



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

**VITÓRIA PESSOA DE FARIAS CABRAL**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PAROXETINA FRENTE**  
***Staphylococcus aureus*: ESTUDO NA FORMA PLANCTÔNICA, EM BIOFILME E**  
**POTENCIAL APLICAÇÃO EM CATETER**

**FORTALEZA**

**2023**

**VITÓRIA PESSOA DE FARIAS CABRAL**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PAROXETINA FRENTE  
*Staphylococcus aureus*: ESTUDO NA FORMA PLANCTÔNICA, EM BIOFILME E  
POTENCIAL APLICAÇÃO EM CATETER**

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: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior

Coorientadora: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.

**FORTALEZA**

**2023**

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

---

- C122a Cabral, Vitória Pessoa de Farias.  
Avaliação da atividade antibacteriana da paroxetina frente *Staphylococcus aureus* : estudo na forma planctônica, em biofilme e potencial aplicação em cateter / Vitória Pessoa de Farias Cabral. – 2023.  
95 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.  
Coorientação: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.
1. Paroxetina. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Reposicionamento de fármacos. 4. Biofilmes. 5. Agente antibacteriano. I. Título.

CDD 616.9

---

**VITÓRIA PESSOA DE FARIAS CABRAL**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PAROXETINA FRENTE  
*Staphylococcus aureus*: ESTUDO NA FORMA PLANCTÔNICA, EM BIOFILME E  
POTENCIAL APLICAÇÃO EM CATETER**

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.

Aprovada em: 03/02/2023.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

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

À Deus.

À minha família.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bênçãos em minha vida.

À minha família. Meus pais, Cristiane Farias e Denis Cabral, e meu irmão, Davi Cabral, por todo apoio, suporte e incentivo, por sempre acreditarem em mim, minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Hélio Vitoriano, pela orientação, incentivo e por acreditar em mim. Pelas oportunidades e confiança.

À Profa. Dra. Cecília Rocha, pela coorientação e apoio, por também sempre ter me incentivado.

À Profa. Dra. Livia Gurgel, por estar ao meu lado, sempre disposta a ajudar, por me ensinar tanto, por todos os conselhos e contribuições.

Ao Prof. Dr. João Batista, pelos ensinamentos, conselhos, oportunidades e confiança, por também acreditar em mim.

À Daniel Sampaio, Amanda Dias e Lara Elloyse, minha gratidão por terem sempre me ajudado, por serem meu apoio, pela amizade e companheirismo.

Aos demais participantes do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN), por todo apoio e contribuições.

Aos professores participantes da banca examinadora, pela disponibilidade e colaborações neste estudo.

Aos professores Dr. Bruno Coêlho e Dr. Emmanuel Marinho, pelas contribuições metodológicas neste estudo.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM) e ao corpo docente do programa, pelas contribuições em minha formação acadêmica.

À Central Analítica da UFC, pela colaboração na realização dos testes de microscopia eletrônica de varredura.

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

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* se caracteriza em um patógeno humano associado a altas taxas de infecção, ao qual desde a década de 1960 apresenta isolados resistentes à meticilina, que emergiram, disseminaram-se globalmente e tornaram-se uma das principais causas de infecções bacterianas em ambientes de saúde e comunitários. Nesse sentido, o reposicionamento de fármacos constitui-se como uma possibilidade terapêutica. A paroxetina, inibidor seletivo de recaptção da serotonina, é alvo de pesquisa neste âmbito. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da paroxetina frente a cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina na forma planctônica e sua ação sobre biofilme formado e em formação. Para determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo segundo o protocolo M07-A10 do CLSI (2015), sendo posteriormente estabelecida a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e nível de tolerância da paroxetina. Além disso, o *checkerboard* foi empregado para avaliação da interação farmacológica entre paroxetina e oxacilina, seguido da utilização de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em células planctônicas. Em relação a investigação dos possíveis mecanismos de ação, foram realizados ensaios de citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e *molecular docking*. No que diz respeito aos ensaios em células sésseis, a ação dos fármacos foi avaliada frente biofilme formado e em formação utilizando brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), e na prevenção da formação de biofilme em cateter venoso periférico por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) e MEV. A paroxetina apresentou CIM de 64 µg/mL, atividade bactericida e interações majoritariamente aditivas na combinação a oxacilina. Também foi constatado evidências de ação sobre material genético e membrana, além de alterações morfológicas na célula microbiana e atividade sobre fatores de virulência. A paroxetina exibiu redução significativa da viabilidade celular a partir de 32 µg/mL no biofilme formado e 128 µg/mL no biofilme em formação e, na combinação com oxacilina, verificou-se significância a partir das CIMs associadas. A paroxetina isolada e associada a oxacilina exibiu potencial para prevenção da formação de biofilme de *S. aureus* em cateter venoso periférico com redução de 44,81% e 94,94% em UFC/mL, respectivamente. Diante disso, a paroxetina demonstra promissora atividade frente *S. aureus*, caracterizando-se como uma possível alternativa terapêutica.

**Palavras-chave:** Paroxetina. *Staphylococcus aureus*. Reposicionamento de fármacos. Biofilmes. Agente antibacteriano.



## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is characterized as a human pathogen associated with high rates of infection, which since the 1960s has presented methicillin-resistant isolates that emerged, spread globally and become one of the main causes of bacterial infections in healthcare environments and community. In this sense, the repositioning of drugs constitutes a therapeutic possibility. Paroxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor, is the subject of research in this area. Thus, the objective of the study was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of paroxetine against strains of *S. aureus* sensitive and resistant to methicillin in planktonic form and its action on biofilm formed and in formation. To determine the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC), the broth microdilution technique was used according to the CLSI M07-A10 protocol (2015), and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and tolerance level of paroxetine were subsequently established. In addition, the checkerboard was used to evaluate the pharmacological interaction between paroxetine and oxacillin, followed by the use of Scanning Electron Microscopy (SEM) in planktonic cells. Regarding the investigation of possible mechanisms of action, flow cytometry, fluorescence microscopy and molecular docking tests were carried out. With regard to assays in sessile cells, the action of drugs was evaluated against biofilm formed and in formation using 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-bromide tetrazolium (MTT), and in the prevention of biofilm formation in peripheral venous catheters by counting Colony Forming Units (CFU/mL) and SEM. Paroxetine showed MIC of 64 µg/mL, bactericidal activity and mostly additive interactions in combination with oxacillin. Evidence of action on genetic material and membrane was also found, in addition to morphological changes in the microbial cell and activity on virulence factors. Paroxetine exhibited a significant reduction in cell viability from 32 µg/mL in the formed biofilm and 128 µg/mL in the biofilm in formation and, in combination with oxacillin, significance was verified from the associated MICs. Paroxetine alone and associated with oxacillin showed potential for preventing the formation of *S. aureus* biofilm in peripheral venous catheters with a reduction of 44.81% and 94.94% in CFU/mL, respectively. Therefore, paroxetine demonstrates promising activity against *S. aureus*, characterizing itself as a possible therapeutic alternative.

**Key words:** Paroxetine. *Staphylococcus aureus*. Drug repositioning. Biofilms. Antibacterial agent.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Perfil de crescimento e padrão bioquímico de <i>S. aureus</i> em meios de cultura habituais. .....	24
Figura 2 - Esquema representativo da infecção sistêmica por <i>S. aureus</i> .....	27
Figura 3 - Estágios de formação do biofilme. ....	29
Figura 4 – Representação estrutural da paroxetina.....	40
Figura 5 - Fluxograma de metodologias empregadas.....	44
Figura 6 - Interações dos complexos formados entre a paroxetina e os alvos <i>S. aureus gyrase complex with DNA</i> (a), <i>S. aureus gyrase</i> (b), <i>C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase</i> (c) e <i>S. aureus TyrRS</i> (d).....	59
Figura 7 - MEV de células planctônicas de SARM.....	69
Figura 8 - MEV de cateter intravenoso periférico impregnado com paroxetina e oxacilina isoladas e associadas, submetido a formação de biofilme de SARM.....	71

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Tratamento realizado com paroxetina isolada e associada à oxacilina em uma cepa representativa de SARM evidenciando o efeito nas células não viáveis.....	57
Gráfico 2 - Tratamento realizado com paroxetina isolada e associada à oxacilina em uma cepa representativa de SARM evidenciando fragmentação do DNA bacteriano. ....	58
Gráfico 3 - Atividade da paroxetina isolada e em associação a oxacilina frente biofilmes formados por <i>S. aureus</i> .....	65
Gráfico 4 - Atividade da paroxetina isolada e em associação a oxacilina frente biofilmes em formação de <i>S. aureus</i> . ....	67
Gráfico 5 - Prevenção da formação de biofilme de SARM em cateter venoso periférico impregnado com paroxetina isolada e em combinação a oxacilina.....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prioridades da OMS para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos para bactérias resistentes. ....	22
Tabela 2 - Manifestações clínicas da infecção por <i>S. aureus</i> . ....	25
Tabela 3 - Parâmetros utilizados nas simulações de <i>molecular docking</i> . ....	50
Tabela 4 - Valores de CIM, CBM e nível de tolerância da paroxetina, e associação entre paroxetina e oxacilina frente a isolados de <i>S. aureus</i> . ....	55
Tabela 5 - Valores de energia de afinidade, RMSD, Ki e pKi dos complexos formados. ....	59
Tabela 6 - Interações entre a paroxetina e os receptores de SARM. ....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADI	Aditivo
ANOVA	Análise de Variância
ARSs	Aminoacil-tRNA-sintetases
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Infusão Cérebro e Coração
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CID	<i>Compound identifier</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Cmax	Concentração plasmática máxima
COVID-19	Doença pelo coronavírus 2019
CYP	Citocromo
DHFR	Diidrofolato redutase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
d-UTP	Desoxiuridina trifosfato
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESKAPE	<i>Enterococcus spp., Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter spp.</i>
ET	Toxina esfoliativa
H	Horas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMDS	Hexametildisilazano
IC50	Concentração inibitória média
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
IgG	Imunoglobulina G
IND	Indiferente
IP	Iodeto de propídio

ISRS	Inibidores Seletivos de Recaptação da Serotonina
K	Kelvin
Kcal	Quilocaloria
Ki	Constante de inibição
kJ	Quilojoule
LABIMAN	Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas
LGA	<i>Lamarckian Genetic Algorithm</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
MMFF94	<i>Merck Molecular Force Field 94</i>
<i>mprF</i>	<i>Multiple peptide resistance factor</i>
MtID	Manitol-1-fosfato 5-desidrogenase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA	Oxacilina
PBP	Proteína ligadora de penicilina
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial hidrogenioiônico
pKi	- log <sub>10</sub> da constante de inibição
PRX	Paroxetina
RAM	Resistência a antimicrobianos
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
SCCmec	Cassete cromossômico estafilocócico mec
SE	Enterotoxina estafilocócica
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SIN	Sinérgico

TdT	Desoxinucleotidil-transferase terminal
THF	Ácido tetraidrofólico
TSB	Caldo Triptona Soja
TSST	Toxina da síndrome do choque tóxico estafilocócico
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling</i>
TyrRS	Tirosil-tRNA sintetase
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VAN	Vancomicina
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> intermediário a vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>22</b>
2.1 Patógenos bacterianos e a resistência aos antimicrobianos (RAM).....	22
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> : Classificação, estrutura e características .....	23
2.3 Colonização e condições clínicas infecciosas .....	24
2.4 Mecanismos de virulência .....	26
2.5 Epidemiologia .....	29
2.6 Tratamento farmacológico convencional .....	32
2.7 Desenvolvimento de resistência por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
2.8 Novas estratégias terapêuticas.....	35
2.9 Alvos promissores na pesquisa de antibacterianos frente <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
2.10 Paroxetina .....	39
<b>3. HIPÓTESES .....</b>	<b>42</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
4.1 Objetivo geral.....	43
4.2 Objetivos específicos.....	43
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
5.1 Microrganismos .....	44
5.2 Fármacos .....	45
5.3 Testes de sensibilidade <i>in vitro</i> .....	45
5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	45
5.3.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	46
5.3.3 Investigação do nível de tolerância.....	46
5.3.4 Avaliação da interação farmacológica .....	46
5.3.5 Análise dos dados.....	46



<b>5.4 Testes realizados por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência .....</b>	<b>46</b>
<i>5.4.1 Preparo da suspensão de células.....</i>	<i>46</i>
<i>5.4.2 Avaliação da viabilidade celular .....</i>	<i>47</i>
<i>5.4.3 Análise de fragmentação do DNA.....</i>	<i>47</i>
<i>5.4.4 Análise estatística .....</i>	<i>47</i>
<b>5.5 Molecular docking .....</b>	<b>47</b>
<i>5.5.1 Design e otimização do ligante.....</i>	<i>47</i>
<i>5.5.2 Obtenção dos alvos .....</i>	<i>48</i>
<i>5.5.3 Preparação dos alvos e procedimentos gerais de molecular docking.....</i>	<i>49</i>
<b>5.6 Ensaio frente biofilme.....</b>	<b>51</b>
<i>5.6.1 Biofilme formado.....</i>	<i>51</i>
<i>5.6.2 Atividade antibiofilme.....</i>	<i>52</i>
<i>5.6.3 Impregnação de fragmentos de cateter.....</i>	<i>52</i>
<i>5.6.4 Avaliação do efeito de cateteres impregnados contra a formação de biofilme .....</i>	<i>52</i>
<i>5.6.5 Análise estatística .....</i>	<i>53</i>
<b>5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</b>	<b>53</b>
<i>5.7.1 Células planctônicas.....</i>	<i>53</i>
<i>5.7.2 Cateteres impregnados .....</i>	<i>53</i>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
<b>6.1 Atividade frente células planctônicas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>54</b>
<i>6.1.1 Paroxetina apresenta ação antibacteriana frente isolados de <i>S. aureus</i> sensíveis e resistentes à meticilina.....</i>	<i>54</i>
<i>6.1.2 Paroxetina demonstra efeito bactericida em isolados de <i>S. aureus</i> sensíveis e resistentes à meticilina.....</i>	<i>56</i>
<i>6.1.3 Interação farmacológica na combinação entre paroxetina e oxacilina frente isolados de <i>S. aureus</i> sensíveis e resistentes à meticilina .....</i>	<i>56</i>
<b>6.2 Análise dos possíveis mecanismos de ação .....</b>	<b>56</b>

<i>6.2.1 Redução da viabilidade em células de SARM evidenciado após tratamento com paroxetina isolada e associada à oxacilina</i> .....	56
<i>6.2.2 Fragmentação de DNA induzida pela paroxetina isolada e associada à oxacilina em células de SARM detectado por TUNEL</i> .....	57
<i>6.2.3 Interação in silico da paroxetina com receptores de SARM</i> .....	58
<b>6.3 Atividade frente biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	64
<i>6.3.1 Paroxetina isolada e associada à oxacilina apresenta ação frente biofilmes formados por <i>S. aureus</i></i> .....	64
<i>6.3.2 Paroxetina isolada e associada a oxacilina apresenta potencial antibiofilme frente <i>S. aureus</i></i> .....	66
<i>6.3.3 Cateter impregnado com paroxetina isolada e associada à oxacilina atua na prevenção da formação de biofilme de <i>S. aureus</i></i> .....	68
<b>6.4 Avaliação morfológica</b> .....	68
<i>6.4.1 Paroxetina isolada e associada a oxacilina gera alterações em células planctônicas de <i>S. aureus</i></i> .....	68
<i>6.4.2 Inibição da formação de biofilme de <i>S. aureus</i> em cateteres impregnados com paroxetina isolada e associada a oxacilina evidenciado por MEV</i> .....	70
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	78
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	79

## 1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos desempenha um papel significativo que apresenta alta morbidade e mortalidade (FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017). Em análise de Cassini et al. (2019), foi avaliada a carga de infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos de interesse para a saúde pública em países da União Europeia e do Espaço Econômico Europeu em 2015, havendo sido estimado 671,689 infecções por patógenos bacterianos que apresentavam resistência, dos quais 63,5% estavam associadas aos cuidados de saúde, com 33,110 mortes atribuíveis.

Agravante a este cenário, o consumo geral de antimicrobianos aumentou durante a pandemia de COVID-19, como destacado por Silva et al. (2021) em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) de um hospital do Rio de Janeiro, Brasil. No entanto, o uso destes medicamentos não foram associados ao aumento dos agentes patogênicos que pretendiam tratar, potencialmente contribuindo para o esgotamento do arsenal farmacológico. Em análise retrospectiva de Polly et al. (2022), foi comparada a incidência de infecções associadas aos cuidados na saúde anteriores a emergência de COVID-19 e durante a pandemia em um hospital de São Paulo, Brasil. Verificou-se que infecções causadas por microrganismos multirresistentes aumentaram em 23%, com elevação significativa de *Acinetobacter baumannii* resistente à carbapenêmicos (+ 42%) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) (+ 46,2%).

Nesse contexto, *S. aureus* se caracteriza como um patógeno humano associado a altas taxas de infecção (JUBEH; BREIJYEH; KARAMAN, 2020), ao qual desde a década de 1960 apresenta isolados resistentes à meticilina (SARM), os quais emergiram, disseminaram-se globalmente e tornaram-se uma das principais causas de infecções bacterianas em ambientes de saúde e comunitários (LEE et al., 2018). No Brasil, os primeiros isolados de SARM foram relatados no final da década de 1980, os quais demonstraram ser capazes de transferir genes envolvidos na resistência a múltiplas drogas e propriedades patogênicas aprimoradas (ANDRADE et al., 2020).

De forma geral, cerca de 20% da população humana está colonizada de forma permanente por *S. aureus*, sendo 20% considerados não portadores e 60% portadores intermitentes (LAUX; PESCHEL; KRISMER, 2019). Estudo de Oliveira et al. (2018) avaliou a taxa de colonização por *S. aureus* em UTI de um hospital do Piauí, Brasil. Foi observada colonização de 35% dos pacientes, com 31% oriundas da cavidade orofaríngea e 12,8% de locais de inserção de cateter venoso central. Em relação a colonização por SARM, a taxa

correspondeu a 26,4% nestes sítios, e para *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA), foi verificado que este estava presente em 22,4% dos pacientes.

Associado a isso, *S. aureus* expressa um amplo espectro de fatores de virulência que estão relacionados a sua patogênese, e é também um dos patógenos proeminentes em infecções relacionadas a biofilme de dispositivos médicos residentes (AL-MEBAIRIK et al., 2016). Diante deste contexto, infecções que estão veiculadas a biofilme são reconhecidas por possuírem resistência aumentada, o que é atribuído à proteção oferecida pela matriz e as características fenotípicas das células bacterianas no interior desta, conferindo um nível adicional de complexidade ao problema da resistência antimicrobiana (CRAFT et al., 2019).

De acordo com O'Neill (2016), é estimado que estarão em risco 10 milhões de vidas por ano e um custo cumulativo para a economia global de 100 trilhões de dólares até 2050 devido ao aumento de infecções resistentes a medicamentos caso não sejam encontradas soluções para retardar esta problemática. Assim, é necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (MIRÓ-CANTURRI; AYERBE-ALGABA; SMANI, 2019).

O reposicionamento de fármacos, o qual consiste no processo de geração de novas oportunidades clínicas para medicamentos previamente aprovados (BARBAROSSA et al., 2022), é considerado uma alternativa eficaz tendo em vista os custos reduzidos e maior rapidez durante o processo de desenvolvimento de medicamentos. Alguns fármacos já foram aprovados com sucesso para novas indicações, e são principalmente para doenças parasitárias e protozoárias. Exemplos se constituem na anfotericina B, antifúngico, para o tratamento de leishmaniose visceral, e drogas antimaláricas, cloroquina e pirimetamina, reaproveitadas para amebíase e toxoplasmose, respectivamente (FARHA; BROWN, 2019).

Além disso, a estratégia de reposicionamento pode ser aprimorada com a utilização de abordagens computacionais (HUA et al., 2022), descritas por sua aplicação em estágios iniciais no processo de design de fármacos fornecendo a compreensão de sistemas químicos de maneira virtual de forma a complementar a análise experimental (DE AZEVEDO, 2019). Adicionalmente, também há a possibilidade de combinação de um medicamento reposicionado com um antibiótico para potencialização da atividade ou prevenção de resistência (BOYD; TENG; FREI, 2021).

Diante disso, nos últimos anos um número crescente de estudos tem investigado a atividade antimicrobiana de diversas classes de fármacos não antibióticos, como os inibidores seletivos de recaptação da serotonina (ISRS), destacados por demonstrar além de sua ação típica sobre o sistema nervoso, atividade antimicrobiana promissora (FOLETTTO et al., 2021a).

Assim, a paroxetina, pertencente a classe dos ISRS (GUNASEKARA; NOBLE; BENFIELD, 1998), é relatada na literatura acerca da atividade frente células planctônicas de bactérias Gram positivas e Gram negativas (FOLETTTO et al., 2020, 2021b).

Tendo em vista a ausência de estudos que investiguem de forma aprofundada acerca da atividade antibacteriana da paroxetina sobre *S. aureus*, a presente pesquisa teve por finalidade avaliar o mecanismo de ação deste fármaco diante deste microrganismo, bem como o potencial da paroxetina isolada e associada a oxacilina frente biofilme formado, seu potencial antibiofilme e acerca da inibição da formação de biofilme em cateter venoso periférico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Patógenos bacterianos e a resistência aos antimicrobianos (RAM)

A RAM é reconhecida como um dos maiores desafios para a saúde em âmbito global no século XXI (HERNANDO-AMADO et al., 2019). Diante deste contexto, os patógenos ESKAPE, os quais incluem *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp., destacam-se por sua capacidade de desenvolver resistência a múltiplas drogas, limitando as opções terapêuticas e aumentando a morbimortalidade (FOUNOU; FOUNOU; ESSACK, 2017).

