antimicrobianos inibidores da parede celular como a OXA e a ceftarolina. Onde a primeira obteve resultados similares a PROP em relação ao dano no DNA visualizado por TUNEL e no percentual de citotoxicidade de membrana. Em relação a ceftarolina, a PROP demonstrou ter ligações moleculares nos mesmos sítios de inibição da enzima PBP2a.

Contudo, há lacunas no mecanismo de ação ainda não completamente elucidadas, como a positividade em TUNEL de 42,7% em CIM referente a PROP, ainda que a droga atue de maneira bactericida em relação a MRSA, diferentemente das demais drogas testadas (VAN e OXA) que apresentaram melhor percentual de positividade em TUNEL quando comparadas a PROP, mesmos tendo ação bacteriostática frente a MRSA.

Figura 19: Esquema do possível mecanismo de ação antimicrobiano da PROP em MRSA.



Fonte: Autoria própria, produzido no BioRender.com

## 8 CONCLUSÃO

Pouco evidenciado na literatura, a propafenona apresentou em um único estudo, diversas ferramentas para a compreensão da atividade bactericida evidenciada em nossos testes. Nossas evidências nos possibilitam concluir a forte ação bactericida da propafenona em MRSA, com inegável dano ao DNA, a forte ligação a PBP2 em conjunto a permeabilidade de membrana bacteriana, contudo, sem apresentar indícios de citotoxicidade em células de murinos. Ademais foi notória a propícia interação sinérgica da propafenona a oxacilina.

A propafenona demonstra uma alternativa potencial para o reposicionamento, ainda que este estudo seja precursor. Exposto isso, a elucidação definitiva da propafenona como agente anti-estafilocócico ainda não pode ser definida. Em contrapartida, este trabalho com essa dimensão, envolve diversos olhares em torno da propafenona, servindo assim como um estudo precursor para quaisquer futuras utilizações desse fármaco como adjuvante aplicado a antibioticoterapia moderna.

## REFERÊNCIAS

- ABONIA, R. et al. Design of two alternative routes for the synthesis of naftifine and analogues as potential antifungal agents. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 1–22, 2018.
- ADT, AutoDockTools. <http://autodock.scripps.edu/resources/adt> (2013).
- ALSAAD, Ali A. et al. Revisiting propafenone toxicity. **Case Reports**, v. 2017, p. bcr-2017-219270, 2017.
- ALSEQELY, Mustafa et al. Association between fluoroquinolone resistance and MRSA genotype in Alexandria, Egypt. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.
- ANDERSEN, B. M. MRSA Prevention. **Prevention and Control of Infections in Hospitals**, p. 681–711, 2019.
- ANSTEAD, Gregory M.; CADENA, Jose; JAVERI, Heta. Treatment of Infections Due to Resistant *Staphylococcus aureus*. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.259-309, 30 ago. 2013.
- AKDEMIR, A. et al. Novel 2-indolinones containing a sulfonamide moiety as selective inhibitors of *candida*  $\beta$ -carbonic anhydrase enzyme. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 528–531, 2019.
- ARGENZIANO, Monica et al. Vancomycin-loaded nanobubbles: A new platform for controlled antibiotic delivery against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 523, n. 1, p.176-188, maio 2017.
- AV SÁ, Livia G. do et al. Etomidate inhibits the growth of MRSA and exhibits synergism with oxacillin. **Future Microbiology**, v. 15, n. 17, p. 1611-1619, 2020
- AYAZ, Muhammad et al. Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. **Chemico-biological interactions**, v. 308, p. 294-303, 2019.
- AYUKEKBONG, J. A.; NTEMGWA, M.; ATABE, A. N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2017.
- BARRERO, Liliana I. et al. Economic burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in critical care patients in hospitals in Bogotá. **Biomédica**, v. 34, n. 3, p. 345-353, 2014.