De acordo com De Oliveira et al. (2020), a aquisição de genes de resistência aos antimicrobianos pelos microrganismos do grupo ESKAPE aumentou a carga de doenças e as taxas de mortalidade por falha no tratamento, de forma que requer uma resposta global coordenada para vigilância da RAM. Diante deste cenário, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu uma lista de prioridades (Tabela 1) para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos para bactérias resistentes (TACCONELLI et al., 2018).

Tabela 1 - Prioridades da OMS para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos para bactérias resistentes.

Patógeno	Resistência
<b>Prioridade 1: Crítica</b>	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenêmicos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenêmicos
Enterobacteriaceae	Carbapenêmicos Terceira geração de cefalosporinas
<b>Prioridade 2: Alta</b>	
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina Vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
<i>Campylobacter</i> spp.	Fluoroquinolonas
<i>Salmonella</i> spp.	Fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Terceira geração de cefalosporinas Fluoroquinolonas
<b>Prioridade 3: Média</b>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Não suscetível a penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
<i>Shigella</i> spp.	Fluoroquinolonas

Adaptado de Tacconelli et al. (2018).

Com base em modelos estatísticos preditivos, em 2019 houve uma estimativa de 4,95 milhões de mortes associadas a RAM. Os seis principais patógenos relacionados a esta estatística são *Escherichia coli*, seguido por *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, responsáveis por 3,57 milhões de mortes associadas a RAM neste mesmo ano (MURRAY et al., 2022).

Em estudo realizado por Thorpe, Joski e Johnston (2018) foi estimado os custos incrementais de saúde no tratamento de infecções resistentes entre 2002 a 2014 nos Estados Unidos. Nesse sentido, foi constatado que a RAM adicionou \$1,383 a despesa do tratamento de um paciente com infecção bacteriana, estimando-se que em 2014, o custo nacional foi correspondente a \$ 2,2 bilhões por ano. Assim, a necessidade de novos programas inovadores de prevenção de infecções, antibióticos e vacinas é enfatizada como uma prioridade internacional.

## **2.2 *Staphylococcus aureus*: Classificação, estrutura e características**

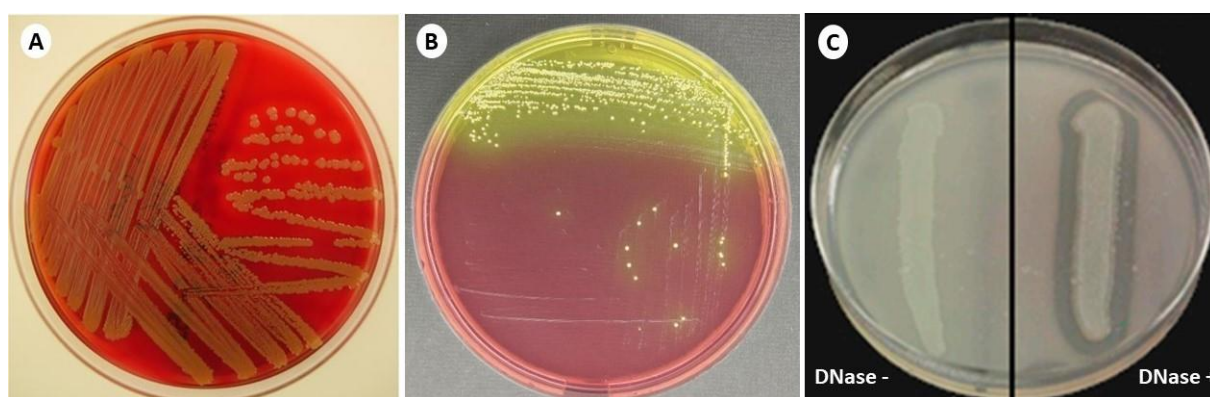
De acordo com retrospectiva realizada no estudo de Lakhundi e Zhang (2018), *S. aureus* foi descoberto em 1880 pelo cirurgião Alexander Ogston, havendo sido isolado de pacientes com feridas ulceradas (OGSTON, 1881). Em 1882, Ogston denominou o termo *Staphylococcus* para o gênero (OGSTON, 1882), e em 1884 Rosenbach dividiu o gênero para duas espécies, *S. aureus* e *S. albus* (COWAN; SHAW; WILLIAMS, 1954). Estas designações permaneceram até 1939, quando Cowan diferenciou *S. epidermidis* como uma espécie separada baseado no teste da coagulase (COWAN, 1939).

Embora o gênero *Staphylococcus* inclua 52 espécies e 28 subespécies, *S. aureus* é caracterizado como o mais relevante do ponto de vista clínico (LEE et al., 2018). Estes microrganismos demonstram-se na forma de células isoladas, pares, tétrades e cadeias curtas, porém aparecem predominantemente em grupos semelhantes a “cachos de uvas” (PROCOP et al., 2018). Nesse sentido, *S. aureus* é caracterizado por pertencer ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Bacillales, família *Staphylococcaceae*, sendo uma bactéria Gram positiva, medindo aproximadamente 1 µm de diâmetro, catalase e coagulase positiva, e que não apresenta motilidade (GUO et al., 2020; LAKHUNDI; ZHANG, 2018; LEE et al., 2018; PROCOP et al., 2018; STRAUME et al., 2021).

No que diz respeito a meios de cultura, em ágar sangue de carneiro as colônias de estafilococos são habitualmente lisas e butiráceas, exibindo um perfil convexo baixo, com borda contínua. As colônias de algumas cepas de *S. aureus* podem ter pigmento amarelo ou amarelo-

alaranjado, e exibir uma zona distinta ou difusa de  $\beta$ -hemólise. Além disso, em ágar sal manitol as colônias de *S. aureus* podem ser detectadas por uma zona amarela ao redor destas, decorrente da produção de ácido a partir do manitol. A inoculação em ágar DNase também pode ser utilizada para auxílio na identificação, tendo em vista a produção de desoxirribonuclease por *S. aureus* (Figura 1) (PROCOP et al., 2018).

Figura 1 - Perfil de crescimento e padrão bioquímico de *S. aureus* em meios de cultura habituais.



Cultura de *S. aureus* em (A) Ágar sangue, (B) Ágar sal manitol e (C) Ágar DNase. Adaptado de Alhussein et al. (2020), Ramandinianto, Khairullah e Effendi (2021), e Zigo et al. (2022).

### 2.3 Colonização e condições clínicas infecciosas

*S. aureus* pode ser encontrado em diferentes sítios anatômicos, como na pele, reto, vagina, trato gastrointestinal e axilas, sendo as narinas anteriores o principal reservatório. A partir de um sítio comensal cutâneo, *S. aureus* pode entrar em contato com a mucosa nasal, e se propagar para as narinas anteriores, de forma que o hospedeiro se torne um portador nasal deste microrganismo (SAKR et al., 2018). Aproximadamente 20% da população humana está permanentemente colonizada por *S. aureus*, 20% são considerados não portadores e 60% pertencem ao grupo de portadores intermitentes (LAUX; PESCHEL; KRISMER, 2019).

Esta bactéria é caracterizada como um patógeno oportunista humano, a qual pode causar diversos tipos de condições clínicas (Tabela 2), podendo gerar infecções de pele e tecidos moles, bem como infecções invasivas e mediadas por toxinas (BOSWIHI; UDO, 2018). Tendo em vista que *S. aureus* frequentemente está presente na microbiota humana, a colonização por este microrganismo aumenta de forma significativa as chances deste se tornar patogênico (LAKHUNDI; ZHANG, 2018).



Tabela 2 - Manifestações clínicas da infecção por *S. aureus*.

<b>Fonte da Infecção</b>	<b>Doença</b>
Pele e tecidos moles	Foliculite, impetigo, furúnculos, carbúnculos, abscessos, celulite, fasciite, piomiosite, hidradenite supurativa, mastite, infecções de feridas cirúrgicas e traumáticas.
Dispositivo biomédico	Cateter intravascular e cateter urinário.
Intravascular	Bacteremia, sepse, tromboflebite séptica, pericardite e endocardite infecciosa.
Osso e articulações	Osteomielite séptica e artrite séptica.
Respiratório	Pneumonia, empiema, sinusite e otite média.
Outras infecções invasivas	Meningite e infecção do espaço cirúrgico.
Mediada por toxina	Síndrome do choque tóxico estafilocócico, intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada estafilocócica e impetigo bolhoso.

Adaptado de Zurita, Mejía e Guzmán-Blanco (2010) e Procop et al. (2018).

A princípio, as doenças causadas por *S. aureus* podem ser distinguidas entre infecções piogênicas e/ou sistêmicas, e doenças mediadas por toxinas. As infecções de pele e tecidos moles são as condições clínicas mais comuns, variando de infecções na epiderme (por ex., impetigo), infecção da derme superficial e profunda (por ex., foliculite, furúnculos e carbúnculos), e infecções de tecidos subcutâneos (por ex., celulite e fasciite necrosante). Dentre as consequências de infecção por *S. aureus*, a síndrome da sepse estafilocócica é a mais temida em cenário comunitário e na bacteremia nosocomial, que pode ser adicionalmente complicada por infecções metastáticas (por ex., osteomielite hematogênica e artrite séptica) e endocardite de válvulas nativas e prostéticas (BECKER, 2018).

Em relação as doenças mediadas por toxinas, compreendem de forma geral a síndrome do choque tóxico estafilocócico menstrual e não menstrual, causada pela toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e algumas enterotoxinas estafilocócicas (SEs), principalmente por SEB e SEC; intoxicação alimentar causada por SE (SFP), e a síndrome da pele escaldada causada por toxinas esfoliativas (ETs) (BECKER, 2018). O impetigo bolhoso também é causado por ET, a diferença consiste que na síndrome da pele escaldada as toxinas se espalham por via hematogênica e produzem sintomas sistêmicos, em contraste a presença de toxinas localmente nos sítios de infecção na pele no impetigo bolhoso (JOHNSON, 2020).

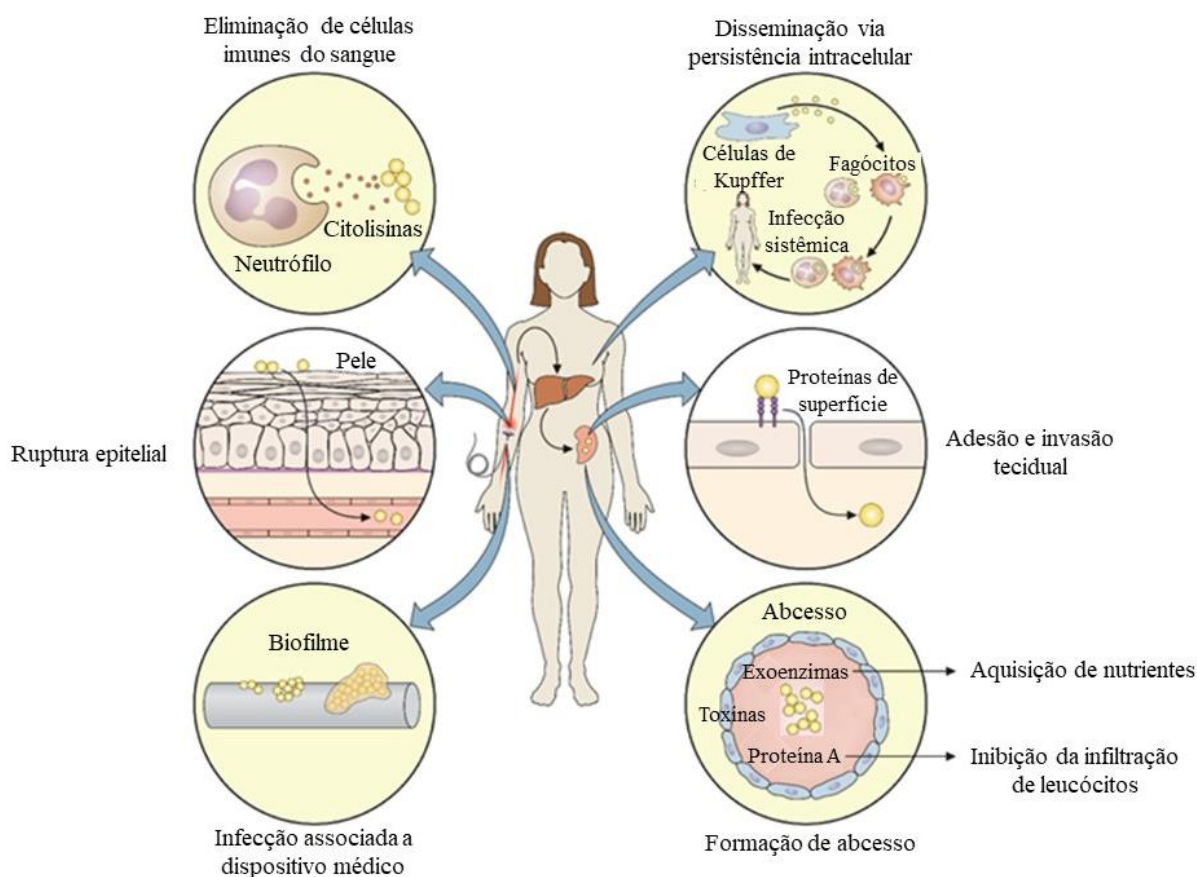
## 2.4 Mecanismos de virulência

*S. aureus* produz uma diversidade de fatores de virulência que lhe permite colonizar diversos nichos e sobreviver aos desafios impostos pelo sistema imunológico (RUDRA; BOYD, 2020). A regulação da virulência estafilocócica envolve circuitos que detectam sinais ambientais e influenciam na ativação de sistemas reguladores, os quais atuam sozinhos e em conjunto para modulação da expressão gênica. Além disso, *S. aureus* também responde à densidade celular por meio do *quorum sensing* (BALASUBRAMANIAN et al., 2017).

Há o interesse acerca da virulência de *S. aureus* desde que esta bactéria foi reconhecida pela primeira vez no século XIX, de forma que tem se desenvolvido esforços na pesquisa para elucidação dos mecanismos envolvidos (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021). Nesse contexto, a presença de cápsula, proteínas associadas à superfície (proteína A estafilocócica e fatores de agregação), toxinas extracelulares (hemolisinas, SEs, leucocidina Panton-Valentine, TSST e ETs), enzimas extracelulares (coagulase, estafiloquinase, nucleases, proteases e hialuronidasas), e produção de biofilme são caracterizados em importantes fatores de virulência para *S. aureus* (ALGAMMAL et al., 2020; MCCARTHY et al., 2015).

A infecção sistêmica por *S. aureus* frequentemente começa com a entrada da bactéria através de uma ruptura da barreira protetora da pele ou disseminação de um biofilme que pode se formar em dispositivos médicos. Na corrente sanguínea, este microrganismo pode atacar e eliminar células imunes, como por meio de toxinas citolíticas, ou persistir nessas células para atingir distribuição sistêmica. Na passagem pelo fígado, a bactéria é confrontada pela atividade fagocítica das células de Kupffer e, caso sobrevivam a este estágio, podem se distribuir em maior proporção pela corrente sanguínea, se ligar e invadir células do tecido, o que é mediado por proteínas de superfície. A formação subsequente de abscesso é afetada por diversos fatores bacterianos, que incluem proteínas de superfície específicas, toxinas e exoenzimas (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021) (Figura 2).

Figura 2 - Esquema representativo da infecção sistêmica por *S. aureus*.



Adaptado de Cheung, Bae e Otto (2021).

Diante disso, é também relevante destacar sobre o polissacarídeo capsular de *S. aureus*, o qual impede a interação entre o complemento C3b ou imunoglobulinas e os receptores das células fagocíticas (NASSER et al., 2019; O'RIORDAN; LEE, 2004). Ademais, é caracterizado que uma maior expressão de cápsula pode causar resistência mais acentuada a fagocitose não específica (NANRA et al., 2013; NASSER et al., 2019). É importante ressaltar, nesse sentido, que além dessa estratégia de evasão do sistema imune, esta bactéria dispõe da proteína A estafilocócica, a qual é reconhecida por se ligar a imunoglobulina do hospedeiro e interromper a resposta imunológica. Esta bloqueia efetivamente a hexamerização de IgG e subsequente ativação do complemento (CRUZ et al., 2021).

Para além disso, toxinas secretadas, como as que atuam na formação de poros e superantígenos, são altamente inflamatórias e podem causar a morte de células leucocitárias por citólise e deleção clonal, respectivamente. Exoenzimas, incluindo nucleases e proteases, clivam e inativam várias moléculas de defesa e vigilância imunológica. Coagulase e estafiloquinase

atuam como cofatores que sequestram o sistema de coagulação do hospedeiro. Adicionalmente, algumas toxinas e exoenzimas secretadas podem causar ruptura das barreiras endoteliais e epiteliais através da lise celular e clivagem de proteínas de junção (TAM; TORRES, 2019).

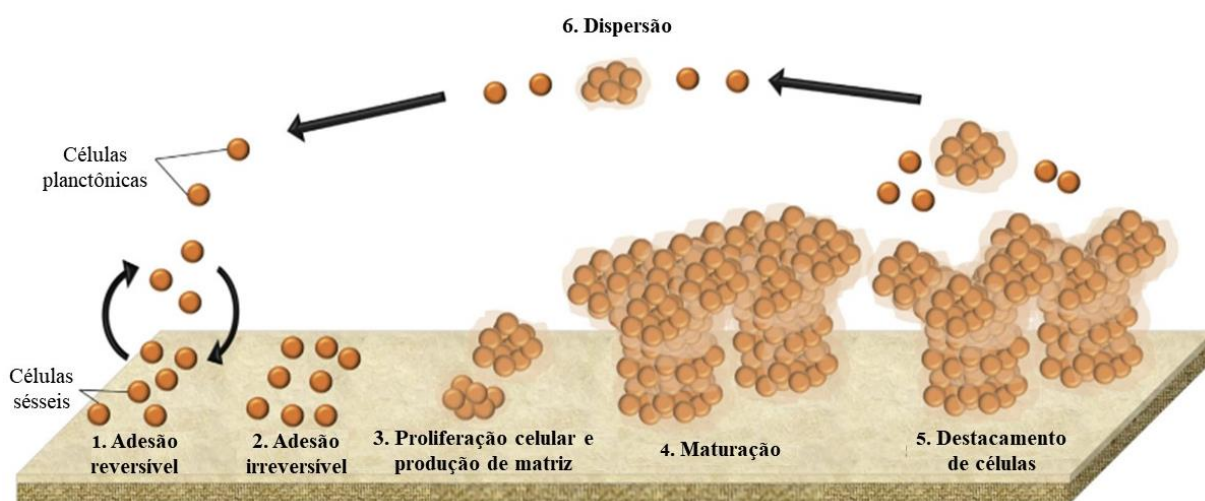
Associado a isso, os fatores de agregação A e B, proteínas de ligação ao fibrinogênio estruturalmente relacionadas e expressas na superfície de *S. aureus*, desempenham papel vital na patogênese e virulência (DEY et al., 2021). O fator de agregação A está associado a inibição da fagocitose (HIGGINS et al., 2006), bem como a promoção da ligação bacteriana a biomateriais e a tecidos do hospedeiro, permitindo que ocorra a colonização e formação de biofilme (HERMAN-BAUSIER et al., 2018).

No que diz respeito ao fator de agregação B, é descrito que este é responsável por mediar a ligação bacteriana aos corneócitos da cavidade nasal, sendo demonstrado que facilita a colonização neste sítio, além de estar relacionado a estrutura e formação de abscesso cutâneo e ser um determinante de virulência durante infecções de tecidos moles (LACEY et al., 2019).

Nesse contexto, também evidencia-se que a formação de biofilme é um pertinente fator para a virulência de *S. aureus* (VIJAYAKUMAR et al., 2020). Assim, biofilmes podem ser definidos em comunidades microbianas sésseis, organizadas e que estão protegidas por uma matriz extracelular (PARASTAN et al., 2020; SURESH; BISWAS; BISWAS, 2019). Infecções associadas a biofilmes são particularmente difíceis em relação ao manejo clínico, considerando que as bactérias presentes no interior da matriz são mais resistentes aos antimicrobianos e a resposta imune do hospedeiro (CRAFT et al., 2019). Nessa perspectiva, doenças relacionadas a dispositivos médicos, implantes, feridas crônicas, osteomielite, infecção pulmonar e endocardite podem surgir a partir da formação destas comunidades microbianas por *S. aureus* (PARASTAN et al., 2020).

O processo de formação do biofilme representado na Figura 3 é descrito por Vázquez-Sánchez e Rodríguez-López (2018), compreendendo (1) ligação reversível das células por interações fracas (por ex., força de Van der Waals) a uma superfície biótica ou abiótica; (2) adsorção irreversível à superfície por interações hidrofílicas/hidrofóbicas, forças eletrostáticas e interação ácido-base de Lewis mediadas por estruturas de fixação (por ex., proteínas adesivas); (3) proliferação de células adsorvidas e produção de matriz exopolissacarídica autoproduzida; (4) formação de um biofilme maduro, contendo canais de água que efetivamente distribuem nutrientes e moléculas sinalizadoras no interior do biofilme; (5) desprendimento das células do biofilme individualmente ou em aglomerados; e, por fim, (6) disseminação e colonização de outros nichos.

Figura 3 - Estágios de formação do biofilme.



Adaptado de Vázquez-Sánchez e Rodríguez-López (2018).

A resistência a antibióticos e a capacidade de formação de biofilme contribuem para o sucesso de *S. aureus* como patógeno humano em ambientes de saúde e comunitários, de forma que o fenótipo do biofilme expresso por isolados clínicos deste microrganismo é influenciado pela aquisição do gene de resistência à meticilina *mecA*. As cepas de *S. aureus* sensíveis a meticilina geralmente produzem um biofilme dependente de adesina polissacarídica intracelular. Em contraste, a liberação de DNA extracelular, expressão na superfície celular de proteínas ancoradas na sortase e a principal autolisina (Atl) foram implicadas no fenótipo de biofilmes de SARM (MCCARTHY et al., 2015).