- 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. November 2018, p. 335–340, 2019.
- BERUBE, Bryan; WARDENBURG, Juliane. *Staphylococcus aureus* 偽-Toxin: Nearly a Century of Intrigue. **Toxins**, [s.l.], v. 5, n. 6, p.1140-1166, 13 jun. 2013.
- BIFFI, M et al. Electrophysiological effects of flecainide and propafenone on atrial fibrillation cycle and relation with arrhythmia termination. **Heart**, [s.l.], v. 82, n. 2, p.176-182, 1 ago. 1999.
- Biovia. D. S. discovery studio visualizer, v. 17.2, *San Diego: Dassault Systèmes*. 2019.
- BLASKOVICH, Mark AT et al. Developments in glycopeptide antibiotics. **ACS infectious diseases**, v. 4, n. 5, p. 715-735, 2018.
- BOCKSTAEL, K.; VAN AERSCHOT, A. Antimicrobial resistance in bacteria. **Central European Journal of Medicine**, v. 4, n. 2, p. 141–155, 2009.
- BONDI, A.; DIETZ, C. C.. Penicillin Resistant *Staphylococci*. **Experimental Biology And Medicine**, [s.l.], v. 60, n. 1, p.55-58, 1 out. 1945.
- BORG, Michael A.; CAMILLERI, Liberato. What is driving the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Europe? **Microbial Drug Resistance**, v. 27, n. 7, p. 889-894, 2021.
- BUOMMINO, E. et al. Synergistic effect of abietic acid with oxacillin against methicillin-resistant *staphylococcus pseudintermedius*. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2021.
- BRASIL. ANVISA. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 21: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2021**.
- CARDO, Lucia; HANNON, Michael J. Non-covalent metallo-drugs: Using shape to target DNA and RNA junctions and other nucleic acid structures. **Metals in Life Sciences**, v. 18, p. 303-324, 2018.
- CARGILL, J. S.; UPTON, M. Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Clinical Pathology**, v. 62, n. 12, p. 1112–1116, 2009.

CAVALCANTE, Fernanda Sampaio et al. Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients on admission to a teaching hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **American Journal Of Infection Control**, [s.l.], v. 45, n. 11, p.1190-1193, nov. 2017.

CAVALCANTI, B. C. et al. Evaluation of Genotoxicity and Mutagenicity of Ketamine on Human Peripheral Blood Leukocytes and in *Salmonella typhimurium*. **Toxicology in Vitro**, v. 62, p. 104718, 2020.

CEDERLUND, Helena; MÅRDH, Per-anders. Antibacterial activities of non-antibiotic drugs. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.355-365, 1993.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019**. US Department of Health and Human Services, Centres for Disease Control and Prevention, 2019.

CHEESMAN, Matthew J. et al. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? **Pharmacognosy reviews**, v. 11, n. 22, p. 57, 2017.

CHEN, C.-S. Combinational Synergy of Antibiotics and Antimicrobial Peptides. **Journal of Translational Proteomics Research**, v. 3, p. 6–11, 2017.

CHEN, Shuqing et al. Propafenone-associated Gross Hematuria: A Case Report and Review of the Literature. **Clinical therapeutics**, v. 41, n. 8, p. 1614-1620, 2019.

DAEFFLER, Kristina N.-M.; LESTER, Henry A.; DOUGHERTY, Dennis A. Functionally important aromatic–aromatic and sulfur– $\pi$  interactions in the D2 dopamine receptor. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 36, p. 14890-14896, 2012.

DAS, B. et al. Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage-Associated Antibacterial Activity against Clinically Isolated Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains . **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 9, p. IDRT.S31741, 2016.

DA SILVA PERNA, Thaíssa Daulis Gonçalves et al. Prevalência de infecção hospitalar pela bactéria do gênero *klebsiella* em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Qualidade de vida e variáveis associadas ao envelhecimento patológico**, v. 13, n. 2, p. 119-23, 2015.