Nessa perspectiva, bombas de efluxo também têm sido relatadas como um dos mecanismos responsáveis pela resistência antimicrobiana em estruturas de biofilme (SOTO, 2013). Na literatura, se tem descrito pesquisas acerca da inibição da bomba de efluxo NorA de *S. aureus* gerando conseqüente influência sobre biofilme (MAHEY et al., 2021; ZIMMERMANN et al., 2019).

## 2.5 Epidemiologia

Diversos estudos corroboram a expressiva relevância epidemiológica de *S. aureus*, destacando a crescente disseminação da resistência à meticilina. A exemplo disso, em avaliação realizada pelo Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY, foram coletados 191,460 isolados clínicos de *S. aureus* em 427 centros médicos de 45 países em um período de 20 anos. Foi observado que 77,146 isolados (40,3%) eram SARM, variando geograficamente de 47,0%

na América do Norte, 38,7% na América Latina, 39,6% na Ásia-Pacífico, e 26,8% na Europa (DIEKEMA et al., 2019).

Nesse sentido, a colonização nasal por *S. aureus* é um fator de risco para a transmissão e desenvolvimento de infecções. Assim, conhecer a prevalência de colonização por este microrganismo é de vital importância. Em estudo de Chen et al. (2020) foi realizada uma análise transversal em pacientes pediátricos na UTI de seis hospitais terciários em Taiwan, de forma que foi verificada colonização nasal por *S. aureus* em 26,3% dos indivíduos, dos quais 17,5% correspondiam a SARM.

Em pesquisa de Soares et al. (2018) foi investigada a prevalência de *S. aureus* entre pessoas vivendo com HIV/SIDA acompanhadas em ambulatório terciário do estado de Pernambuco, Brasil, de maneira que *S. aureus* foi isolado em 31,4% dos indivíduos, em que 4,4% eram SARM. Em estudo realizado por Da Silva et al. (2020) na Bahia, Brasil, foram analisadas as características epidemiológicas de *S. aureus* entre profissionais de saúde de um hospital terciário, sendo verificado que dentre 240 amostras bacterianas coletadas, aproximadamente 75% foram caracterizadas como *S. aureus*, e dentre estas, 16,9% dos isolados foram reconhecidos como SARM.

A notável versatilidade de *S. aureus* envolvendo patogênese e resistência se perpetua por fatores geográficos e temporais, refletindo nas mudanças epidemiológicas de SARM, que após décadas prevalecendo em ambientes de saúde, têm surgido na comunidade (ROMERO; DA CUNHA, 2021). Nesse sentido, Wang et al. (2019) investigou a prevalência deste microrganismo em isolados adquiridos na comunidade, os quais foram recuperados de pacientes pediátricos com infecções de pele e tecidos moles em Xangai, China, sendo detectado que 45,1% dos isolados de *S. aureus* apresentavam resistência à metilina. Em análise retrospectiva realizada em um hospital geral de São Paulo, Brasil, foi verificado que de 64 pacientes pediátricos confirmados com infecção por *S. aureus*, 17,2% obtiveram SARM adquirido na comunidade (PENTEADO et al., 2019).

Em relação ao cenário nosocomial, estudo realizado por Adeyanju et al. (2022) em hospital de ensino da Nigéria, África, coletou amostras das narinas anteriores, focos infecciosos de pacientes após 48h de admissão e quando clinicamente indicado. Dentre 325 pacientes, 15,4% portavam isolados de *S. aureus* sensíveis à metilina na admissão, enquanto 3,7% portavam SARM. A taxa bruta de infecção nosocomial por *S. aureus* foi 14,5%, sendo definidas as densidades de infecção hospitalar em 35,4 e 6,2 por 1000 pacientes/dia para cepas sensíveis

e resistentes à meticilina, respectivamente. Dentre as infecções hospitalares (47), predominaram as associadas a pele e tecidos moles (40,4%), e ossos ou articulações (25,5%).

Em Minas Gerais, Brasil, foi realizado estudo em hospitais acerca da prevalência de infecções associadas à assistência à saúde em 28 UTIs adulto, de modo que dentre os Gram positivos isolados, *S. aureus* foi obtido de 39,1% destes, com dados relatados de resistência à oxacilina (SARM) em 45% (BRAGA et al., 2018). Diante deste cenário, é também importante destacar que com a pandemia de COVID-19 foi demonstrado que *S. aureus* apresentou suscetibilidade reduzida a medicamentos comumente prescritos, como tetraciclina, cefoxitina e linezolida, de acordo com Saini et al. (2021), o qual verificou amostras de isolados bacterianos obtidos de pacientes com SARS-CoV-2 internados em UTI de hospital terciário em Delhi, Índia.

Neste contexto, igualmente importante à crescente resistência aos antibióticos, se tem a problemática da formação de biofilmes por *S. aureus*, em que dada a capacidade destes de proteger bactérias de ambientes hostis, o biofilme acrescenta um nível adicional de complexidade ao problema da resistência antimicrobiana (CRAFT et al., 2019). Além disso, biofilmes são reconhecidos por aumentarem as taxas de morbidade, mortalidade e custos, ocorrendo frequentemente em dispositivos médicos, como cateteres intravasculares (ASSEFA; AMARE, 2022).

Diante disso, membros do Consórcio Internacional de Controle de Infecção Hospitalar realizaram estudo prospectivo acerca das taxas de infecção de corrente sanguínea relacionadas a cateter venoso periférico de curta duração em 100 UTIs de 41 hospitais em 9 países da América Latina (2010 – 2018), sendo verificado que bactérias Gram positivas correspondiam em 49,2% no perfil de microrganismos associados a estas infecções, com *S. aureus* representando 7,8% (ROSENTHAL et al., 2021).

Na região central do Brasil, uma avaliação retrospectiva de Yoshida et al. (2019) averiguou a densidade de infecções de corrente sanguínea associadas a cateter venoso central em UTIs adulto e pediátrica de um hospital de doenças infecciosas e dermatológicas. Nesse sentido, bactérias Gram positivas representaram aproximadamente 30% dos microrganismos isolados, com destaque para *S. aureus*. Assim, tendo em vista a notável resistência de biofilmes a antibióticos (SINGH et al., 2022), estudos são necessários acerca das alternativas farmacológicas.

## 2.6 Tratamento farmacológico convencional

As infecções estafilocócicas são um problema clínico comum e significativo na prática médica, em que a maioria das cepas de *S. aureus* caracterizam-se como resistentes a penicilina, e os isolados de SARM são comuns em hospitais e estão surgindo na comunidade (RAYNER; MUNCKHOF, 2005).

Em relação aos fármacos utilizados para o tratamento de infecções por cepas de *S. aureus* sensíveis à meticilina, inclui-se penicilinas resistentes a penicilinase (benzilpenicilina é um agente terapêutico efetivo para os isolados não produtores de penicilinase), podendo ser de escolha pra infecções graves, ou alternativamente associado a inibidores de  $\beta$ -lactamase. Cefalosporinas de primeira geração (cefazolina, cefalotina e cefalexina), clindamicina, lincomicina e eritromicina possuem importante papel em infecções com baixa gravidade. Os carbapenêmicos são usados ocasionalmente para tratar isolados de *S. aureus* sensíveis à meticilina em infecções mistas, mas, em geral, devem ser considerados como agentes de reserva para o tratamento de infecções estafilocócicas (RAYNER; MUNCKHOF, 2005).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são caracterizados em uma família de fármacos estruturalmente relacionados contendo o anel  $\beta$ -lactâmico em sua estrutura química, sendo classificados de forma geral em penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. O mecanismo de ação destes encontra-se na inibição da atividade catalítica de transpeptidases através da ligação a proteína de ligação a penicilina (PBP), gerando a consequente inibição da síntese da parede celular bacteriana (LIMA et al., 2020). Além disso, ressalta-se a combinação a inibidores de  $\beta$ -lactamase, como amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina/sulbactam e piperacilina/tazobactam (CARCIONE et al., 2021).

No que diz respeito as lincosamidas, constituem um pequeno grupo de antibióticos, de forma que a lincomicina faz parte dos membros naturais desta classe, sendo a clindamicina o derivado semissintético clorado desta. Estes fármacos exibem espectro de atividade semelhante e compartilham o mecanismo de inibição da síntese proteica, atuando especificamente na subunidade 50S do ribossomo bacteriano, afetando o processo de iniciação da cadeia peptídica, podendo também estimular a dissociação do peptidil-RNAt dos ribossomos (SPÍŽEK; ŘEZANKA, 2017).

Embora a estrutura dos macrolídeos seja diferente, seu mecanismo é semelhante ao descrito anteriormente. A ligação da eritromicina com RNAr 23S bloqueia a tradução do polipeptídeo, gerando liberação prematura de intermediários peptidil-RNAt e por conseguinte



atua interferindo no processo de alongação da cadeia peptídica (SPÍŽEK; ŘEZANKA, 2017). Diante disso, destaca-se também os fármacos para o tratamento de infecções por SARM.

No que concerne a terapêutica de infecções causadas em pele e tecidos moles por SARM, vancomicina, daptomicina e linezolida podem ser utilizados em quadros graves. Clindamicina, sulfametoxazol/trimetoprim e doxiciclina são escolhas alternativas para condições leves a moderadas, a depender da suscetibilidade apresentada pelo isolado. Para abscessos cutâneos não complicados, o uso de clindamicina ou sulfametoxazol/trimetoprim associado a incisão e drenagem constitui uma alternativa (BAL et al., 2017; LEE et al., 2018).

Em um cenário de infecção associada a presença de dispositivo médico, a orientação geralmente requer a sua remoção, quando possível (LEE et al., 2018). Em relação a infecções sistêmicas e graves, as recomendações atuais incluem vancomicina ou daptomicina intravenosa para bacteremia, e vancomicina ou linezolida intravenosa para pneumonia adquirida no hospital (BAL et al., 2017; LEE et al., 2018).

A vancomicina e teicoplanina, fármacos naturais pertencentes a classe dos glicopeptídeos, ligam-se de forma não covalente a porção C-terminal D-Ala-D-Ala do precursor do peptidoglicano, atuando de modo a protegê-lo da ação da enzima transpeptidase. Além disso, o complexo glicopeptídeo-D-Ala-D-Ala impede estericamente o posicionamento da enzima transglicosilase. Nesse sentido, tanto as etapas de transglicosilação quanto a transpeptidação durante a biossíntese da parede celular são inibidas, prevenindo ligações cruzadas adicionais, o que leva a um enfraquecimento do peptidoglicano, deixando as bactérias suscetíveis à lise devido a alterações na pressão osmótica (SARKAR; HALDAR, 2020).

No que diz respeito a daptomicina, é um antibiótico lipopeptídeo cíclico e está funcionalmente relacionada a peptídeos antimicrobianos catiônicos. Este fármaco se insere na membrana celular de maneira dependente de  $Ca^{2+}$ , resultando na despolarização da membrana, gerando subsequente perda de componentes intracelulares (HEIDARY et al., 2018). Em contrapartida, a linezolida, pertencente a classe oxazolidinona, atua bloqueando a formação do complexo de iniciação durante a síntese proteica, impedindo a tradução do RNAm (BIALVAEI et al., 2017).

Ademais, a associação sulfametoxazol/trimetoprim é uma combinação sinérgica amplamente utilizada para o tratamento de infecções. Estas substâncias atuam sobre etapas sequenciais da via biossintética do ácido tetraidrofólico (THF). Nesse sentido, o sulfametoxazol é um análogo estrutural do ácido p-aminobenzóico e atua inibindo a síntese do ácido diidrofólico. O trimetoprim, por outro lado, é um análogo da porção pteridina do ácido

diidrofólico e compete pela diidrofolato redutase (DHFR), inibindo a produção do THF. Consequentemente, o trimetoprim potencializa o sulfametoxazol (MINATO et al., 2018; PALOMINO; MARTIN, 2016).

Em relação a doxiciclina, é pertencente ao grupo de antibióticos conhecido como tetraciclina, que tem seu mecanismo voltado para o bloqueio da síntese proteica através da ligação ao RNAr 16S e da inibição da ligação de aminoacil-RNAt ao complexo RNAm-ribossomo (CHUKWUDI; GOOD, 2019).

Diante disso, além da terapêutica utilizada no manejo clínico considerando o tratamento direcionado para células planctônicas, é importante destacar que para biofilmes de *S. aureus* a remoção física da fonte de infecção e o tratamento com antibióticos são os únicos métodos atualmente utilizados, porém nem sempre são bem sucedidos na erradicação da infecção (BHATTACHARYA et al., 2015).

## **2.7 Desenvolvimento de resistência por *Staphylococcus aureus***

Clinicamente, um relevante problema associado a *S. aureus* diz respeito a aquisição de resistência contra múltiplas classes de antibióticos, complicando o manejo clínico (LAKHUNDI; ZHANG, 2018). Tendo em vista uma perspectiva histórica, em 1942, dois anos após a introdução da penicilina, foi verificada resistência por isolados de *S. aureus* (LAKHUNDI; ZHANG, 2018; RAMMELKAMP; MAXON, 1942). Estas cepas são reconhecidas por produzir uma lactamase codificada por plasmídeo (penicilinase), a qual é capaz de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico da penicilina, tornando o fármaco inativo (CRAFT et al., 2019).

Diante disso, um  $\beta$ -lactâmico semissintético resistente a penicilinase foi desenvolvido e introduzido na clínica em 1959, denominado meticilina. No entanto, em 1960 foram observados os primeiros relatos de isolados de SARM (JEVONS, 1961; PEACOCK; PATERSON, 2015). A resistência a este fármaco é mediada pelo gene *mecA* e é adquirida pela transferência horizontal de um elemento genético móvel, o cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*). O gene *mecA* codifica a proteína de ligação a penicilina 2a (PBP2a), a qual possui menor afinidade de ligação por  $\beta$ -lactâmicos, resultando em resistência a essa classe (TURNER et al., 2019).

Destaca-se que, enquanto a resistência associada a  $\beta$ -lactamase é um mecanismo de espectro estreito, sendo apenas penicilina inativada por esta enzima, a resistência à meticilina

devido à expressão de PBP2a é relacionada a um amplo espectro de resistência, incluindo  $\beta$ -lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (CRAFT et al., 2019).

Tendo em vista este cenário, a vancomicina tem sido usada como o padrão ouro no tratamento de infecções invasivas por SARM, e assim, a dependência da vancomicina como o tratamento principal contra essas infecções levou em uma redução da suscetibilidade a este fármaco em isolados de SARM (MORRISETTE et al., 2020), de forma que cepas de *S.aureus* intermediário a vancomicina (VISA) e *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) tem emergido entre espécimes clínicos (GHAHREMANI; JAZANI; SHARIFI, 2018).

A resistência a vancomicina desenvolveu-se lentamente após sua introdução em 1958, possivelmente relacionado ao limitado uso desta substância até a década de 1980 (GIULIERI; TONG; WILLIAMSON, 2020). No entanto, já em 1996 se tem reportado isolado de SARM com sensibilidade reduzida a vancomicina (HIRAMATSUA et al., 1997).

A resistência a vancomicina por *S. aureus* é conferida pelo agrupamento de genes *vanA*, que está associado a ligação entre D-Lac e D-Ala para produção de D-Ala-D-Lac na síntese de peptidoglicano. Tendo em vista que o alvo de ação da vancomicina são as porções terminais D-Ala-D-Ala, a modificação para D-Ala-D-Lac leva a uma diminuição de quase 1000 vezes na afinidade com a vancomicina (CONG; YANG; RAO, 2020).

Agravante a esta questão, embora a daptomicina se configure em outra alternativa terapêutica, foi demonstrado que o desenvolvimento de resistência a vancomicina pode levar a não suscetibilidade a daptomicina (MORRISETTE et al., 2020; THITIANANPAKORN et al., 2020). A redução da suscetibilidade cruzada de SARM a daptomicina e vancomicina está associada a mutações no *Multiple peptide resistance factor (mprF)*, mediada principalmente pela alteração da carga superficial bacteriana e aumento da produção de lisil-fosfatidilglicerol, enquanto o aumento da espessura da parede celular também está envolvido (THITIANANPAKORN et al., 2020). Nesse sentido, a terapia combinada tem sido uma alternativa proposta neste cenário de resistência (MORRISETTE et al., 2020).

## **2.8 Novas estratégias terapêuticas**

O demorado processo para a descoberta de medicamentos convencionais, correspondente a aproximadamente 20 anos para a chegada ao mercado, e os custos exorbitantes (cerca de \$ 5 bilhões) demandam a utilização de estratégias alternativas e menos dispendiosas (KAUL et al., 2019). Nesse sentido, pesquisadores começaram a propor e implementar meios

inovadores para redução de tempo e custos no desenvolvimento de medicamentos (KIRIENKO; RAHME; CHO, 2019).

O reposicionamento ou redirecionamento de medicamentos já aprovados é uma abordagem que tem ganhado destaque, baseando-se na hipótese de que os compostos podem ter novos mecanismos de ação para os quais ainda não se desenvolveu resistência. Além disso, associar duas ou mais substâncias com modos de ação diferentes ou sinérgicas se caracteriza em uma alternativa para melhorar a eficácia dos esquemas de antibióticos disponíveis e aumentar a taxa de sucesso do reposicionamento de drogas (KIRIENKO; RAHME; CHO, 2019).

Assim, o objetivo do reposicionamento de medicamentos é determinar novas indicações clínicas, estabelecendo novas oportunidades para desenvolvimento de fármacos com menor demanda financeira (HUA et al., 2022). Diante deste contexto, é também ressaltado o propósito em encontrar novas relações droga-doença, de forma que vários métodos foram desenvolvidos com este intuito, incluindo metodologias computacionais, métodos experimentais biológicos e a combinação de ambos, sendo a abordagem associada reconhecida por melhorar a eficiência do reposicionamento de medicamentos (HUA et al., 2022; XUE et al., 2018).

A abordagem *in silico* é uma útil estratégia para a identificação de oportunidades neste âmbito, em que a análise computacional baseada em *molecular docking* tem sido adotada para a descoberta de novos antimicrobianos (FARHA; BROWN, 2019). Nesse sentido, *molecular docking* caracteriza-se em um método que envolve estudo do reconhecimento e interações moleculares, além de avaliação da conformação de um complexo receptor-ligante (AGNIHOTRY et al., 2020).

Ademais, tendo em vista a capacidade de *S. aureus* em formar biofilmes (CRAFT et al., 2019) e o aumento do uso de implantes médicos, há preocupação para o concomitante surgimento de infecções relacionadas a esses dispositivos por biofilme de *S. aureus*, comumente associado a superfícies artificiais, incluindo próteses ortopédicas, válvulas cardíacas, marcapassos e cateteres vasculares (BHATTACHARYA et al., 2015).

A fim de prevenir a formação de biofilme, metodologias foram desenvolvidas para obtenção de biomateriais anti-infecciosos, compreendendo superfícies anti-incrustantes que repelem microrganismos por meio de modificações físico-químicas e abordagens que utilizam revestimentos antimicrobianos capazes de interferir em vias biológicas (RICARDO et al., 2020). A exemplo disso, Lorente et al. (2014) verificou que cateteres impregnados com clorexidina-sulfadiazina de prata reduziram a incidência de infecções de corrente sanguínea

relacionadas a cateteres e custos associados a cateter venoso central. Desse modo, a impregnação de cateteres pode fornecer uma alternativa terapêutica na prevenção de infecções.

## **2.9 Alvos promissores na pesquisa de antibacterianos frente *Staphylococcus aureus***

A maioria dos antibióticos em uso clínico visa de forma seletiva um ou mais processos bioquímicos essenciais para a viabilidade de *S. aureus*, por exemplo, síntese da parede celular, síntese de proteínas, replicação de DNA, síntese de RNA ou processos metabólicos, como síntese de ácido fólico. Ademais, componentes de outros processos celulares fundamentais também têm sido sugeridos como alvos para novos antibióticos no tratamento de infecções por *S. aureus* (LADE; KIM, 2021).

Diante disso, alvos tem sido propostos desde o processo de divisão celular, como por Rangunathan et al. (2019) utilizando a proteína FtsA, caracterizada por atuar ancorando a proteína FtsZ à membrana citoplasmática. O processo é iniciado com FtsZ, o qual é polimerizado em uma estrutura denominada anel Z e atua formando o complexo de divisão celular. Nesse sentido, a atividade de FtsZ está sujeita à regulação, de modo que FtsA atua como fator estabilizador (TRIPATHY; SAHU, 2019). As interações proteína-proteína, como ocorre entre FtsZ e FtsA, são vitais para a sobrevivência bacteriana e, portanto, apresentam potencial para a identificação de novos agentes antimicrobianos (BELETE, 2019).

A enzima DHFR é considerada, também diante deste contexto, foco de pesquisa tendo em vista a importância em múltiplas funções celulares, como em vias biossintéticas de purinas, timidina, metionina, glicina, ácido pantotônico e N-formil-metionina tRNA, sendo responsável pela catálise do NADPH redução dependente de diidrofolato a THF (SAHASRABUDHE et al., 2017). Nesse sentido, DHFR atua na tradução do DNA, transcrição de RNA, replicação de proteínas e no controle da proliferação celular, havendo assim potencial desta enzima para descoberta de novos agentes antibacterianos (HE et al., 2020).

Em especial, no que diz respeito ao DNA, é amplamente destacado como alvo de antimicrobianos (BOLHUIS; ALDRICH-WRIGHT, 2014), tendo em vista que regula muitos processos bioquímicos que ocorrem no sistema celular, e que há conexão de que uma molécula que interage com o DNA também exibe grandes atividades biológicas, com relatado por Meti et al. (2017), o qual realizou estudo de *molecular docking* com o PDB 453D.

Também neste âmbito, as enzimas topoisomerases são alvos bem conhecidos, realizando mudanças na topologia do DNA, troca da forma superenovelada e relaxada do DNA, desempenhando papel essencial na replicação, transcrição e outros processos celulares. Com

base em seu alvo, estas enzimas são divididas em dois tipos, a topoisomerase I, a qual realiza quebra transitória de uma fita de DNA, enquanto a topoisomerase II corta ambas as fitas. Nesse sentido, bactérias possuem duas enzimas semelhantes à estrutura da topoisomerase II, denominadas DNA girase e topoisomerase IV (DIGHE; COLLET, 2020). Atualmente, a classe das fluoroquinolonas atua na inibição da DNA girase bacteriana por meio da estabilização do complexo covalente enzima-DNA, no entanto, com o avanço da resistência, a pesquisa sobre o desenvolvimento de uma nova classe de inibidores da DNA girase se faz necessária (DIGHE; COLLET, 2020; DURDAGI et al., 2018).

Além disso, no que concerne ao RNA, aminoacil-tRNA-sintetases (ARSs), enzimas essenciais envolvidas na síntese de proteínas, têm sido ressaltadas considerando a possibilidade de geração de agentes anti-infecciosos eficazes com base em diferenças estruturais nas fendas catalíticas de ARSs entre patógenos e humanos (KWON; FOX; KIM, 2019). A tirosil-tRNA sintetase (TyrRS), pertencente a classe I da família RNAt sintetase, catalisa a aminoacilação do RNAt e tem papel essencial na biossíntese de proteínas. Devido ao fato de ser altamente conservada entre procariontes e a inibição destas enzimas ser prejudicial para as células, é considerada um alvo adequado para o desenvolvimento de antibióticos de largo espectro (SUN; LV; ZHU, 2017).

Outro aspecto a ser considerado diz respeito ao apontado por Naclerio e Sintim (2020), para o qual a maioria dos antimicrobianos aprovados que tem como alvo membrana celular e síntese da parede celular visam apenas uma pequena fração de proteínas. Muitas outras macromoléculas estão ligadas a estes componentes e também são importantes para a virulência e/ou crescimento bacteriano, tornando-as excelentes alvos para novos agentes antimicrobianos.

Nesse sentido, a PBP2a constitui o principal mecanismo pelo qual o SARM exhibe sua resistência devido à sua conformação de sítio ativo fechado, que coloca o resíduo Ser 403 em um canal estreito e inacessível para a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos. O direcionamento para seu sítio ativo, sítio alostérico ou ambos, propõe uma abordagem atraente para projetar novos antibacterianos para infecções por SARM. Como exemplo, a ceftarolina, cefalosporina de quinta geração, supera essa resistência por sua capacidade de se ligar ao sítio alostérico de maneira covalente, levando a mudanças conformacionais que culminam na abertura do sítio ativo, inibição de PBP2a e bloqueio da síntese da parede celular (SHALABY et al., 2020).

Também se tem descrito na literatura acerca de estratégias contra a virulência para combate da resistência a terapia antibiótica convencional. A estafiloxantina é um pigmento carotenóide amarelo conhecido por sua capacidade de atuar como antioxidante (ELMESSERI

et al., 2022), estando associado a fluidez da membrana celular, bem como à sua estabilização, alterando a composição química e atividade funcional, sendo um importante fator de virulência para *S. aureus* (XUE et al., 2019). A *dehydrosqualene synthase*, que catalisa a primeira etapa da via biossintética da estafiloxantina, mostrou-se um alvo para a terapia anti-infecciosa baseada na neutralização do fator de virulência (GAO; DAVIES; KAO, 2017).

Relacionado a esse contexto, a enzima manitol-1-fosfato desidrogenase é referida por Nguyen et al. (2019) como chave no metabolismo do manitol por *S. aureus*, tendo em vista que o manitol é necessário para manter o redox celular e potencial osmótico, de forma que um inibidor ou nocaute no gene que codifica esta enzima resulta em morte celular por citólise oxidativa e/ou dependente de manitol.

No âmbito de terapias anti-virulência também se destaca o direcionamento para toxinas formadoras de poros, estando a leucocidina Panton-Valentine e  $\alpha$ -hemolisina dentre as principais (FORD; HURFORD; CASSAT, 2021). A leucocidina Panton-Valentine tem como alvo neutrófilos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos, de maneira que os poros gerados na membrana causam efluxo do conteúdo celular, levando à lise. A atividade citotóxica aos leucócitos permite que as bactérias infectantes sobrevivam dentro do organismo hospedeiro durante os primeiros estágios da infecção, também sendo descrito que esta toxina, em baixas concentrações, pode estimular neutrófilos para aumentar a produção de fatores pró-inflamatórios (NAWROTEK; KARAKULSKA; FIJAŁKOWSKI, 2018).

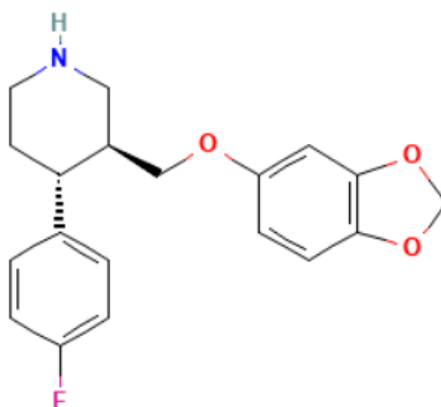
Com relação à  $\alpha$ -hemolisina, pode atuar contra uma ampla gama de células hospedeiras, incluindo eritrócitos, células epiteliais, células endoteliais, células T, monócitos e macrófagos (TAVARES et al., 2014). Além disso, é reconhecida por induzir agregação plaquetária e lesão hepática durante a sepse por *S. aureus* (SUREWAARD et al., 2018), também sendo um dos principais determinantes de virulência implicados na patogênese de condições associadas a infecções graves de pele e tecidos moles, e pneumonia necrotizante (TAVARES et al., 2014).

## 2.10 Paroxetina

A paroxetina é um potente ISRS, interagindo competitivamente com o mecanismo de transporte ativo do neurotransmissor na membrana neuronal, resultando no acúmulo de serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) na fenda sináptica e, dessa forma, atua na facilitação da transmissão serotoninérgica (DECHANT; CLISSOLD, 1991; GUNASEKARA; NOBLE; BENFIELD, 1998). Este derivado de fenilpiperidina tem pouca afinidade pelos sistemas catecolaminérgicos, dopaminérgicos ou histaminérgicos (BOURIN; CHUE; GUILLON, 2001).

No que diz respeito à estrutura (Figura 4), a paroxetina é composta por uma amina secundária que reside no anel de piperidina, que por sua vez está ligado aos grupos benzodioxol e fluorofenil. Possui fórmula química de  $C_{19}H_{20}FNO_3 \cdot HCl \cdot 1/2H_2O$  (PubChem CID: 43815), peso molecular correspondente a 329,4 g/mol, e ponto de fusão entre 120 e 138°C (KOWALSKA et al., 2021).

Figura 4 – Representação estrutural da paroxetina.



Fonte: PubChem

Em relação aos parâmetros farmacocinéticos, a paroxetina demonstra ser bem absorvida após administração oral. Em voluntários saudáveis, o estado estacionário foi alcançado após 7 a 14 dias em que receberam 30 mg/dia, com uma concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ) de 62  $\mu\text{g/L}$  atingida após 5 a 6 horas. Além disso, a paroxetina tem grande volume de distribuição (3 a 12 L/kg) após bolus intravenoso de 5 a 10 mg, porém apenas cerca de 1% da dose administrada permanece livre no plasma. É extensamente metabolizada no fígado, principalmente pela isoenzima 2D6 do citocromo P450 (CYP), e possui meia-vida de eliminação de aproximadamente 21 horas, sendo excretada principalmente pela via urinária (WAGSTAFF et al., 2002).

As indicações descritas para a paroxetina na literatura incluem tratamento para depressão, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno do pânico, fobia social, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno disfórico pré-menstrual e cefaleia crônica (BOURIN; CHUE; GUILLON, 2001; KOWALSKA et al., 2021). A dose recomendada de paroxetina é de 20 mg/dia em pacientes adultos, porém, esta pode ser



ajustada conforme a necessidade, a depender da resposta e tolerabilidade do paciente, dentro da faixa terapêutica de 20 a 50 mg/dia (DECHANT; CLISSOLD, 1991).

Estudos relatam a atividade antimicrobiana da paroxetina, como avaliado por Nobile et al. (2020), Costa Silva et al. (2017), Young et al. (2003) e Lass-Florl et al. (2001) frente *Candida* spp., Pereira et al. (2021) em *Cryptococcus neoformans*, Young et al. (2003) e Lass-Florl et al. (2001) contra *Aspergillus* spp., Muñoz-Bellido; Muñoz-Criado e García-Rodríguez (1996) frente *Corynebacterium urealyticum*, Foletto et al. (2020) e Foletto et al. (2021a) em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus*. Neste contexto, a paroxetina é alvo de pesquisa no âmbito do reposicionamento de fármacos (FOLETTTO et al., 2021a).

Diante disso, tendo em vista os relatos da atividade antibacteriana da paroxetina na literatura, o presente trabalho teve por finalidade avaliar a ação deste fármaco em células planctônicas, com elucidação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade contra *S. aureus*, bem como o potencial da paroxetina isolada e associada a oxacilina frente biofilme formado, em formação e avaliação sobre capacidade de prevenção da formação de biofilme de *S. aureus* em cateter venoso periférico.

### 3. HIPÓTESES

3.1 Paroxetina apresenta atividade antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* na forma planctônica.

3.2 Paroxetina demonstra ação bactericida frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

3.3 Paroxetina associada à oxacilina apresenta redução da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

3.4 Paroxetina exhibe mecanismo de ação antibacteriano frente *Staphylococcus aureus* através de ação na integridade de membrana e no material genético.

3.5 Paroxetina isolada e associada a oxacilina apresenta atividade antibacteriana *in vitro* frente biofilme formado e em formação de *Staphylococcus aureus*.

3.6 Paroxetina isolada e associada a oxacilina é capaz de prevenir *in vitro* a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* em cateter venoso periférico.

3.7 Paroxetina não exhibe atividade antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* na forma planctônica e de biofilme.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da paroxetina frente a cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à meticilina na forma planctônica e sua ação sobre biofilme formado e em formação.

### 4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da paroxetina, vancomicina e oxacilina isoladas frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

4.2.2 Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) da paroxetina frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

4.2.3 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da paroxetina e oxacilina associadas, o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) e analisar a interação farmacológica frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

4.2.4 Investigar o possível mecanismo de ação antibacteriano da paroxetina frente *Staphylococcus aureus* por meio da utilização de citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e *molecular docking*, com alvos relacionados a ciclo celular, DNA, EROs, fatores de virulência, parede celular e RNA.

4.2.5 Avaliar a ação da paroxetina isolada e associada a oxacilina frente biofilme formado e em formação de *Staphylococcus aureus*.

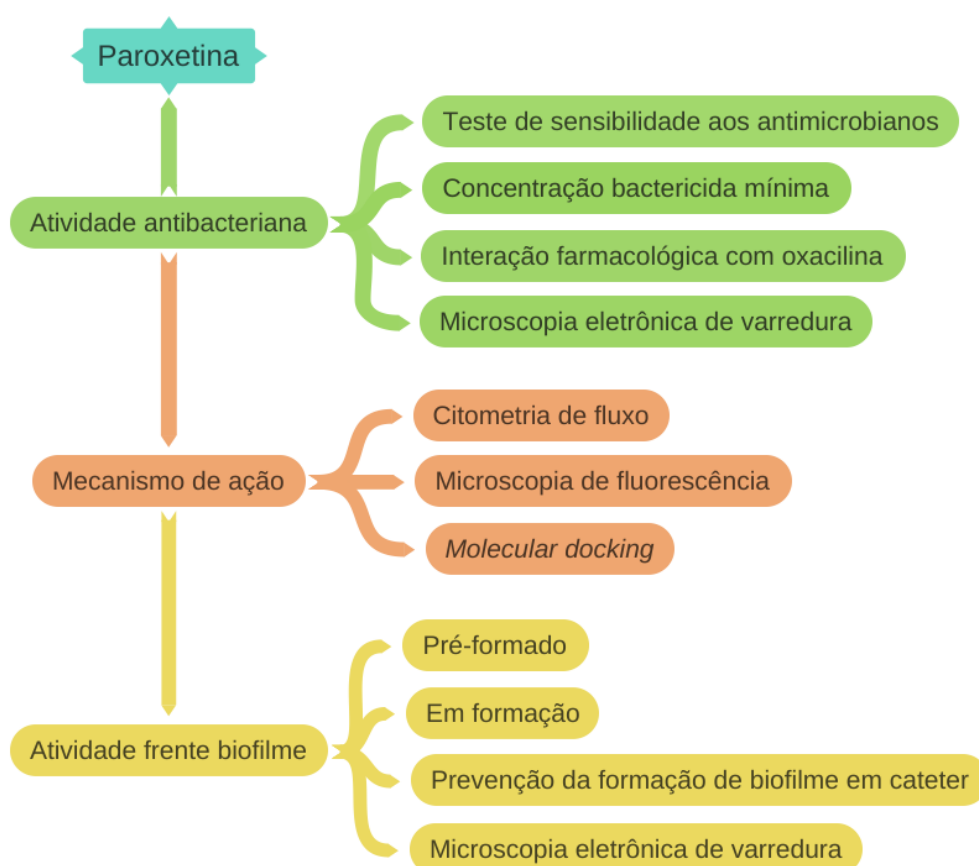
4.2.6 Avaliar o potencial da paroxetina isolada e associada a oxacilina na prevenção da formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* em cateter venoso periférico.

4.2.7 Analisar possíveis alterações morfológicas causadas pela paroxetina isolada e associada a oxacilina em isolado representativo de *Staphylococcus aureus* na forma planctônica e de biofilme através de microscopia eletrônica de varredura.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

Na Figura 5 encontram-se esquematizadas as metodologias utilizadas no estudo, as quais se dividiram em três eixos principais, constituindo na avaliação da atividade antibacteriana, análise do mecanismo de ação e acerca da atividade frente biofilme.

Figura 5 - Fluxograma de metodologias empregadas.



### 5.1 Microrganismos

Foi utilizado um total de 20 isolados de *S. aureus* (SisGen: A78F452), dentre estes, 13 resistentes à meticilina (SARM) e 7 sensíveis à meticilina. *S. aureus* ATCC 6538p e SARM ATCC 65398 foram utilizadas como controle. Todos os isolados pertencem à bacterioteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas, associado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará (LABIMAN/FF/UFC).

As cepas encontravam-se, inicialmente, armazenadas em caldo Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia) suplementado com glicose (Proquimios, Rio de Janeiro, Brasil) e glicerina (Dinâmica, São Paulo, Brasil), estando estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para a recuperação de cada isolado, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  foi utilizada para a ressuspensão em 1 mL de caldo Infusão

Cérebro e Coração (BHI) (HiMedia, Mumbai, Índia), sendo posteriormente levado a estufa por 24h a 35°C. Após este período, foi realizada a semeadura em Ágar Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia), seguido de incubação por 24h a 35°C. Todo o procedimento foi realizado de acordo com as normas de biossegurança nível 2 (QUEIROZ, 2020).

## 5.2 Fármacos

Oxacilina sódica e cloridrato de vancomicina foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (MO, USA) e dissolvidos em água destilada estéril para os experimentos. O cloridrato de paroxetina foi obtido de Galena Química e Farmacêutica (Brasil), sendo dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração  $\leq 2,5\%$  para uso imediato.

## 5.3 Testes de sensibilidade *in vitro*

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

Os testes de sensibilidade foram realizados por microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M07-A10 (CLSI, 2015). Em placas de poliestireno de 96 poços, foram destinados poços para controle de esterilidade do meio de cultura utilizado nos ensaios, Mueller Hinton Caldo Cátion Ajustado, e controle de crescimento dos inóculos. Aos ensaios realizados com oxacilina, o meio foi suplementado com 2% de NaCl.

Nesse sentido, a partir de um repique de 18 a 24h, foi preparada a suspensão dos isolados em solução salina 0,85% de acordo com a escala 0.5 de McFarland (Probac, São Paulo, Brasil), seguida de diluição destes para a concentração de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Logo após a diluição seriada dos fármacos para obtenção das faixas de concentrações propostas, as diluições finais dos inóculos foram adicionadas aos poços. A incubação foi realizada a 35°C por 16 a 24h para os testes com a paroxetina, oxacilina e vancomicina.

A determinação da CIM foi estabelecida como a menor concentração em que visualmente houve inibição completa do crescimento microbiano. A oxacilina foi testada na faixa de 2-0,004  $\mu\text{g/mL}$  para as cepas de *S. aureus* sensíveis a meticilina, e de 1024-2  $\mu\text{g/mL}$  para SARM. A vancomicina foi avaliada na faixa de 64-0,125  $\mu\text{g/mL}$ . A paroxetina foi testada no intervalo de 512-1  $\mu\text{g/mL}$ . Os isolados foram classificados como sensíveis ou resistentes a oxacilina de acordo com os pontos de corte do documento M100-S31 (CLSI, 2021):  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$  (Sensível) e  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  (Resistente). Para a vancomicina, as cepas foram classificadas como sensíveis ( $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ) de acordo com o mesmo documento.

### **5.3.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Para a análise da CBM da paroxetina, alíquotas (8 µL) das suspensões presentes nos poços em que foi verificado ausência visual de crescimento bacteriano foram semeadas em placas de Petri contendo ágar BHI. Foi realizada a incubação por 24h a 35°C e a menor concentração em que não foi verificado crescimento microbiano na superfície do meio ágar foi considerada a CBM (ANDRADE NETO et al., 2019).

### **5.3.3 Investigação do nível de tolerância**

Após a avaliação da CIM e CBM, o nível de tolerância da paroxetina foi determinado através da fórmula: tolerância = CBM/CIM, ao qual o agente é considerado bactericida quando a razão resulta em  $\leq 4$ , e bacteriostático em  $\geq 16$  (DAS et al., 2016).

### **5.3.4 Avaliação da interação farmacológica**

Após a determinação das CIMs isoladas da paroxetina e da oxacilina, foi realizada a combinação destas drogas através da técnica do *checkerboard* (ODDS, 2003). A interação foi determinada pelo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), de acordo com a equação:  $CIM_{\text{associada (PRX)}} / CIM_{\text{isolada (PRX)}} + CIM_{\text{associada (OXA)}} / CIM_{\text{isolada (OXA)}}$ , sendo realizada a interpretação de acordo com os seguintes parâmetros: sinergismo ( $ICIF \leq 0.5$ ), aditivo ( $0.5 < ICIF \leq 1$ ), indiferente ( $1 < ICIF \leq 4$ ) e antagônico ( $ICIF > 4$ ) (JORGE et al., 2017).

### **5.3.5 Análise dos dados**

Os testes *in vitro* foram realizados em triplicata em diferentes dias. A média aritmética  $\pm$  EPM foi utilizada para a determinação das CIMs, CBMs e ICIFs.

## **5.4 Testes realizados por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência**

### **5.4.1 Preparo da suspensão de células**

Para a verificar a viabilidade celular e fragmentação do DNA foi utilizado o isolado representativo SARM 9. Tendo em vista que as cepas apresentaram a mesma CIM para a paroxetina isoladamente, foi escolhido um isolado representativo baseado na interação farmacológica predominante com a oxacilina. Assim, as células de SARM foram coletadas em fase exponencial após incubação em BHI caldo a 35°C por 20h, sendo posteriormente centrifugadas (2500 rpm por 5 minutos) e lavadas por três vezes com solução salina 0,85% (2500 rpm por 5 minutos), de forma que em seguida foi realizada a ressuspensão das células

em BHI caldo (DO AV SÁ et al., 2020; SHI et al., 2007; WILLIAMS et al., 1998). As células ( $5 \times 10^6$  UFC/mL) foram incubadas a 35°C por 20h com paroxetina (CIM/2, CIM e 2xCIM), oxacilina (CIM), vancomicina (4xCIM) e paroxetina + oxacilina (CIM associada).

#### **5.4.2 Avaliação da viabilidade celular**

A avaliação foi realizada através do teste de exclusão com iodeto de propídio (IP) na concentração de 2 mg/L. Após incubação por 20h com os tratamentos previamente descritos, foram retiradas alíquotas para análise por citometria de fluxo, em que a fluorescência celular foi determinada utilizando o citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Um total de 10.000 eventos foram avaliados por experimento ( $n = 2$ ), com omissão de detritos celulares da análise (DO AV SÁ et al., 2020; SHI et al., 2007; WILLIAMS et al., 1998).

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

O ensaio *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling* (TUNEL) foi usado para a análise, de forma que o experimento seguiu as recomendações do fabricante do kit (Roche, Switzerland). Inicialmente, as células foram tratadas e após incubação por 20h, fixadas com paraformaldeído 7%, penetradas com Triton X-100 1% por 10 minutos em gelo, e então incubadas a 37°C com a mistura de reação de TUNEL por 1h. Duzentas células foram contadas por amostra a fim de determinar a porcentagem de células positivas, as quais foram examinadas utilizando microscópio de fluorescência (Olympus, Tokyo, Japan) (ANDRADE NETO et al., 2019; DWYER et al., 2012).

#### **5.4.4 Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados a partir da média aritmética  $\pm$  EPM de experimentos independentes. Os ensaios foram submetidos à análise de variância unidirecional seguida pelo Teste de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA).

### **5.5 Molecular docking**

#### **5.5.1 Design e otimização do ligante**

A estrutura da paroxetina foi obtida no repositório *Pubchem* CID43815 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/43815>), preparada em pH fisiológico usando o

código MarvinSketch™ (<https://chemaxon.com/products/marvin>) (CHEMAXON, 2019; CSIZMADIA, 2019) e otimizada utilizando o campo de força MMFF94 (*Merck Molecular Force Field 94*), com algoritmo *steepest descente* usando ciclos de 50 interações a partir do código Avogadro™ (<http://avogadro.cc/>) (HANWELL et al., 2012).