DE ANDRADE NETO, João Batista et al. Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. **Microbial pathogenesis**, v. 155, p. 104892, 2021.

DE OLIVEIRA, David MP et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 3, p. e00181-19, 2020.

DWYER, Daniel 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.

EL-SHERSHABY, M. H. et al. The antimicrobial potential and pharmacokinetic profiles of novel quinoline-based scaffolds: synthesis and *in silico* mechanistic studies as dual DNA gyrase and DHFR inhibitors. **New Journal of Chemistry**, v. 45, n. 31, p. 13986–14004, 2021

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2020. **Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)**, 2020.

EVANGELISTA, SÍNTIA DE SOUZA; OLIVEIRA, ADRIANA CRISTINA DE. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido na comunidade: um problema mundial. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [s.l.], v. 68, n. 1, p.136-143, fev. 2015.

FARAG, AMIR S. et al. A new sensing platform based on NH<sub>2</sub>fMWCNTs for the determination of antiarrhythmic drug Propafenone in pharmaceutical dosage forms. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 174, p. 534-540, 2019.

FARIAS RIBEIRO, ILANA et al. Identificação de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina em estudantes universitários. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, 2014.

FARHA, M. A.; BROWN, E. D. Drug repurposing for antimicrobial discovery. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 565–577, 2019.

FRAMPTON, JAMES E.. Ceftaroline Fosamil: A Review of its Use in the Treatment of Complicated Skin and Soft Tissue Infections and Community-Acquired Pneumonia. **Drugs**, [s.l.], v. 73, n. 10, p.1067-1094, 26 jun. 2013

FREIRE, T. M. et al. Microbiological profile of isolated specimens in patients admitted to a university hospital from Fortaleza, Brazil. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, v. 11, n. 2, p. 0371, 2020.

FOSTER, J. K. et al. Comparison of in vitro activity of quinolone antibiotics and vancomycin against gentamicin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill kinetic studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, n. 6, p. 823–827, 1986.

FUNCK-BRENTANO, CHRISTIAN et al. Propafenone. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 8, p. 518-525, 1990.

GARRIDO, M. CARMEN CIERCO et al. Incidencia de la infección nosocomial en pacientes trasplantados hepáticos. Factores de riesgo y rol de las enfermeras. **Enfermería Clínica**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.20-26, jan. 2018.

GEORGIA, MUCCILLO DEXHEIMER et al. Prevalence of resistance and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing bacteria isolated in a

hospital in Southern Brazil. **African Journal Of Microbiology Research**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.294-300, 4 fev. 2015.

GOEL, Mayurika et al. Inhibition of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by combination of oxacillin and a bioactive compound from Ramalinaroesleri. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, p. 104676, 2021.

GUSHIKEN, Carolina Y. et al. Nasal carriage of resistant *Staphylococcus aureus* in a medical student community. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 88, n. 3, p.1501-1509, 15 ago. 2016.

HALL, Ronald G. et al. An evaluation of tedizolid for the treatment of MRSA infections. **Expert Opinion On Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 19, n. 13, p.1489-1494, 2 set. 2018.

HANWELL, Marcus D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2012.

HARRON, Dean WG; BROGDEN, Rex N. Propafenone. **Drugs**, v. 34, n. 6, p. 617-647, 1987.

HASAN, Md Rakhibul et al. In silico analysis of ciprofloxacin analogs as inhibitors of DNA gyrase of *Staphylococcus aureus*. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 26, p. 100748, 2021.

HASSANZADEH, Sepideh et al. Frequency of efflux pump genes mediating ciprofloxacin and antiseptic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 71-74, 2017.

HASTE, N. M. et al. Pharmacological properties of the marine natural product marinopyrrole a against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3305–3312, 2011.

HEASLET, H. et al. Structural comparison of chromosomal and exogenous dihydrofolate reductase from *Staphylococcus aureus* in complex with the potent inhibitor trimethoprim. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 76, n. 3, p. 706–717, 2009.