### 5.5.2 Obtenção dos alvos

Para avaliar o mecanismo de ação da paroxetina contra receptores de SARM, foram realizadas simulações de *molecular docking*, em que foram obtidas onze estruturas de alvos proteicos no repositório *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>), identificados como “*Staphylococcus aureus FtsA complexed with ATP*” (PDB 3WQU), depositada com resolução de 2.80 Å, determinada por *X-Ray Diffraction*, expressa em sistema *Escherichia coli*, classificada como *Structural Genomics*, organismo *Staphylococcus aureus subsp. aureus MRSA252* (FUJITA et al., 2014); “*Wild-type Staphylococcus aureus DHFR in complex with NADPH and trimethoprim*” (PDB 2W9G), depositada com resolução de 1.95 Å, determinada por *X-Ray Diffraction*, expressa em sistema *Escherichia coli BL21(DE3)*, classificada como *Oxidoreductase*, organismo *Staphylococcus aureus* (HEASLET et al., 2009); “*The twinned 3.35Å structure of S. aureus Gyrase complex with Ciprofloxacin and DNA*” (PDB 2XCT), depositada com resolução de 3.35 Å, determinada por *X-Ray Diffraction*, expressa em sistema *Escherichia coli BL21(DE3)*, classificada como *Isomerase/DNA/Antibiotic*, organismo *Staphylococcus aureus subsp. aureus N315, synthetic construct* (BAX et al., 2010); “*Crystal Structure of S.A. gyrase in complex with Compound 7*” (PDB 5BS3), depositada com resolução de 2.65 Å, determinada por *X-Ray Diffraction*, expressa em sistema *Escherichia coli*, classificada como *Isomerase/DNA/RNA*, organismo *Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus subsp. aureus ED98* (SINGH et al., 2015); “*5'-D(\*CP\*GP\*CP\*GP\*AP\*AP\*TP\*TP\*CP\*GP\*CP\*G)-3'-Benzimidazole Complex*” (PDB 453D), depositada com resolução de 1.80 Å, determinada por *X-Ray Diffraction* e classificada como DNA (NEIDLE et al., 1999); “*Crystal structure of the C(30) carotenoid dehydrosqualene synthase from Staphylococcus aureus complexed with bisphosphonate BPH-652*” (PDB 2ZCQ), depositada com resolução de 2.38 Å, determinada por *X-Ray Diffraction*, expressa em sistema *Escherichia coli*, classificada como *Transferase*, organismo *Staphylococcus aureus* (LIU et al., 2008); “*Crystal structure of MtlD from Staphylococcus aureus at 1.7-Angstrom resolution*” (PDB 5JNM), depositada com resolução de 1.70 Å, determinada por *X-Ray Diffraction*, expressa em sistema *Escherichia coli*, classificada como *Oxidoreductase*,



organismo *Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu3* (NGUYEN et al., 2019); “*Structure of the Panton-Valentine Leucocidin S Component from Staphylococcus aureus*” (PDB 1T5R), depositada com resolução de 2.00 Å, determinada por *X-Ray Diffraction*, organismo *Staphylococcus phage PVL* (GUILLET et al., 2004); “*S. aureus  $\alpha$ -hemolysin monomer in complex with Fab*” (PDB 4IDJ), depositada com resolução de 3.36 Å, determinada por *X-Ray Diffraction*, expressa em sistema *Escherichia coli, Homo sapiens*, classificada como *Immune System*, organismo *Staphylococcus aureus, Homo sapiens* (FOLETTI et al., 2013); “*Crystal structure of ceftaroline acyl-PBP2a from MRSA with non-covalently bound ceftaroline and muramic acid at allosteric site obtained by soaking*” (PDB 3ZFZ), depositada com resolução de 2.25 Å, determinada por *X-Ray Diffraction*, expressa em sistema *Escherichia coli BL21(DE3)*, classificada como *Hydrolase*, organismo *Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu50* (OTERO et al., 2013) e “*Crystal structure of S. aureus TyrRS in complex with SB-239629*” (PDB 1JII), depositada com resolução de 3.20 Å, determinada por *X-Ray Diffraction*, expressa em sistema *Escherichia coli*, classificada como *Ligase*, organismo *Staphylococcus aureus* (QIU et al., 2001).

### 5.5.3 Preparação dos alvos e procedimentos gerais de molecular docking

A preparação dos alvos *Wild-type S. aureus DHFR*, *S. aureus gyrase complex with DNA*, *S. aureus gyrase*, *DNA (5'- D(\*CP\*GP\*CP\*GP\*AP\*AP\*TP\*TP\*CP\* GP\*CP\*G)-3')* e *Acyl-PBP2a from MRSA* foi realizada a partir da metodologia de Andrade Neto et al. (2021). Foram mantidos os íons  $Mg^{+2}$  nos alvos *C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase from Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus FtsA*. Quanto ao alvo *S. aureus  $\alpha$ -hemolysin*, foi mantido o Fab LTM14, um fragmento de anticorpo monoclonal humano de alta afinidade para a toxina alfa de *Staphylococcus aureus* (CABALLERO et al., 2015; FOLETTI et al., 2013). Moléculas de água e inibidores co-cristalizados foram removidos, os hidrogênios polares e as cargas *Gasteiger* foram adicionados em todos os alvos (YAN et al., 2014) utilizando o código Autodocktools™ (HUEY; MORRIS; FORLI, 2012).

O estudo de *molecular docking* foi realizado a partir do código AutodockVina (TROTT; OLSON, 2009), utilizando *Lamarckian Genetic Algorithm (LGA)*, *Exhaustiveness 64* (MARINHO et al., 2020) e espaço de simulação envolvendo toda a estrutura dos alvos proteicos por meio dos eixos (x, y, z) e *size (x, y, z)* descritos na Tabela 3 para cada alvo. Foram realizadas 50 simulações independentes e a análise dos dados foi executada utilizando os

códigos UCSF Chimera <sup>TM</sup> (PETTERSEN et al., 2004), *Discovery studio visualizer* <sup>TM</sup> viewer (BIOVIA, 2016) e *Pymol* (DELANO, 2020).

Tabela 3 - Parâmetros utilizados nas simulações de *molecular docking*.

Parâmetros grid box	Ciclo Celular	DNA				EROs		Fatores de Virulência		Parede Celular	RNA
	<i>S. aureus</i> <i>FtsA</i> <sup>a</sup>	<i>Wild-type S. aureus</i> <i>DHFR</i> <sup>b</sup>	<i>S. aureus</i> <i>gyrase complex with</i> <i>DNA</i> <sup>c</sup>	<i>S. aureus</i> <i>gyrase</i> <sup>d</sup>	<i>DNA</i> (5'- <i>D</i> (* <i>CP</i> * <i>GP</i> * <i>CP</i> * <i>GP</i> * <i>A</i> <i>P</i> * <i>AP</i> * <i>TP</i> * <i>TP</i> * <i>CP</i> * <i>GP</i> * <i>CP</i> * <i>G</i> ) -3') <sup>e</sup>	<i>C</i> (30) <i>carotenoid</i> <i>dehydrosqualene</i> <i>synthase</i> <sup>f</sup>	<i>MtlD</i> <sup>g</sup>	<i>Panton-Valentine</i> <i>Leucocidin S</i> <i>Component</i> <sup>h</sup>	<i>S. aureus</i> <i>alpha</i> <i>hemolysin</i> <sup>i</sup>	<i>Acyl-PBP2a</i> <sup>j</sup>	<i>S. aureus</i> <i>TyrRS</i> <sup>k</sup>
<i>center_x</i>	14.648	-4.854	17.747	-2.314	14.674	18.375	37.829	23.360	-46.689	1.716	-9.592
<i>center_y</i>	13.801	-27.055	37.969	-28.737	21.536	54.992	35.140	71.056	13.249	38.268	18.099
<i>center_z</i>	-12.706	4.446	24.799	-27.418	9.84	38.404	18.453	23.875	40.756	44.556	93.967
<i>size_x</i>	106	90	126	126	52	108	92	126	76	116	74
<i>size_y</i>	82	90	126	126	52	100	102	126	62	84	114
<i>size_z</i>	126	86	126	126	86	116	126	126	126	126	92

- Estrutura cristalina de *S. aureus FtsA* - PDB ID: 3WQU.
- Estrutura cristalina de *Wild-type S. aureus DHFR* - PDB ID: 2W9G
- Estrutura cristalina de *S. aureus gyrase complex with DNA* - PDB ID: 2XCT
- Estrutura cristalina de *S. aureus gyrase* - PDB ID: 5BS3
- Estrutura cristalina de *DNA(5'- D(\*CP\*GP\*CP\*GP\*AP\*AP\*TP\*TP\*CP\*GP\*CP\*G)-3')* - PDB ID: 453D
- Estrutura cristalina de *C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase* - PDB ID: 2ZCQ
- Estrutura cristalina de *MtlD* - PDB ID: 5JNM
- Estrutura cristalina de *Panton-Valentine Leucocidin S Component* - PDB ID: 1T5R
- Estrutura cristalina de *S. aureus alpha hemolysin* - PDB ID: 4IDJ
- Estrutura cristalina de *Acyl-PBP2a* - PDB ID: 3ZFZ
- Estrutura cristalina de *S. aureus TyrRS* - PDB ID: 1JIJ

Cada simulação de *molecular docking* gera 20 poses, sendo a *Best Pose* selecionada a partir da energia de afinidade (kcal/mol) com valores iguais ou inferiores a -6.0 kcal/mol (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014) e do *Root Mean Square Deviation* (RMSD) com valores até 2 Å (YUSUF et al., 2008), sendo o RMSD um critério de validação das simulações realizadas. A estabilidade dos complexos receptor-ligante formados foi avaliada utilizando a energia de afinidade ( $\Delta G$ ) (equação 1), em que a partir dela foram determinados os valores das constante de inibição ( $K_i$ ) (equação 2) de cada complexo formado (KADELA-TOMANEK et al., 2021).  $K_i$  é a constante de inibição,  $\Delta G$  é a energia livre de ligação ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $R$  é constante do gás ( $8.32 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) e  $T$  a temperatura absoluta (298K).

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (1)$$

$$K_i = e^{(\Delta G/RT)} \quad (2)$$

Também foi avaliada a força das ligações de hidrogênio por meio dos valores das distâncias entre os átomos doadores e receptores, sendo consideradas ligações fortes (*Strong*)

as interações que ficaram entre 2.5-3.1 Å, moderadas (*Average*) entre 3.1-3.55 Å e classificadas como fracas (*Weak*) as ligações com distancias superiores a 3.55 Å (IMBERTY et al., 1991).

## 5.6 Ensaios frente biofilme

### 5.6.1 *Biofilme formado*

A partir dos resultados obtidos nos ensaios frente células planctônicas, foi avaliada a ação da paroxetina isolada e associada a oxacilina frente biofilme. As concentrações a serem testadas no biofilme pré-formado e em formação foram padronizadas, de forma que em relação a paroxetina, corresponderam a CIM/2, CIM, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM. Na associação entre paroxetina e oxacilina, foi testado CIM, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM das drogas combinadas. Por fim, para efeito de comparação, a oxacilina foi testada isoladamente nas concentrações em que estava presente na associação.

O protocolo de formação do biofilme bacteriano foi executado segundo Andrade Neto et al. (2021) e Do Av Sá et al. (2020), com poucas modificações. Inicialmente, as cepas foram semeadas em ágar Mueller Hinton e posteriormente colocadas em tubos contendo Caldo Triptona Soja (TSB) (Kasvi, Paraná, Brazil) suplementado com 2% de glicose (Isifar, Rio de Janeiro, Brazil) por 24h a 35°C. Após o período de incubação, os tubos contendo meio de cultura e microrganismo foram centrifugados (2500 rpm por 5 minutos) e o concentrado de células lavado com solução salina 0,85%, procedimento o qual foi realizado por três vezes. Feito isso, foi preparado inóculo equivalente a escala 1 de McFarland em TSB suplementado com 2% de glicose.

Em microplacas de poliestireno de 96 poços, foram adicionados 200 µL do inóculo, sendo estas incubadas por 48h a 35°C. Em seguida, os poços foram lavados com solução salina 0,85% e a estes foram adicionados 200 µL das diluições das drogas, sendo a incubação por 24h a 35°C. Para avaliação da viabilidade celular, foi utilizado o ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT).

Assim, após a retirada do sobrenadante e lavagem com solução salina 0,85%, foram adicionados 100 µL de MTT aos poços, permanecendo por 2h a 35°C. Após este período, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 150 µL de DMSO aos poços para dissolver o sal de formazan. 100 µL de DMSO foram transferidos para uma nova microplaca de 96 poços para leitura em 492 nm (Asys UVM 340, Cambridge, UK).

### **5.6.2 Atividade antibiofilme**

Os ensaios foram realizados de acordo com Brambilla et al. (2017) e Queiroz et al. (2021). A partir do inóculo preparado em TSB suplementado com 2% de glicose, descrito anteriormente, foram colocados 100 µL do inóculo e 100 µL das diluições das drogas em microplacas de poliestireno de 96 poços. Após incubação por 48h a 35°C, os poços foram lavados com solução salina 0,85% e adicionado o MTT para análise da viabilidade celular, da mesma forma referida anteriormente.

### **5.6.3 Impregnação de fragmentos de cateter**

As concentrações utilizadas para o ensaio foram baseadas na maior CIM associada de um isolado representativo, o qual correspondeu a SARM 9. Assim, os cateteres foram impregnados na 8xCIM associada (256 µg/mL de paroxetina + 1024 µg/mL de oxacilina), e nas concentrações isoladas dos fármacos, correspondendo a 256 µg/mL de paroxetina e 1024 µg/mL de oxacilina.

A partir de fragmentos de 0,5 cm de cateter intravenoso periférico (Jelco 18G Descarpack), foi realizada a impregnação dos fármacos. A metodologia foi realizada de acordo com Fisher et al. (2015) e Nair et al. (2016), com modificações. As drogas utilizadas foram dissolvidas em clorofórmio e diluídas nas concentrações estabelecidas para o teste, de forma que em seguida, os fragmentos de cateter foram submersos nesta solução por 24h. Após este período, os cateteres foram colocados em placas de Petri estéreis e deixados para secar por 24h a 35°C. Fragmentos de cateter foram submersos no clorofórmio, porém sem a diluição das drogas, de forma a serem utilizados posteriormente como controle de crescimento do biofilme bacteriano.

### **5.6.4 Avaliação do efeito de cateteres impregnados contra a formação de biofilme**

Após o processo de impregnação nos cateteres, estes foram colocados em placa de 24 poços de poliestireno, e submersos em inóculo (SARM 9) preparado em TSB suplementado com 2% de glicose, como descrito anteriormente, e incubado por 48h a 35°C. Em seguida, os cateteres foram lavados com solução salina 0,85%, colocados em 1 mL desta solução e agitados em vórtex por 1,5 minuto, sendo 10 µL semeados em placas de Petri contendo ágar Sal Manitol (Kasvi, Paraná, Brazil). Feito isso, as placas foram incubadas por 48h a 35°C, sendo realizada a contagem de colônias e conversão para UFC/mL (IWATA et al., 2021).

### **5.6.5 Análise estatística**

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados analisados a partir da média aritmética  $\pm$  EPM de experimentos independentes, sendo submetidos ao ANOVA seguido pelo teste de Tukey, em que  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Toda a análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA).

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

### **5.7.1 Células planctônicas**

Para a realização do MEV, também foi utilizado o isolado SARM 9. O protocolo foi realizado segundo Do AV Sá et al. (2020) e Queiroz et al. (2021), com algumas modificações. Inicialmente foi preparado um inóculo na concentração de  $5 \times 10^5$  UFC/mL em TSB suplementado com 2% de glicose. As células foram tratadas com paroxetina (CIM), oxacilina (CIM) e paroxetina + oxacilina (CIM associada) por 20h a 35°C. Feito isso, em lamínulas de vidro previamente tratadas com silano 2,5%, as células foram adicionadas e fixadas utilizando glutaraldeído 2,5%, com incubação *overnight* a 4°C. Em seguida, as lamínulas foram lavadas duas vezes com solução tampão cacodilato 0,1 M e então desidratadas com etanol em concentrações de 30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100% por 10 minutos cada. Por fim, com as lamínulas em temperatura ambiente, estas foram cobertas com hexametildisilazano (HMDS) até a secagem completa do reagente. As lamínulas foram revestidas com camada de ouro (Emitech, East Sussex, UK; Q150T) (10 nm) e examinadas em microscópio FEI Quanta 450 FEG.

### **5.7.2 Cateteres impregnados**

As etapas de preparo do inóculo em TSB suplementado com 2% de glicose e da impregnação dos cateteres foram realizadas como previamente descrito na seção 5.6. Nesse sentido, em uma placa de 12 poços de poliestireno foram adicionados os cateteres, os quais permaneceram submersos no inóculo (SARM 9) por 48h a 35°C. Em seguida, as etapas de fixação e desidratação seguiram o mesmo protocolo descrito no item anterior (5.7.1). As amostras também foram analisadas no microscópio FEI Quanta 450 FEG.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Atividade frente células planctônicas de *Staphylococcus aureus*

#### 6.1.1 Paroxetina apresenta ação antibacteriana frente isolados de *S. aureus* sensíveis e resistentes à metilina

A paroxetina exibiu CIM correspondente a 64 µg/mL em todos os isolados testados. No que diz respeito à oxacilina, a CIM variou entre 0,125 a 2 µg/mL para as cepas sensíveis, e entre 8 a 1024 µg/mL para as resistentes (SARM). Todos os isolados apresentaram-se sensíveis à vancomicina, com CIM na faixa de 0,5 a 2 µg/mL. Em relação a CBM da paroxetina, os valores variaram entre 64 a 256 µg/mL (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de CIM, CBM e nível de tolerância da paroxetina, e associação entre paroxetina e oxacilina frente a isolados de *S. aureus*.

Cepas <sup>a</sup>	CIM <sup>b</sup> (µg/ml)			CIM <sup>b</sup> (µg/ml)				Nível de tolerância		
	Isolado <sup>c</sup>			Combinado <sup>d</sup>				CBM <sup>e</sup>	CBM/CIM <sup>f</sup>	Interpretação
PRX	OXA	VAN	PRX	OXA	ICIF	Interpretação				
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	64	0.125	0.5	64	0.125	2.00	IND	64	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 1	64	0.25	0.5	64	0.25	2.00	IND	128	2	Bactericida
<i>S. aureus</i> 2	64	0.5	2	32	0.25	1.00	ADI	256	4	Bactericida
<i>S. aureus</i> 3	64	1	1	32	0.5	1.00	ADI	128	2	Bactericida
<i>S. aureus</i> 4 <sup>Δ</sup>	64	2	0.5	16	0.5	0.50	SIN	64	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 5	64	2	0.5	16	0.5	0.50	SIN	64	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 6	64	2	0.5	32	1	1.00	ADI	64	1	Bactericida
SARM ATCC <sup>TM</sup> 65398	64	8	2	64	8	2.00	IND	256	4	Bactericida
SARM 1	64	8	2	32	4	1.00	ADI	64	1	Bactericida
SARM 2 <sup>Δ</sup>	64	32	0.5	32	16	1.00	ADI	128	2	Bactericida
SARM 3	64	64	1	16	16	0.50	SIN	128	2	Bactericida
SARM 4	64	64	1	32	32	1.00	ADI	128	2	Bactericida
SARM 5	64	64	0.5	32	32	1.00	ADI	128	2	Bactericida
SARM 6	64	64	1	32	32	1.00	ADI	128	2	Bactericida
SARM 7	64	128	2	16	32	0.50	SIN	256	4	Bactericida
SARM 8 <sup>Δ</sup>	64	256	1	8	32	0.25	SIN	256	4	Bactericida
SARM 9 <sup>*, Δ</sup>	64	256	1	32	128	1.00	ADI	128	2	Bactericida
SARM 10	64	256	1	32	128	1.00	ADI	128	2	Bactericida
SARM 11	64	512	2	64	512	2.00	IND	128	2	Bactericida
SARM 12	64	1024	2	32	512	1.00	ADI	64	1	Bactericida

<sup>a</sup>Isolados de *S. aureus*. <sup>b</sup>CIM necessária para inibir completamente o crescimento bacteriano. <sup>c</sup>A microdiluição em caldo foi realizada de acordo com o CLSI (2015) M07-A10.

<sup>d</sup>Combinação da PRX com OXA. <sup>e</sup>Os valores de CBM foram determinados através de inoculações das diluições baseadas na CIM em placas de ágar BHI. <sup>f</sup>CBM/CIM  $\geq 16$  (bacteriostático);  $\leq 4$  (Bactericida). (\*) Isolado selecionado para os experimentos usando citometria de fluxo, microscopia de fluorescência, cateter impregnado e MEV. (Δ) Isolados selecionados para os experimentos de biofilme formado e em formação. PRX: paroxetina; OXA: oxacilina; VAN: vancomicina; IND: indiferente; ADI: Aditivo; SIN: Sinérgico.

### ***6.1.2 Paroxetina demonstra efeito bactericida em isolados de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina***

A paroxetina exibiu ação bactericida em todas as cepas de *S. aureus* testadas tendo em vista que na razão CBM/CIM obteve-se o nível de tolerância entre 1 e 4 (Tabela 4).

### ***6.1.3 Interação farmacológica na combinação entre paroxetina e oxacilina frente isolados de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina***

Na combinação entre os fármacos, foram obtidas interações variadas. Majoritariamente foi verificado efeito aditivo em 55% dos isolados, seguido de sinergismo (25%) e indiferente (20%) (Tabela 4). Não foi verificado efeito antagônico.

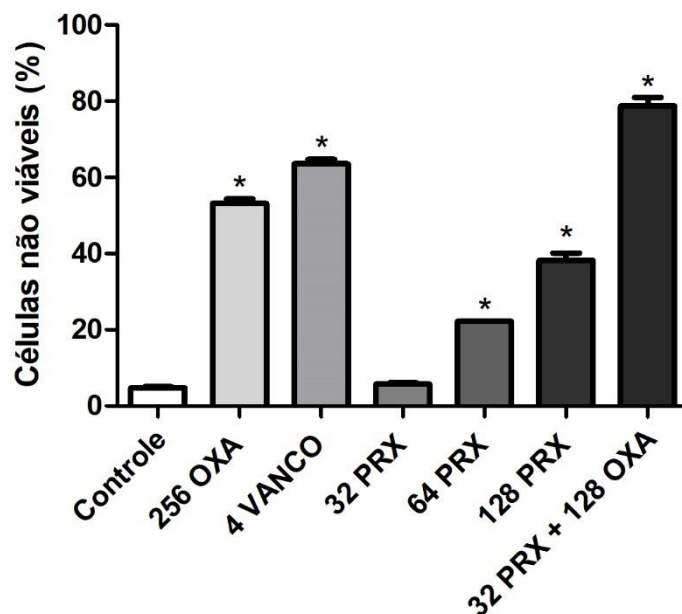
## **6.2 Análise dos possíveis mecanismos de ação**

### ***6.2.1 Redução da viabilidade em células de SARM evidenciado após tratamento com paroxetina isolada e associada à oxacilina***

No Gráfico 1 é demonstrada a diminuição na viabilidade celular decorrente dos tratamentos realizados. Para a paroxetina, as células não viáveis em CIM/2 (32 µg/mL) corresponderam a  $5,7 \pm 0,9\%$ , sendo significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle ( $4,8 \pm 0,6\%$ ) a partir da CIM (64 µg/mL), com  $22,2 \pm 0,1\%$ , e 2xCIM (128 µg/mL), sendo  $38,2 \pm 4,7\%$ . Efeito mais pronunciado foi constatado na associação com a oxacilina (32 µg/mL paroxetina + 128 µg/mL oxacilina), referente a  $78,7 \pm 5,6\%$ . Para a oxacilina isolada (256 µg/mL) obteve-se  $53,1 \pm 2,8\%$ , e para a vancomicina  $63,5 \pm 2,9\%$ .



Gráfico 1 - Tratamento realizado com paroxetina isolada e associada à oxacilina em uma cepa representativa de SARM evidenciando o efeito nas células não viáveis.

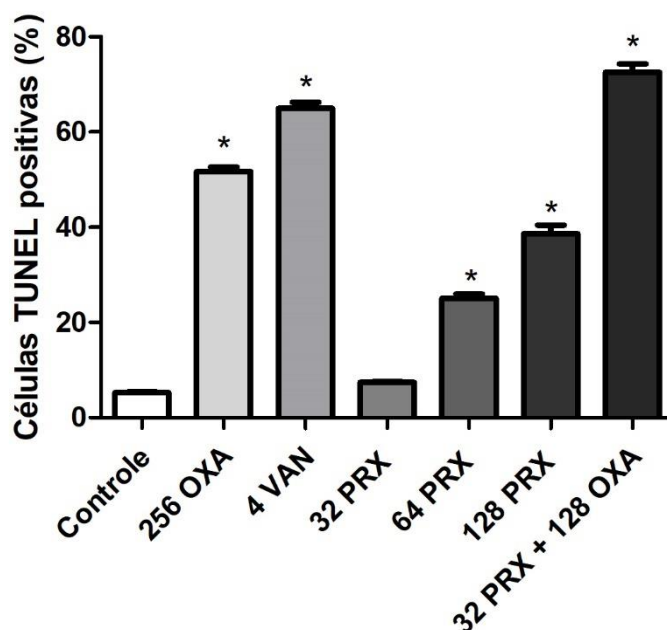


O Caldo BHI foi usado como controle. \* $p < 0,05$  comparado ao controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. OXA: oxacilina (256  $\mu\text{g/mL}$ ); VAN: vancomicina (4  $\mu\text{g/mL}$ ); PRX: paroxetina CIM/2 (32  $\mu\text{g/mL}$ ), CIM (64  $\mu\text{g/mL}$ ) e 2xCIM (128  $\mu\text{g/mL}$ ); PRX + OXA: paroxetina (32  $\mu\text{g/mL}$ ) + oxacilina (128  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 6.2.2 Fragmentação de DNA induzida pela paroxetina isolada e associada à oxacilina em células de SARM detectado por TUNEL

O dano causado ao material genético bacteriano é demonstrado no Gráfico 2. Para a paroxetina em CIM/2 (32  $\mu\text{g/mL}$ ), foi verificado  $7,4 \pm 0,43\%$ , sendo significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle ( $5,2 \pm 0,6\%$ ) a partir das concentrações de CIM (64  $\mu\text{g/mL}$ ) e 2xCIM (128  $\mu\text{g/mL}$ ), correspondendo respectivamente a  $25,1 \pm 2,2\%$  e  $38,6 \pm 4,3\%$ . Na combinação com a oxacilina (32  $\mu\text{g/mL}$  paroxetina + 128  $\mu\text{g/mL}$  oxacilina), referente a  $72,6 \pm 4,2\%$ , o dano foi obtido em maior proporção. Além disso, a oxacilina (256  $\mu\text{g/mL}$ ) isolada também gerou fragmentação do DNA, com  $51,7 \pm 2,3\%$ . A vancomicina (4  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentou  $64,9 \pm 3,2\%$ .

Gráfico 2 - Tratamento realizado com paroxetina isolada e associada à oxacilina em uma cepa representativa de SARM evidenciando fragmentação do DNA bacteriano.



O Caldo BHI foi usado como controle. \* $p < 0,05$  comparado ao controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. OXA: oxacilina (256  $\mu\text{g/mL}$ ); VAN: vancomicina (4  $\mu\text{g/mL}$ ); PRX: paroxetina CIM/2 (32  $\mu\text{g/mL}$ ), CIM (64  $\mu\text{g/mL}$ ) e 2xCIM (128  $\mu\text{g/mL}$ ); PRX + OXA: paroxetina (32  $\mu\text{g/mL}$ ) + oxacilina (128  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 6.2.3 Interação *in silico* da paroxetina com receptores de SARM

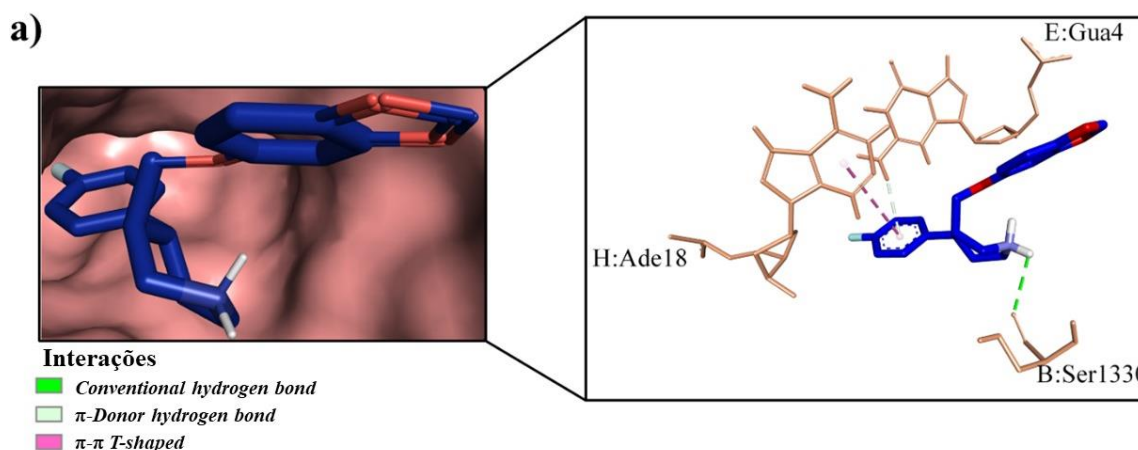
Para investigar o mecanismo de ação da paroxetina contra receptores de SARM foram realizadas simulações de *molecular docking* com onze alvos, sendo destacados quatro complexos que apresentaram os melhores valores de energia de afinidade, formados entre a paroxetina e os receptores *S. aureus gyrase complex with DNA*<sup>c</sup> (-9.7 kcal/mol), *S. aureus gyrase*<sup>d</sup> (-9.8 kcal/mol), *C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase*<sup>f</sup> (-9.8 kcal/mol) e *S. aureus TyrRS*<sup>k</sup> (-8.8 kcal/mol) (Tabela 5), indicados na Figura 6A-D, respectivamente. Quanto ao RMSD, todos os complexos apresentaram valores dentro da idealidade de até 2.0 Å. Na tabela 5 também estão demonstradas as constantes de inibição dos complexos formados, em que é possível observar valores  $K_i$  de  $6.57 \times 10^{-8}$  a  $4.46 \times 10^{-6}$ . O  $pK_i$  foi determinado a partir de  $K_i$ , em que foram obtidos valores  $pK_i$  de 5.35 a 7.18.

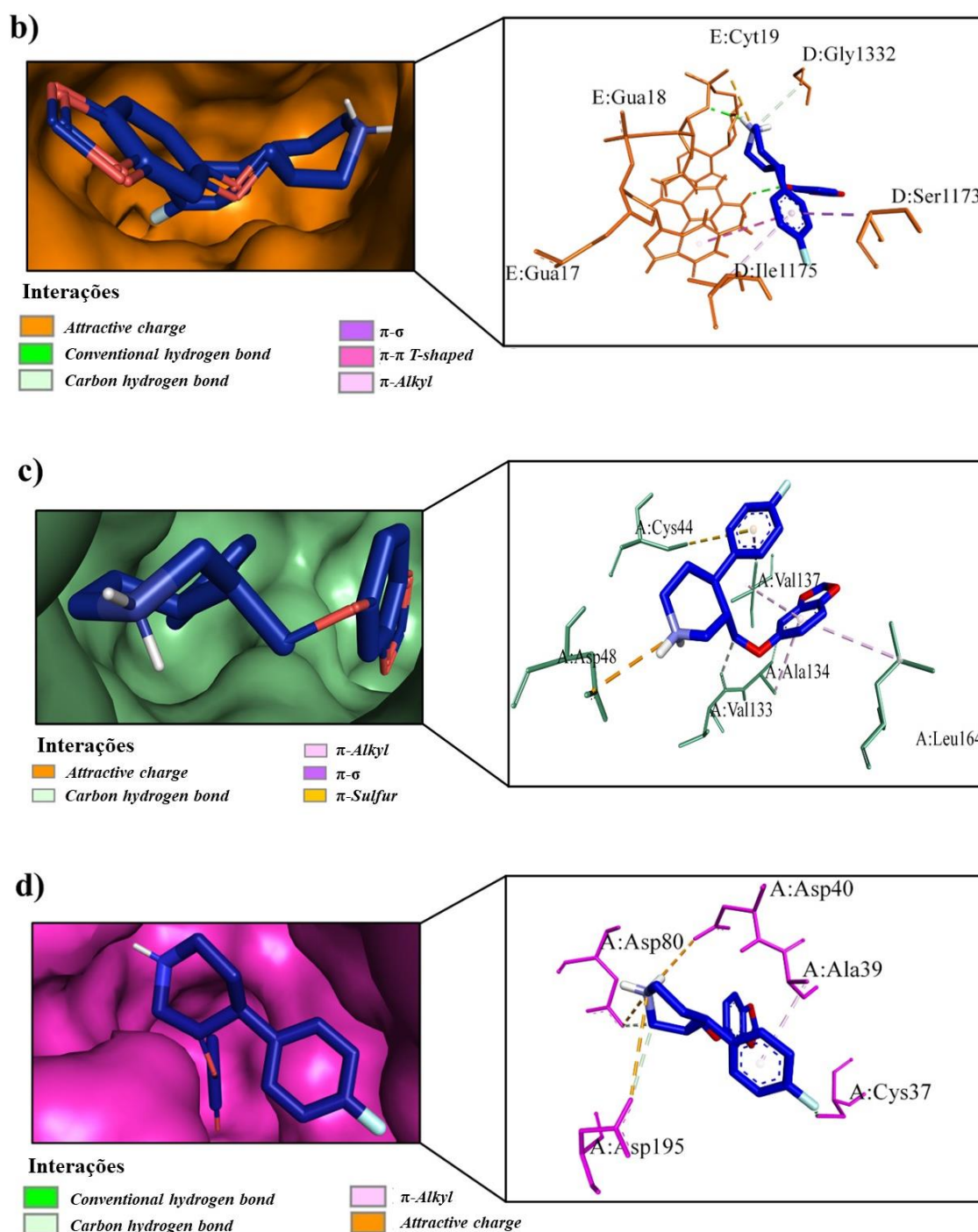
Tabela 5 - Valores de energia de afinidade, RMSD, Ki e pKi dos complexos formados.

Receptor	Energia (kcal/mol)	Ki	pKi	RMSD (Å)
<i>S. aureus FtsA</i> <sup>a</sup>	-7.7	2.27 x 10 <sup>-6</sup>	5.64	1.686
Wild-type <i>S. aureus DHFR</i> <sup>b</sup>	-8.3	8.26 x 10 <sup>-7</sup>	6.08	1.292
<i>S. aureus gyrase complex with DNA</i> <sup>c</sup>	-9.7	7.78 x 10 <sup>-8</sup>	7.11	1.790
<i>S. aureus gyrase</i> <sup>d</sup>	-9.8	6.57 x 10 <sup>-8</sup>	7.18	1.577
DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') <sup>e</sup>	-7.5	3.18 x 10 <sup>-6</sup>	5.49	1.317
<i>C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase</i> <sup>f</sup>	-9.8	6.57 x 10 <sup>-8</sup>	7.18	1.747
<i>MtID</i> <sup>g</sup>	-7.5	3.18 x 10 <sup>-6</sup>	5.49	1.697
<i>Panton-Valentine Leucocidin S Component</i> <sup>h</sup>	-7.3	4.46 x 10 <sup>-6</sup>	5.35	1.003
<i>S. aureus alpha hemolysin</i> <sup>i</sup>	-8.2	9.78 x 10 <sup>-7</sup>	6.00	1.452
<i>Acyl-PBP2a</i> <sup>j</sup>	-8.0	1.37 x 10 <sup>-6</sup>	5.86	1.730
<i>S. aureus TyrRS</i> <sup>k</sup>	-8.8	3.55 x 10 <sup>-7</sup>	6.45	1.231

- a. Estrutura cristalina de *S. aureus FtsA* - PDB ID: 3WQU.  
b. Estrutura cristalina de Wild-type *S. aureus DHFR* - PDB ID: 2W9G  
c. Estrutura cristalina de *S. aureus gyrase complex with DNA* - PDB ID: 2XCT  
d. Estrutura cristalina de *S. aureus gyrase* - PDB ID: 5BS3  
e. Estrutura cristalina de DNA (5'- D(\*CP\*GP\*CP\*GP\*AP\*AP\*TP\*TP\*CP\*GP\*CP\*G)-3') - PDB ID: 453D  
f. Estrutura cristalina de *C(30) carotenoid dehydrosqualene synthase* - PDB ID: 2ZCQ  
g. Estrutura cristalina de *MtID* - PDB ID: 5JNM  
h. Estrutura cristalina de *Panton-Valentine Leucocidin S Component* - PDB ID: 1T5R  
i. Estrutura cristalina de *S. aureus alpha hemolysin* - PDB ID: 4IDJ  
j. Estrutura cristalina de *Acyl-PBP2a* - PDB ID: 3ZFZ  
k. Estrutura cristalina de *S. aureus TyrRS* - PDB ID: 1JJJ

Figura 6 - Interações dos complexos formados entre a paroxetina e os alvos *S. aureus gyrase complex with DNA* (a), *S. aureus gyrase* (b), *C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase* (c) e *S. aureus TyrRS* (d).





As interações envolvidas na formação dos complexos receptor-ligante foram descritas na Tabela 6, onde foi possível identificar que o complexo paroxetina - *S. aureus* *FtsA* é formado por cinco interações, sendo uma *hydrophobic* com o resíduo Phe24C (4.06 Å), uma *Attractive Charge* (3.98 Å) e uma *H-Bond* (3.56 Å) envolvendo o resíduo Glu22C, uma interação *Halogen (Fluorine)* com o resíduo Asn29C (3.33 Å) e uma  $\pi$ -Anion com Glu342B (4.38 Å). O complexo paroxetina - *Wild-type S. aureus DHFR* é

formado predominantemente por interações *hydrophobic* com Leu20A (4.46 Å), Leu28A (3.99 Å), Ile50A (3.71 Å), Leu54A (5.25 Å), NDP1160A (4.80 Å); o complexo também apresentou uma *H-Bond* com Ser49A (4.71 Å), uma interação *Halogen (Fluorine)* (3.42 Å) e uma  $\pi$ - $\pi$  *Stacked* (5.77 Å) com Phe92A. O complexo paroxetina - *S. aureus gyrase complex with DNA* é formado por três interações, sendo uma *H-Bond* com Ser1330B (2.73 Å), uma  $\pi$ -*Donor H-Bond* com Gua4E (2.90 Å) e uma  $\pi$ - $\pi$  *T-shaped* com Ade18H (5.06 Å). O complexo paroxetina - *S. aureus gyrase* é formado por três *H-Bonds*, sendo uma com Gly1332D (3.54 Å) e duas com Gua18E (2.29 Å), o complexo também apresentou duas interações *hydrophobic* com Ser1173D (3.98 Å), Ile1175D (5.21 Å), uma interação  $\pi$ - $\pi$  *T-shaped* com Gua17E (5.86 Å) e uma *Attractive Charge* com Cyt19E (3.89 Å). O complexo paroxetina - *DNA (5'-D(\*CP\*GP\*CP\*GP\*AP\* AP\*TP\*TP\*CP\*GP\*CP\*G)-3')* é formado por duas interações com o resíduo Gua4A, sendo uma  $\pi$ -*Donor H-Bond* (2.56 Å) e uma  $\pi$ - $\pi$  *T-shaped* (5.46 Å). O complexo paroxetina - *C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase* é formado por quatro interações *hydrophobic* com os resíduos Ala134A (4.31 Å), Val137A (3.74 e 4.65 Å), Leu164A (5.17Å), uma *H-Bond* com Val133A (3.27 Å), uma *Attractive Charge* com Asp48A (4.05 Å) e uma  $\pi$ -*Sulfur* com Cys44A (5.23 Å). O complexo paroxetina - *MtlD* é formado por três interações *hydrophobic* com Ile11A (3.99 Å), Ala88A (4.79Å), Ile152A (4.79 Å), duas *H-Bonds* envolvendo os resíduos Val149A (2.52 Å), Asp276A (3.69 Å), uma *Attractive Charge* com Asp150A (4.74 Å) e duas interações *Halogen (Fluorine)* com Ala88A (3.30 Å) e Val89A (3.42 Å). O complexo paroxetina - *Panton-Valentine Leucocidin S Component* é formado por sete interações, sendo duas *hydrophobic* com Ile92H (5.42 Å), Val146F (4.23 Å), uma *H-Bond* com Asn93H (3.67 Å), uma  $\pi$ -*Cation* com Ser128A (3.09 Å), uma  $\pi$ - $\pi$  *T-shaped* com Phe117H (6.00 Å), uma *Halogen (Fluorine)* com Lys97F (3.14 Å) e uma interação *Unfavorable Positive-Positive* com Lys43H (3.91 Å). O complexo paroxetina - *S. aureus alpha hemolysin* é formado por duas interações *hydrophobic* com Ile14A (3.79 Å), Val20A (5.31 Å), duas *H-Bonds* com Arg56A (2.66 Å), His144A (3.07 Å), uma interação  $\pi$ - $\pi$  *Stacked* com Tyr118A (4.91 Å) e uma *Halogen (Fluorine)* com Ile14A (3.01 Å). O complexo paroxetina - *Acyl-PBP2a* é formado por sete interações, sendo duas *hydrophobic* com Leu147A (3.54 Å), Lys148B (4.73 Å), uma *Attractive Charge* com Glu315A (4.10 Å), duas *H-Bonds* (2.32 e 3.43 Å), uma  $\pi$ -*Anion* (3.84 Å) e uma *Salt Bridge; Attractive Charge* (3.11 Å) com Glu239B. O complexo paroxetina - *S. aureus TyrRS* é formado por sete interações, sendo uma *hydrophobic* com Ala39A

(4.17Å), três *H-Bonds* envolvendo os resíduos Cys37A (3.54 Å), Asp80A (3.64 Å) e Asp195A (3.50 Å), três interações *Attractive Charge* com Asp40A (5.15 Å), Asp80A (4.33 Å) e Asp195A (4.59 Å).

Tabela 6 - Interações entre a paroxetina e os receptores de SARM.