HILL, Malcolm R. et al. Evaluation of the Asthmogenicity of Propafenone, a New Antiarrhythmic Drug. **Chest**, [s.l.], v. 90, n. 5, p.698-702, nov. 1986.

HO, Cheng-mao et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility in Taiwan. **Tzu Chi Medical Journal**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.135-141, 2018.

HODILLE, Elisabeth et al. The Role of Antibiotics in Modulating Virulence in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.887-917, 19 jul. 2017.

ISNARD, Christophe et al. In vitro activity of novel anti-MRSA cephalosporins and comparator antimicrobial agents against *staphylococci* involved in prosthetic joint infections. **Journal Of Global Antimicrobial Resistance**, [s.l.], v. 13, p.221-225, jun. 2018.

Ji, J. et al. In vitro activity of sulbactam in combination with imipenem, meropenem, panipenem or cefoperazone against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 4, p. 400–401, 2013.

KNAACK, D. et al. Bactericidal activity of bacteriophage endolysin HY-133 against *Staphylococcus aureus* in comparison to other antibiotics as determined by minimum bactericidal concentrations and time-kill analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 93, n. 4, p. 362–368, 2019.

KAPADIA, Bhaveen H. et al. The Economic Impact of Periprosthetic Infections After Total Hip Arthroplasty at a Specialized Tertiary-Care Center. **The Journal Of Arthroplasty**, [s.l.], v. 31, n. 7, p.1422-1426, jul. 2016.

KESICI, Ugur; DEMIRCI, Mehmet; KESICI, Sevgi. Antimicrobial effects of local anaesthetics. **International Wound ournal**, v. 16, n. 4, p. 1029-1033, 2019.

KRUSZEWSKA, Hanna et al. Activity of selected non-antibiotic medicinal preparations against standard microorganisms including bacterial probiotic strains. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 78, n. 2, p. 179-185, 2021

KRUSZEWSKA, H.; ZAREBA, T.; TYSKI, S. Estimation of antimicrobial activity of selected non-antibiotic products. **Acta Pol Pharm**, v. 63, p. 457-60, 2006.

KURODA, Daisuke; GRAY, Jeffrey J. Shape complementarity and hydrogen bond preferences in protein–protein interfaces: implications for antibody modeling and protein–protein docking. **Bioinformatics**, v. 32, n. 16, p. 2451-2456, 2016.

LEVINE, D. P.; CRANE, L. R.; ZERVOS, M. J.. Bacteremia in Narcotic Addicts at the Detroit Medical Center. II. Infectious Endocarditis: A Prospective Comparative Study. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.374-396, 1 maio. 1986.

LIMA, Máira Ferreira Pinto et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares–Revisão de Literatura. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, 2018.

LIU, Catherine 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. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 52, n. 3, p.18-55, 1 fev. 2011.

LIU, C. M. et al. *Staphylococcus aureus* and the ecology of the nasal microbiome. **Science Advances**, [s.l.], v. 1, n. 5, p.1400216-1400216, 5 jun. 2015.

LIU, Junyan et al. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v. 101, p.56-67, dez. 2016.

LIU, M. Y. et al. Rifampicin-manuka honey combinations are superior to other antibiotic-manuka honey combinations in eradicating *Staphylococcus aureus* biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–12, 2018.

LEE, Sora; GOODCHILD, Samuel J.; AHERN, Christopher A. Local anesthetic inhibition of a bacterial sodium channel. **Journal of General Physiology**, v. 139, n. 6, p. 507-516, 2012.

LOWY, Franklin D.. *Staphylococcus aureus* Infections. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 339, n. 8, p.520-532, 20 ago. 1998.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

MAJTNEROVÁ, Pavlína; ROUŠAR, Tomáš. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 5, p. 1469-1478, 2018.