Receptor	Resíduo	Interação	Distância (Å)
<i>S. aureus FtsA</i> <sup>a</sup>	Phe24C	<i>Hydrophobic</i>	4.06
	Glu22C	<i>H-Bond</i>	3.56
	Glu22C	<i>Attractive Charge</i>	3.98
	Asn29C	<i>Halogen (Fluorine)</i>	3.33
	Glu342B	$\pi$ -Anion	4.38
Wild-type <i>S. aureus DHFR</i> <sup>b</sup>	Leu20A	<i>Hydrophobic</i>	4.46
	Leu28A	<i>Hydrophobic</i>	3.99
	Ile50A	<i>Hydrophobic</i>	3.71
	Leu54A	<i>Hydrophobic</i>	5.25
	NDP1160A	<i>Hydrophobic</i>	4.80
	Ser49A	<i>H-Bond</i>	4.71
	Phe92A	<i>Halogen (Fluorine)</i>	3.42
	Phe92A	$\pi$ - $\pi$ Stacked	5.77
<i>S. aureus gyrase complex with DNA</i> <sup>c</sup>	Ser1330B	<i>H-Bond</i>	2.73
	Gua4E	$\pi$ -Donor <i>H-Bond</i>	2.90
	Ade18H	$\pi$ - $\pi$ T-shaped	5.06
<i>S. aureus gyrase</i> <sup>d</sup>	Ser1173D	<i>Hydrophobic</i>	3.98
	Ile1175D	<i>Hydrophobic</i>	5.21
	Gly1332D	<i>H-Bond</i>	3.54
	Gua18E	<i>H-Bond</i>	2.29
	Gua18E	<i>H-Bond</i>	2.29
	Gua17E	$\pi$ - $\pi$ T-shaped	5.86
	Cyt19E	<i>Attractive Charge</i>	3.89
	DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') <sup>e</sup>	Gua4A	$\pi$ -Donor <i>H-Bond</i>
Gua4A		$\pi$ - $\pi$ T-shaped	5.46
<i>C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase</i> <sup>f</sup>	Ala134A	<i>Hydrophobic</i>	4.31
	Val137A	<i>Hydrophobic</i>	3.74
	Val137A	<i>Hydrophobic</i>	4.65
	Leu164A	<i>Hydrophobic</i>	5.17
	Val133A	<i>H-Bond</i>	3.27
	Cys44A	$\pi$ -Sulfur	5.23

<i>MtlD</i> <sup>g</sup>	Asp48A	<i>Attractive Charge</i>	4.05
	Ile11A	<i>Hydrophobic</i>	3.99
	Ala88A	<i>Hydrophobic</i>	4.79
	Ile152A	<i>Hydrophobic</i>	4.79
	Val149A	<i>H-Bond</i>	2.52
	Asp276A	<i>H-Bond</i>	3.69
	Asp150A	<i>Attractive Charge</i>	4.74
	Ala88A	<i>Halogen (Fluorine)</i>	3.30
	Val89A	<i>Halogen (Fluorine)</i>	3.42
	<i>Panton-Valentine Leucocidin S Component</i> <sup>h</sup>	Ile92H	<i>Hydrophobic</i>
Val146F		<i>Hydrophobic</i>	4.23
Asn93H		<i>H-Bond</i>	3.67
Ser128A		<i><math>\pi</math>-Cation</i>	3.09
Phe117H		<i><math>\pi</math>-<math>\pi</math> T-shaped</i>	6.00
Lys97F		<i>Halogen (Fluorine)</i>	3.14
Lys43H		<i>Unfavorable Positive-Positive</i>	3.91
<i>S. aureus alpha hemolysin</i> <sup>i</sup>		Ile14A	<i>Hydrophobic</i>
	Val20A	<i>Hydrophobic</i>	5.31
	Arg56A	<i>H-Bond</i>	2.66
	His144A	<i>H-Bond</i>	3.07
	Tyr118A	<i><math>\pi</math>-<math>\pi</math> Stacked</i>	4.91
	Ile14A	<i>Halogen (Fluorine)</i>	3.01
<i>Acyl-PBP2a</i> <sup>j</sup>	Leu147A	<i>Hydrophobic</i>	3.54
	Lys148B	<i>Hydrophobic</i>	4.73
	Glu239B	<i>H-Bond</i>	2.32
	Glu239B	<i>H-Bond</i>	3.43
	Glu239B	<i><math>\pi</math>-Anion</i>	3.84
	Glu239B	<i>Salt Bridge; Attractive Charge</i>	3.11
	Glu315A	<i>Attractive Charge</i>	4.10
<i>S. aureus TyrRS</i> <sup>k</sup>	Ala39A	<i>Hydrophobic</i>	4.17
	Cys37A	<i>H-Bond</i>	3.54
	Asp80A	<i>H-Bond</i>	3.64
	Asp195A	<i>H-Bond</i>	3.50
	Asp40A	<i>Attractive Charge</i>	5.15
	Asp80A	<i>Attractive Charge</i>	4.33
	Asp195A	<i>Attractive Charge</i>	4.59

a. Estrutura cristalina de *S. aureus FtsA* - PDB ID: 3WQU.

b. Estrutura cristalina de *Wild-type S. aureus DHFR* - PDB ID: 2W9G

- c. Estrutura cristalina de *S. aureus* gyrase complex with DNA - PDB ID: 2XCT
- d. Estrutura cristalina de *S. aureus* gyrase - PDB ID: 5BS3
- e. Estrutura cristalina de DNA (5'- D(\*CP\*GP\*CP\*GP\*AP\*AP\*TP\*TP\*CP\*GP\*CP\*G)-3') - PDB ID: 453D
- f. Estrutura cristalina de C(30) carotenoid dehydrosqualene synthase - PDB ID: 2ZCQ
- g. Estrutura cristalina de MtlD - PDB ID: 5JNM
- h. Estrutura cristalina de Panton-Valentine Leucocidin S Component - PDB ID: 1T5R
- i. Estrutura cristalina de *S. aureus* alpha hemolysin - PDB ID: 4IDJ
- j. Estrutura cristalina de Acyl-PBP2a - PDB ID: 3ZFZ
- k. Estrutura cristalina de *S. aureus* TyrRS - PDB ID: 1JJ

### 6.3 Atividade frente biofilme de *Staphylococcus aureus*

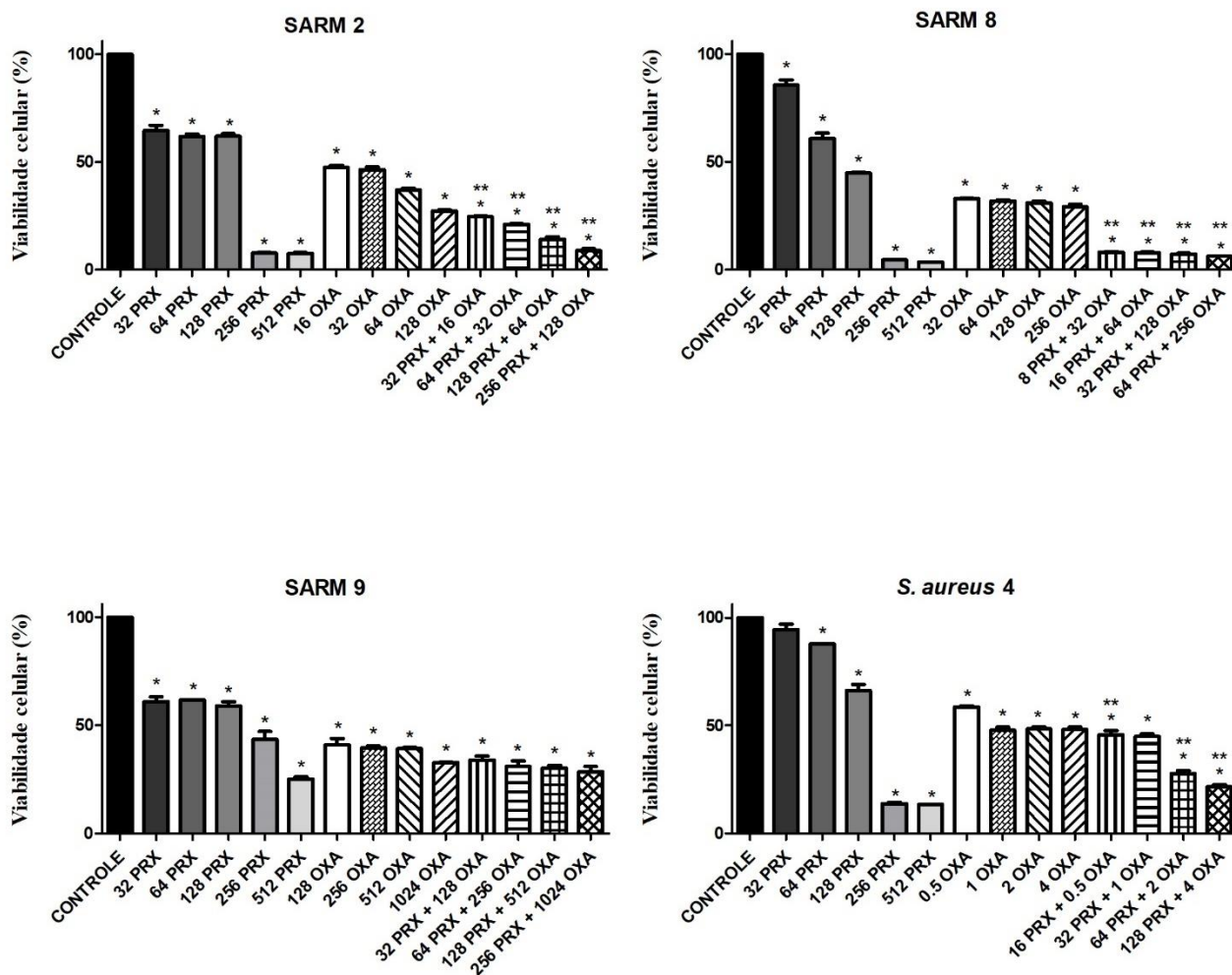
#### 6.3.1 Paroxetina isolada e associada à oxacilina apresenta ação frente biofilmes formados por *S. aureus*

A paroxetina exibiu redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle a partir de 32 µg/mL (CIM/2) para as cepas de SARM, e de 64 µg/mL (CIM) para o isolado de *S. aureus* sensível a meticilina testado. Em relação a associação da paroxetina com a oxacilina, todas as cepas demonstraram diminuição significativa da viabilidade celular em relação ao controle (Gráfico 3).

No que diz respeito à comparação da atividade associada com a oxacilina isolada, para SARM 2 e SARM 8 foi verificado que para todas as concentrações combinadas de paroxetina e oxacilina houve uma redução significativa em relação a mesma concentração da oxacilina testada isoladamente. No entanto, para SARM 9 não foi constatada redução considerável entre o associado e a oxacilina. Para *S. aureus* 4, nas concentrações de CIM (16 µg/mL de paroxetina e 0,5 µg/mL de oxacilina), 4x CIM (64 µg/mL de paroxetina e 2 µg/mL de oxacilina) e 8x CIM (128 µg/mL de paroxetina e 4 µg/mL de oxacilina) associado foi verificada significância em comparação a mesma concentração da oxacilina testada isoladamente.



Gráfico 3 - Atividade da paroxetina isolada e em associação a oxacilina frente biofilmes formados por *S. aureus*.



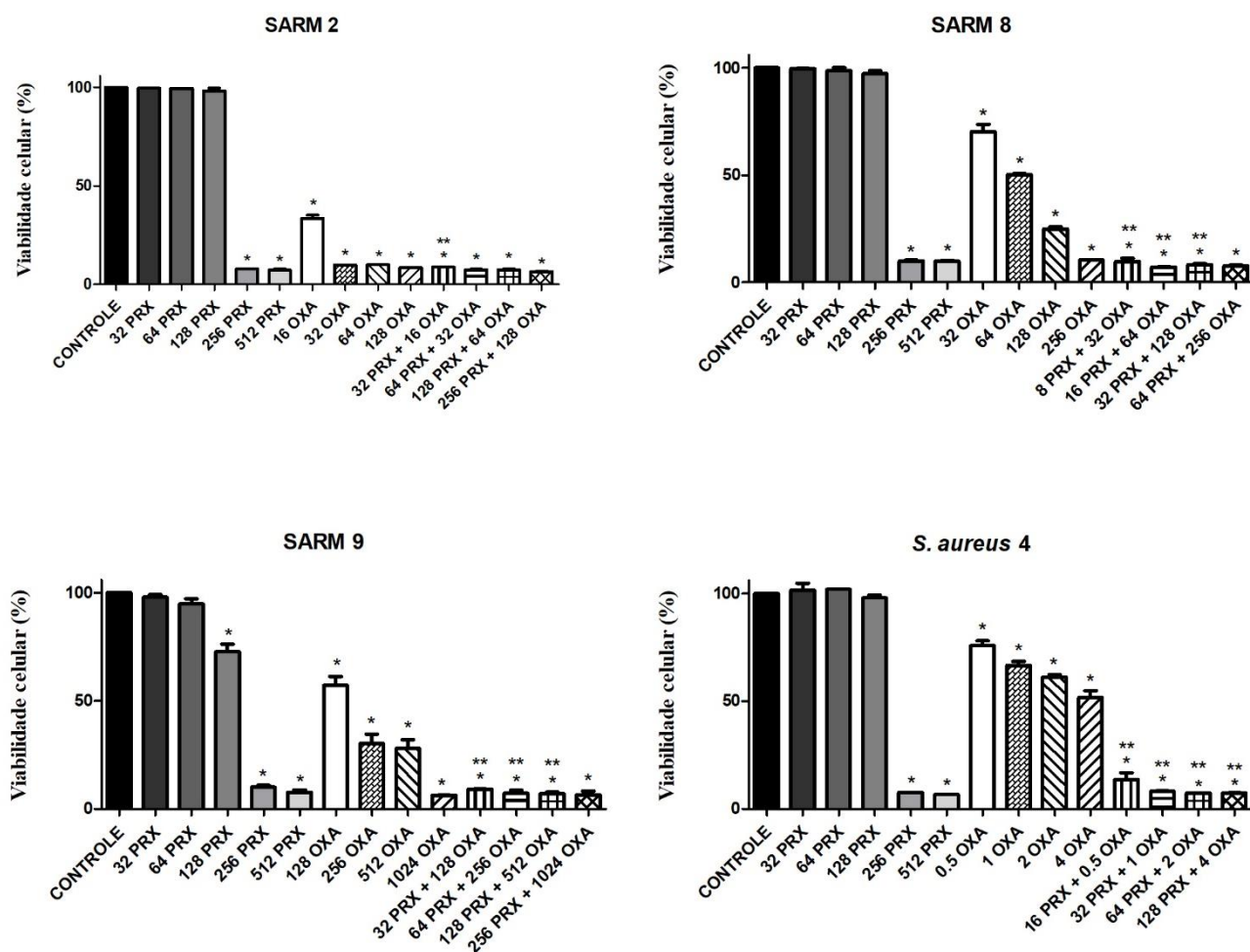
Concentrações testadas da paroxetina isolada: CIM/2 (32µg/mL), CIM (64 µg/mL), 2x CIM (128 µg/mL), 4x CIM (256 µg/mL) and 8x CIM (512 µg/mL). Concentrações testadas da paroxetina combinada a oxacilina: SARM 2 CIM (32 µg/mL PRX + 16 µg/mL OXA), 2x CIM (64 µg/mL PRX + 32 µg/mL OXA), 4x CIM (128 µg/mL PRX + 64 µg/mL OXA) e 8x CIM (256 µg/mL PRX + 128 µg/mL OXA); SARM 8 CIM (8 µg/mL PRX + 32 µg/mL OXA), 2x CIM (16 µg/mL PRX + 64 µg/mL OXA), 4x CIM (32 µg/mL PRX + 128 µg/mL OXA) e 8x CIM (64 µg/mL PRX + 256 µg/mL OXA); SARM 9 CIM (32 µg/mL PRX + 128 µg/mL OXA), 2x CIM (64 µg/mL PRX + 256 µg/mL OXA), 4x CIM (128 µg/mL PRX + 512 µg/mL OXA) e 8x CIM (256 µg/mL PRX + 1024 µg/mL OXA); *S. aureus* 4 CIM (16 µg/mL PRX + 0,5 µg/mL OXA), 2x CIM (32 µg/mL PRX + 1 µg/mL OXA), 4x CIM (64 µg/mL PRX + 2 µg/mL OXA) e 8x CIM (128 µg/mL PRX + 4 µg/mL OXA). \*p < 0,05 comparado ao controle e \*\* p < 0,05 comparado com a oxacilina isolada na mesma concentração. Os dados foram submetidos ao ANOVA seguido pelo teste de Turkey.

### **6.3.2 Paroxetina isolada e associada a oxacilina apresenta potencial antibiofilme frente *S. aureus***

Na atividade antibiofilme, a paroxetina exibiu significante redução da viabilidade celular em comparação ao controle a partir de 256 µg/mL para SARM 2, SARM 8 e *S. aureus* 4. Para as concentrações de 32 µg/mL, 64 µg/mL e 128 µg/mL, não houve diminuição considerável da viabilidade celular nestes isolados. No entanto, para SARM 9, a partir de 128 µg/mL houve redução significativa. No que concerne a associação da paroxetina com a oxacilina, todos os isolados demonstraram diminuição ( $p < 0,05$ ) da viabilidade celular em relação ao controle (Gráfico 4).

No que se refere à comparação da ação associada com a oxacilina isolada, para *S. aureus* 4 foi observado que considerando todas as concentrações combinadas de paroxetina e oxacilina, ocorreu redução significativa em relação a mesma concentração da oxacilina avaliada de forma isolada. As seguintes concentrações da CIM associada foram significativas em relação a mesma concentração de oxacilina testada isolada para SARM 2 CIM (32 µg/mL de paroxetina e 16 µg/mL de oxacilina); SARM 8 CIM (8 µg/mL de paroxetina e 32 µg/mL de oxacilina), 2x CIM (16 µg/mL de paroxetina e 64 µg/mL de oxacilina) e 4x CIM (32 µg/mL de paroxetina e 128 µg/mL de oxacilina); para SARM 9 CIM (32 µg/mL de paroxetina e 128 µg/mL de oxacilina), 2x CIM (64 µg/mL de paroxetina e 256 µg/mL de oxacilina) e 4x CIM (128 µg/mL de paroxetina e 512 µg/mL de oxacilina).

Gráfico 4 - Atividade da paroxetina isolada e em associação a oxacilina frente biofilmes em formação de *S. aureus*.

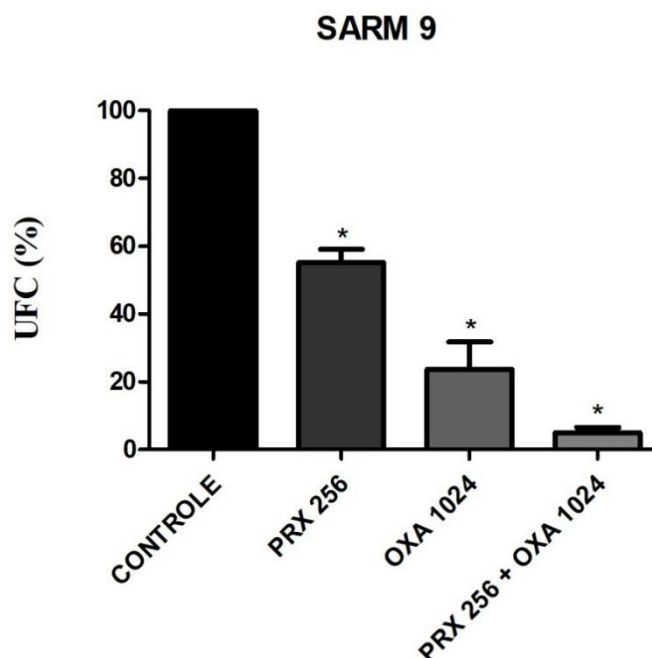


Concentrações testadas da paroxetina isolada: CIM/2 (32µg/mL), CIM (64 µg/mL), 2x CIM (128 µg/mL), 4x CIM (256 µg/mL) and 8x CIM (512 µg/mL). Concentrações testadas da paroxetina combinada a oxacilina: SARM 2 CIM (32 µg/mL PRX + 16 µg/mL OXA), 2x CIM (64 µg/mL PRX + 32 µg/mL OXA), 4x CIM (128 µg/mL PRX + 64 µg/mL OXA) e 8x CIM (256 µg/mL PRX + 128 µg/mL OXA); SARM 8 CIM (8 µg/mL PRX + 32 µg/mL OXA), 2x CIM (16 µg/mL PRX + 64 µg/mL OXA), 4x CIM (32 µg/mL PRX + 128 µg/mL OXA) e 8x CIM (64 µg/mL PRX + 256 µg/mL OXA); MRSA 9 CIM (32 µg/mL PRX + 128 µg/mL OXA), 2x CIM (64 µg/mL PRX + 256 µg/mL OXA), 4x CIM (128 µg/mL PRX + 512 µg/mL OXA) e 8x CIM (256 µg/mL PRX + 1024 µg/mL OXA); *S. aureus* 4 CIM (16 µg/mL PRX + 0.5 µg/mL OXA), 2x CIM (32 µg/mL PRX + 1 µg/mL OXA), 4x CIM (64 µg/mL PRX + 2 µg/mL OXA) e 8x CIM (128 µg/mL PRX + 4 µg/mL OXA). \*p < 0,05 comparado ao controle e \*\* p < 0,05 comparado com a oxacilina isolada na mesma concentração. Os dados foram submetidos ao ANOVA seguido pelo teste de Turkey.

### 6.3.3 Cateter impregnado com paroxetina isolada e associada à oxacilina atua na prevenção da formação de biofilme de *S. aureus*

No tratamento prévio do cateter com paroxetina em 256 µg/mL, foi verificado que houve uma redução de 44,81% em UFC/mL em comparação ao controle. Para a oxacilina em 1024 µg/mL, foi constatada redução de 76,23% em UFC/mL. Na associação, a qual correspondeu a 256 µg/mL de paroxetina e 1024 µg/mL de oxacilina (8x CIM associado), foi obtida redução de 94,94% em UFC/mL. Todos os tratamentos resultaram em redução significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação ao controle não impregnado (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Prevenção da formação de biofilme de SARM em cateter venoso periférico impregnado com paroxetina isolada e em combinação a oxacilina.



Contagem de colônias (% UFC/mL) de cateteres impregnados com paroxetina isolada e associada a oxacilina. Concentrações testadas: PRX 256 µg/mL, OXA 1024 µg/mL, PRX 256 µg/mL + OXA 1024 µg/mL. PRX: Paroxetine; OXA: oxacillin. \* $p < 0,05$  comparado ao controle. Os dados foram submetidos ao ANOVA seguido pelo teste de Turkey.