MARTINEZ, Chelsea R.; IVERSON, Brent L. Rethinking the term “pi-stacking”. **Chemical Science**, v. 3, n. 7, p. 2191-2201, 2012.

MAZMANIAN, S. K.. *Staphylococcus aureus* Sortase, an Enzyme that Anchors Surface Proteins to the Cell Wall. **Science**, [s.l.], v. 285, n. 5428, p.760-763, 30 jul. 1999.

MCCULLOCH, John Anthony et al. Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus* FCFHV36, a methicillin-resistant strain heterogeneously resistant to vancomycin. **Genome announcements**, v. 3, n. 4, 2015

MCDANEL, Jennifer S. et al. Comparative Effectiveness of Beta-Lactams Versus Vancomycin for Treatment of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections Among 122 Hospitals. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 61, n. 3, p.361-367, 21 abr. 2015.

MOLECULAR, M.; FIELD, F.; HALGREN, T. A. Electrostatic Parameters for Intermolecular Interactions. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 1996, p. 520–552, 2000.

MORAES, D.c.; FERREIRA-PEREIRA, A.. Insights on the anticandidal activity of non-antifungal drugs. **Journal de Mycologie Médicale**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.253-259, set. 2019.

MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiología médica**. Elsevier Brasil, 2015.

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A silver staining method for single-cell gel assay. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1183–1186, 2001.

NEGI, Beena et al. Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity, synergism with oxacillin and molecular docking studies of metronidazole-triazole hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 115, p. 426-437, 2016.

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.

NOBLE, W. C.; VALKENBURG, H. A.; WOLTERS, Caroline H. L.. Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. **Journal Of Hygiene**, [s.l.], v. 65, n. 04, p.567-573, dez. 1967.

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

ONDUSKO, Devlynne S.; NOLT, Dawn. *Staphylococcus aureus*. **Pediatrics In Review**, [s.l.], v. 39, n. 6, p.287-298, jun. 2018.

OTERO, L. H. et al. How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 42, p. 16808–16813, 2013.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, 2018.

CSIZMADIA, P.; SKETCH, M; VIEW, M.: Molecule Applets for the World Wide Web. Chemaxon, nov. 1999.

PARADISI, Franco; CORTI, Giampaolo; MESSERI, Daniela. Antistaphylococcal (mssa, mrsa, msse, mrse) antibiotics. **Medical Clinics of North America**, v. 85, n. 1, p. 1-17, 2001.

PANTSAR, Tatu; POSO, Antti. Binding affinity via docking: fact and fiction. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1899, 2018.

PARTRIDGE, Sally R. et al. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 31, n. 4, p.00088-17, 1 ago. 2018.

PATERSON, Gavin K.; HARRISON, Ewan M.; HOLMES, Mark A. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 1, p. 42-47, 2014.

PEACOCK, Sharon J.; PATERSON, Gavin K.. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual Review Of Biochemistry**, [s.l.], v. 84, n. 1, p.577-601, 2 jun. 2015.

PETERSEN, P. J.; JONES, C. H.; BRADFORD, P. A. In vitro antibacterial activities of tigecycline and comparative agents by time-kill kinetic studies in fresh Mueller-Hinton broth. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, n. 3, p. 347–349, 2007.

PETROVIĆ, Snježana et al. Inhibitory effect of propafenone derivatives on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and pyocyanin production. **Srpski arhiv za celokupno lekarstvo**, v. 148, n. 3-4, p. 196-202, 2020.

PETRONILLI, Valeria; SZABÒ, Ildiko; ZORATTI, Mario. The inner mitochondrial membrane contains ion-conducting channels similar to those found in bacteria. **FEBS letters**, v. 259, n. 1, p. 137-143, 1989.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

POST, V. et al. Vancomycin displays time-dependent eradication of mature *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 35, n. 2, p. 381–388, 2017.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 4932, Propafenone. Retrieved March 31, 2022.

QUEIROZ, Helaine A. et al. Synergistic activity of diclofenac sodium with oxacillin against planktonic cells and biofilm of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Future Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 375-387, 2021.

RAGI, K. et al. In vitro antibacterial and in silico docking studies of two Schiff bases on *Staphylococcus aureus* and its target proteins. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2021.

RAJAMUTHIAH, R. et al. Repurposing salicylanilide anthelmintic drugs to combat drug resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–19, 2015.

RAMASWAMY, Venkata Krishnan et al. Computational modelling of efflux pumps and their inhibitors. **Essays in biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 141-156, 2017.

RAMMELKAMP, C. H.; MAXON, T.. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. **Experimental Biology And Medicine**, [s.l.], v. 51, n. 3, p.386-389, 1 dez. 1942.

RAND, K. H.; HOUCK, H. J. Synergy of daptomycin with oxacillin and other  $\beta$ -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 2871–2875, 2004.

- RANGEL-VEGA, Adrián et al. Drug repurposing as an alternative for the treatment of recalcitrant bacterial infections. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 6, p.0-0, 9 abr. 2015.
- RASHID, Umer et al. Design, synthesis, antibacterial activity and docking study of some new trimethoprim derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26, n. 23, p. 5749-5753, 2016.
- RILEY, Kevin E.; HOBZA, Pavel. On the importance and origin of aromatic interactions in chemistry and biodisciplines. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 4, p. 927-936, 2013.
- ROCHA, Igor Vasconcelos et al. Resistência de bactérias isoladas em equipamentos em unidade de terapia intensiva. **Acta Paulista de Enfermagem**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.433-439, ago. 2015.
- RODRIGUES, Tatyane Silva et al. Resistência Bacteriana á Antibióticos na Unidade de Terapia Intensiva: Revisão Integrativa. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 4, 2018.
- RODVOLD, K. A.; MCCONEGHY, K. W.. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Therapy: Past, Present, and Future. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 58, n. 1, p.20-27, 16 dez. 2013
- ROSATO, A. et al. Anti-biofilm inhibitory synergistic effects of combinations of essential oils and antibiotics. **Antibiotics**, v. 9, n. 10, p. 1–13, 2020.
- RUBIO-TERRÉS, C. et al. Cost of bacteraemia caused by methicillin-resistant vs. methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in Spain: a retrospective cohort study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 722-728, 2010.
- SAKR, Saber A.; ZOAIL, Mohammed E.; EL-SHAFFEY, Samraa S. Rytmonorm-Induced Cytogenetic and Testicular Damage in Albino Rats: The Protective Effect of Grapefruit Juice. **American Journal of Biomedical Research**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2013.
- SALONEN, Laura M.; ELLERMANN, Manuel; DIEDERICH, François. Aromatic rings in chemical and biological recognition: energetics and structures. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 21, p. 4808-4842, 2011.
- SANTOS, Neusa de Queiroz. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto - Enfermagem**, [s.l.], v. 13, n., p.64-70, 2004.
- SARAVOLATZ, Louis D.. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Annals Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 96, n. 1, p.11-17, 1 jan. 1982.
- SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 3, 2020.

SCHILLACI, D. et al. In vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. oleogum resin essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 433–438, 2008.

SHAHZAD, S. et al. Evaluation of synergistic antimicrobial effect of vitamins (A, B1, B2, B6, B12, C, D, E and K) with antibiotics against resistant bacterial strains. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 231–236, 2018.

SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN, A. U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, 2019

SHARPE, J. Neal; SHIVELY, Eugene H.; POLK, Hiram C.. Clinical and economic outcomes of oral linezolid versus intravenous vancomycin in the treatment of MRSA-complicated, lower-extremity skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The American Journal Of Surgery**, [s.l.], v. 189, n. 4, p.425-428, abr. 2005

SHEN, Bingzheng et al. Purlisin, a toxin-like defensin derived from clinical pathogenic fungus *Purpureocillium lilacinum* with both antimicrobial and potassium channel inhibitory activities. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 11, p. 15093-15107, 2020.

SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 23–36, 2014.

SILVA, L. N. et al. Myricetin protects *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* infection and inhibits multiple virulence factors. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 2823, 2017.

SIMKÓ, J. et al. Proarrhythmic potential of antimicrobial agents. **Infection**, v. 36, n. 3, p. 194–206, 2008.

SNYDER, Ronald D.; GREEN, John W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 488, n. 2, p. 151-169, 2001.

SOWASH, Madeleine G.; UHLEMANN, Anne-catrin. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Case Studies. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.25-69, 30 ago. 2013.

SUMON, Z. E. et al. Successful cure of daptomycin-non-susceptible, vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* prosthetic aortic valve endocarditis directed by synergistic in vitro time-kill study. **Infectious Diseases**, v. 51, n. 4, p. 287–292, 2019.

TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.

THANGAMANI, Shankar; YOUNIS, Waleed; SELEEM, Mohamed N. Repurposing ebselen for treatment of multidrug-resistant staphylococcal infections. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2015.

TONG, Steven Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.603-661, 27 maio 2015.

TRAN, K. N.; RYBAK, M. J.  $\beta$ -Lactam combinations with vancomycin show synergistic activity against vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus*, vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA), and heterogeneous VISA. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. 1–8, 2018.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. NA-NA, 2009.

VAN BUUL, Laura W. et al. Antibiotic Use and Resistance in Long Term Care Facilities. **Journal Of The American Medical Directors Association**, [s.l.], v. 13, n. 6, p.568.1-568.13, jul. 2012.

VANEPEREN, Alison S.; SEGRETI, John. Empirical therapy in Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* infections: An Up-To-Date approach. **Journal Of Infection And Chemotherapy**, [s.l.], v. 22, n. 6, p.351-359, jun. 2016.

VASCONCELLOS, J. F. et al. Desospitalização para cuidado domiciliar: impactos clínico e econômico da linezolida. **J Bras Econ Saúde**, v. 7, n. 2, p. 110-115, 2015.

VERINGA, e M; VERHOEF, J. Influence of subinhibitory concentrations of clindamycin on opsonophagocytosis of *Staphylococcus aureus*, a protein-A-dependent process. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.796-797, 1 nov. 1986.

VESTBY, L. K. et al. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 59, 2020.

YÜKSEL, F. N. et al. Inhibition and eradication of *Salmonella Typhimurium* biofilm using P22 bacteriophage, EDTA and nisin. **Biofouling**, v. 34, n. 9, p. 1046–1054, 2018.

YUSUF, D. et al. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 2008.

WEBER, Stephen G. et al. Fluoroquinolones and the risk for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 11, p. 1415, 2003.

WEIGELT, J. et al. Linezolid versus Vancomycin in Treatment of Complicated Skin and Soft Tissue Infections. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 49, n. 6, p.2260-2266, 25 maio 2005.

WEISS, W. J.. Effect of *srtA* and *srtB* gene expression on the virulence of *Staphylococcus aureus* in animal models of infection. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 53, n. 3, p.480-486, 12 fev. 2004.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 309–317, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Antimicrobial Resistance and primary health care. **World Health Organization**, 2018.

ZETOLA, Nicola et al. Community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.275-286, maio 2005.

ZENG, Z. Q.; ZHU, L. Hemolytic reaction resulting from propafenone administration. **Zhonghua nei ke za zhi**, v. 30, n. 4, p. 217-8, 254, 1991.

ZHENG, Wei-Bin et al. Propafenone suppresses esophageal cancer proliferation through inducing mitochondrial dysfunction. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 11, p. 2245, 2017.

ZHENG, Wei; SUN, Wei; SIMEONOV, Anton. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 2, p. 181-191, 2018.