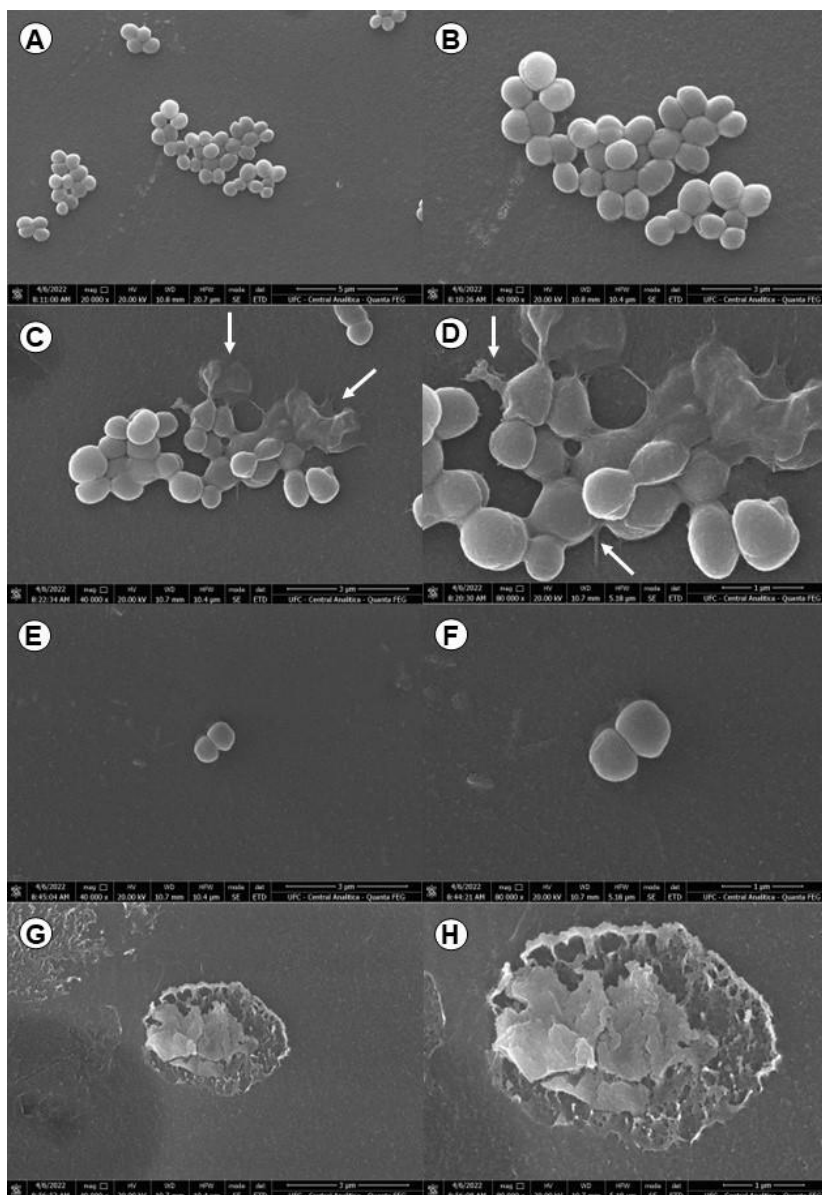
## 6.4 Avaliação morfológica

### 6.4.1 Paroxetina isolada e associada a oxacilina gera alterações em células planctônicas de *S. aureus*

As imagens obtidas por MEV demonstraram a diferença morfológica da célula bacteriana frente aos tratamentos realizados (Figura 7). No controle (Figura 7A e 7B), são

observados cocos agrupados em cachos, os quais são característicos do gênero *Staphylococcus*. No tratamento realizado com a paroxetina (Figura 7C e 7D) na concentração de CIM (64  $\mu\text{g/mL}$ ), foi verificado dano na morfologia do microrganismo, demonstrando a lesão da célula microbiana. Em relação à ação da oxacilina (Figura 7E e 7F) na concentração da CIM (256  $\mu\text{g/mL}$ ), foi constatada notória diminuição do número de células. Na associação da paroxetina e oxacilina (Figura 7G and 7H) na CIM associada (32  $\mu\text{g/mL}$  de paroxetina e 128  $\mu\text{g/mL}$  de oxacilina) foi evidenciada intensa destruição celular.

Figura 76 - MEV de células planctônicas de SARM.



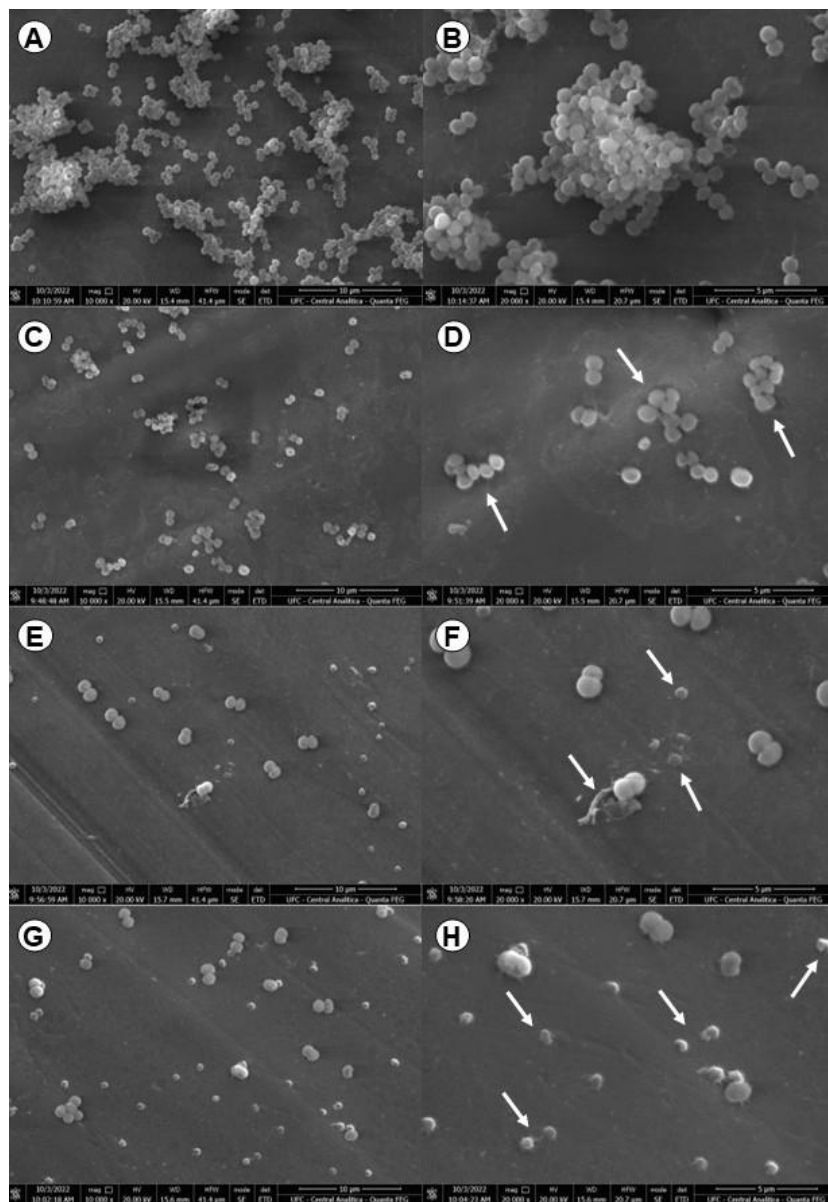
(A e B) Controle. (C e D) Tratamento com paroxetina em 64  $\mu\text{g/mL}$ . (E e F) Tratamento com oxacilina em 256  $\mu\text{g/mL}$ . (G e H) Tratamento associado (paroxetina 32  $\mu\text{g/mL}$  + oxacilina 128  $\mu\text{g/mL}$ ). Para o controle,

foram utilizadas ampliações de 20000x e 40000x (barra: 5  $\mu\text{m}$  e 3  $\mu\text{m}$ ), e para os tratamentos, as ampliações de 40000x e 80000x (barra: 3  $\mu\text{m}$  e 1  $\mu\text{m}$ ).

#### ***6.4.2 Inibição da formação de biofilme de *S. aureus* em cateteres impregnados com paroxetina isolada e associada a oxacilina evidenciado por MEV***

Nas Figuras 8A e 8B estão demonstrados o cateter não impregnado contendo células formando grandes agrupamentos em cachos, apresentando uma alta densidade populacional microbiana. Nas Figuras 8C e 8D, correspondentes à impregnação realizada com paroxetina (256  $\mu\text{g/mL}$ ), houve notória redução do número de células. Nas Figuras 8E e 8F, as quais dizem respeito à impregnação com a oxacilina (1024  $\mu\text{g/mL}$ ), também evidenciam diminuição na quantidade de células, bem como tamanho reduzido destas e restos celulares. As Figuras 8G e 8H, em que consta a impregnação da associação (256  $\mu\text{g/mL}$  de paroxetina + 1024  $\mu\text{g/mL}$  de oxacilina), foram verificadas células com o mesmo padrão de crescimento destacado anteriormente, evidenciando a atividade combinada das drogas.

Figura 8 - MEV de cateter intravenoso periférico impregnado com paroxetina e oxacilina isoladas e associadas, submetido a formação de biofilme de SARM.



(A e B) Controle. (C e D) Tratamento com paroxetina em 256 µg/mL. (E e F) Tratamento com oxacilina em 1024 µg/mL. (G e H) Tratamento associado (paroxetina 256 µg/mL + oxacilina 1024 µg/mL). Foram utilizadas ampliações de 10000x e 20000x (barra: 10 µm e 5 µm).

## 7. DISCUSSÃO

O uso prolongado e extensivo de antibióticos resultou no desenvolvimento de RAM (ABUSHAHEEN et al., 2020). Diante deste cenário, os patógenos ESKAPE são ressaltados (DE OLIVEIRA et al., 2020), de forma que em relação aos Gram positivos pertencentes a este grupo, o SARM é evidenciado por sua prevalência (DA ROSA et al., 2020). Considerando terapias alternativas para o tratamento, o reposicionamento de fármacos tem sido adotado por empresas farmacêuticas como uma estratégia eficaz (HUA et al., 2022).

Neste estudo foi verificado que a paroxetina exibiu CIM correspondente a 64 µg/mL frente a todos os isolados de *S. aureus* testados, e apresentou ação do tipo bactericida. Estes resultados corroboram com dados presentes na literatura, em que trabalhos mostram esta mesma CIM para cepa *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 95923, e na faixa de 32-512 µg/mL para isolados clínicos multirresistentes deste microrganismo, com nível de tolerância interpretado em bactericida na CBM (FOLETTTO et al., 2020; FOLETTTO et al., 2021b).

No presente estudo também foi realizada a associação entre a paroxetina e oxacilina, havendo sido verificado 55% de interações aditivas, 25% sinérgicas e 20% indiferentes. É importante ressaltar que além da atividade apresentada isoladamente, combinações de medicamentos com diferentes mecanismos de ação se configura em uma abordagem alternativa para aumentar as chances de sucesso no reposicionamento de medicamentos (SUN; SANDERSON; ZHENG, 2016). Na literatura, não há dados sobre a interação farmacológica entre paroxetina e oxacilina, sendo apenas descrito em relação a atividade associada ao ciprofloxacino, em que foram verificadas interações sinérgicas em 20 isolados multirresistentes de *S. aureus* no estudo de Foletto et al. (2021b), e para além de sinergismo, foram verificadas interações indiferentes em 4 cepas de *S. aureus* na pesquisa de Foletto et al. (2020).

Nesse sentido, para compreensão dos possíveis mecanismos envolvidos na atividade antibacteriana da paroxetina foram realizados testes de citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e *molecular docking*. A avaliação da captação de PI por citometria de fluxo é utilizada para monitoramento da morte celular (DAVEY; HEXLEY, 2011), tendo em vista que dentre as características que a indicam, se tem inclusas o prejuízo da função de transporte através da membrana plasmática e perda da sua



integridade estrutural (DARZYNKIEWICZ et al., 1997). Considerando que com a penetração do PI se tem o indicativo da viabilidade celular (SHI et al., 2007), a paroxetina isolada, e em maior proporção estando associada a oxacilina, promoveu absorção aumentada do PI em comparação ao controle, caracterizando que este mecanismo está envolvido no processo de morte bacteriana.

Ademais, foi realizado o ensaio de TUNEL, o qual detecta a fragmentação de fitas de DNA usando desoxinucleotidil-transferase terminal (TdT), catalisando a ligação de análogos de desoxinucleotídeos modificados (dUTPs) nas quebras de fita de DNA (MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018). A partir da avaliação realizada, foi demonstrada fragmentação do DNA induzida pelo tratamento com paroxetina isolada e principalmente associada à oxacilina. Semelhantemente, a fluoxetina, também pertencente à classe dos inibidores seletivos de recaptção da serotonina, demonstrou resultado indicativo de dano a membrana e fragmentação do DNA em células de SARM (ANDRADE NETO et al., 2019). A paroxetina é descrita na literatura por sua afinidade em se ligar ao DNA (NIMAL et al. 2023), no entanto, sua segurança é reforçada tendo em vista ensaios de Costa Silva et al. (2017) em células L929, ao qual a paroxetina não exibiu citotoxicidade após 72h de exposição (IC 50 > 100 µg/mL).

O dano ao DNA é reforçado pelos resultados obtidos através de *molecular docking*, em que a paroxetina interagiu com os receptores *S. aureus gyrase complex with DNA*<sup>c</sup> (-9.7 kcal/mol) e *S. aureus gyrase*<sup>d</sup> (-9.8 kcal/mol), de forma que em nosso estudo estes foram destacados devido aos melhores valores de energia de afinidade dentre os alvos analisados, considerando que o valor padrão da energia livre de ligação na literatura é - 6,0 kcal/mol ou menos (MARINHO et al., 2020). A DNA girase bacteriana tem sido utilizada para triagem virtual de compostos na descoberta de novas classes de antibióticos frente cepas de *S. aureus* (DURDAGI et al., 2018), constituindo um dos principais alvos contra a resistência de microrganismos (ALAGUMUTHU et al., 2018).

Tendo também em vista que a biossíntese de proteínas historicamente está entre os principais alvos bem sucedidos das classes de antibióticos (OCHSNER et al., 2007), outro complexo é ressaltado em relação à energia de ligação com a paroxetina (-8.8 kcal/mol), representando potencial para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos, ao qual diz respeito a *TyrRS* (KADRI et al., 2022; QIU et al., 2001).

Nos últimos anos, diversos inibidores de *TyrRS* foram sintetizados para tratamentos nesse contexto, no entanto, problemas metabólicos, toxicidade *in vivo*, baixa

seletividade e penetração na célula microbiana estão entre os fatores elencados que geram falha na chegada dessas substâncias à clínica (SUN; LV; ZHU, 2017). Nesse cenário, é interessante destacar o estudo de El-Nabarawi et al. (2013), ao qual foram produzidos lipossomas carreadores contendo 20 mg de paroxetina utilizando adesivos transdérmicos, havendo sido observado aumento na biodisponibilidade do fármaco por essa via e ausência de sinais de irritação ou inflamação na pele em ensaio *in vivo* em coelhos, evidenciando a aplicabilidade e segurança da paroxetina.

Junto a isso, considerando que *S. aureus* é o principal patógeno responsável por infecções na pele (PARLET; BROWN; HORSWILL, 2019) e a capacidade de penetração da paroxetina na célula bacteriana evidenciada pelos resultados obtidos na citometria de fluxo e MEV, em que foi verificado considerável dano na estrutura da célula bacteriana, ressalta-se o promissor potencial de aplicação deste fármaco. A paroxetina também demonstrou atuar sobre fatores associados a virulência, principalmente na *C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase* (-9.8 kcal/mol), envolvida na síntese de estafiloxantina, pigmento que desativa espécies reativas de oxigênio e regula propriedades mecânicas da membrana bacteriana (LIU et al., 2005; YEHA; YOUSEF; ASKOURA, 2022). Para além disso, na literatura não há dados acerca da atividade da paroxetina sobre os alvos investigados no *molecular docking*, evidenciando o ineditismo deste estudo.

Sob a perspectiva de células sésseis, *S. aureus* é um patógeno oportunista que pode produzir robustos biofilmes em superfícies bióticas ou abióticas, sendo uma das causas mais frequentes de infecções associadas a estas comunidades microbianas em dispositivos médicos residentes (SCHILCHER; HORSWILLA, 2020). A formação de biofilme por SARM e *S. aureus* sensível à meticilina é considerada um importante fator de virulência, influenciando em sua persistência (PIECHOTA et al., 2018). Assim, o descobrimento de novas estratégias de tratamento contra infecções associadas a biofilme é urgente tendo em vista a resistência apresentada aos antimicrobianos comumente utilizados (GEBREYOHANNES et al., 2019).

A paroxetina é relatada na literatura com relação à atividade contra células planctônicas de *S. aureus* (FOLETTTO et al. 2020; FOLETTTO et al. 2021b), no entanto, não há dados sobre a ação contra biofilmes desse microrganismo. Assim, neste estudo foi avaliado o potencial da paroxetina frente biofilme pré-formado e em formação de *S. aureus*, de forma que esta isoladamente e em associação à oxacilina exibiu redução

significativa da viabilidade celular. A análise foi realizada considerando o tratamento de um biofilme já estabelecido, estratégia reportada na literatura a qual se caracteriza em explorar o uso de antibióticos em concentrações mais altas ou em diferentes combinações para obter efeitos terapêuticos máximos (SURESH; BISWAS; BISWAS, 2019), e frente ao biofilme em formação, reduzindo as chances de sua instalação (ASMA et al., 2022).

Neste contexto, Josino et al. (2021) verificou que a fluoxetina, também pertencente aos ISRSs, gerou redução da viabilidade celular frente biofilme de *S. aureus*, com inibição de aproximadamente 90% para *S. aureus* sensível à meticilina e 80% para SARM a partir de 4xCIM (1020 µg/mL). Os resultados com a paroxetina demonstram que a partir de 4xCIM (256 µg/mL) houve redução  $\geq 90\%$  da viabilidade celular para SARM 2 e SARM 8 em biofilme formado e para todos os isolados no biofilme em formação, corroborando com os resultados da fluoxetina na literatura.

Pesquisa realizada por Nzakizwanayo et al. (2017) também corrobora com o perfil de atividade dos ISRSs frente biofilme, em que a fluoxetina (128 µg/mL) demonstrou reduzir a taxa de formação de biofilme cristalino de *Proteus mirabilis* em modelo de cateter urinário, e aumentar o tempo de bloqueio destes.

A formação de biofilme na área da saúde é uma questão de considerável preocupação, de forma que há uma alta demanda por novas alternativas além das terapias antibióticas convencionais para controlar infecções associadas a biofilme. Uma abordagem que tem sido empregada diz respeito a modificação de biomateriais que são utilizados em dispositivos médicos para evitar a formação de biofilmes (SUBHADRA et al., 2018). Substâncias como clorexidina, sulfadiazina de prata, rifampicina e miconazol tem sido estudadas em cateteres impregnados por diminuir o risco de infecção de corrente sanguínea relacionada a cateter (LORENTE et al., 2016).

Neste contexto, realizou-se a impregnação de cateteres intravenosos periféricos com paroxetina isolada e associada a oxacilina com o intuito de verificar o potencial na prevenção da formação de biofilme de *S. aureus*, o qual foi constatado, sendo verificado que a paroxetina associada a oxacilina obteve os melhores resultados de inibição em UFC/mL. A impregnação de antibióticos e outros agentes antimicrobianos em cateteres fornece uma estratégia de obtenção de materiais funcionais para limitar a colonização bacteriana e formação de biofilme (LIU et al., 2020).

A sertralina, fármaco da classe dos ISRSs, foi objeto de estudo por Muthu et al. (2019) como uma abordagem para o tratamento da osteomielite, em que foram

sintetizadas nanopartículas de hidroxiapatita com sertralina, sendo posteriormente prensadas em formatos de discos e avaliadas quanto a metodologia de contagem de colônias e MEV, dentre as análises microbiológicas realizadas. Foi constatado que o produto sintetizado efetivamente reduziu as colônias bacterianas em relação ao controle sem sertralina, e preveniu a formação de biofilme de *S. aureus*. Ademais, por MEV observou-se células rompidas e danificadas, demonstrando evidências de dano na parede celular e vazamento do conteúdo intracelular. No presente estudo, todas as impregnações resultaram em redução do número de células, havendo indícios de alterações celulares dentre os tratamentos realizados.

Diante deste contexto, os ISRS são reconhecidos por obstruir o desempenho de bombas efluxo, em que a paroxetina foi um dos primeiros fármacos desta classe a ser identificado como inibidor do tipo NorA e MepA (GERMAN; KAATZ; KERNS, 2008; KAUR et al., 2021). Tendo em vista que a inibição das bombas de efluxo pode interromper simultaneamente a formação de biofilme e a via de sinalização celular, *quorum sensing* (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018; KAUR et al., 2021), postula-se que este mecanismo possivelmente esteja envolvido na atividade da paroxetina frente biofilme. É também importante destacar que a coadministração com antibióticos que são substratos da bomba pode aumentar os níveis intracelulares da droga, trazendo uma nova eficácia aos agentes antiestafilocócicos existentes (SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013).

Em suma, a paroxetina demonstra potencial atividade frente biofilme formado de *S. aureus*, bem como contra seu processo de formação. Além disso, verificou-se que a associação entre paroxetina e oxacilina obteve a maior efetividade para prevenção da formação de biofilme em cateter intravenoso periférico. As imagens obtidas por MEV evidenciaram que a impregnação resultou em redução microbiana no cateter.

De acordo com estudo de Sato et al. (2017), infecções de corrente sanguínea relacionadas a cateter vascular periférico são uma causa significativa de infecção relacionada a saúde, em que a bacteremia por *S. aureus* continua sendo um grande problema que pode influenciar no prognóstico. Nessa perspectiva, a paroxetina isolada e associada a oxacilina demonstra atividade *in vitro* frente biofilme de *S. aureus* com potencial aplicação na área biomédica, tendo em vista os resultados antibiofilme em cateter intravenoso periférico impregnado com estes fármacos, caracterizando uma alternativa terapêutica na prevenção de infecções por *S. aureus*.

Poucos estudos abordam a atividade da paroxetina contra biofilmes microbianos. Nobile et al. (2020) e Pereira et al. (2021) relatam a atividade deste ISRS contra células sésseis de *C. albicans* e *C. neoformans*, respectivamente. No entanto, a atividade da paroxetina em biofilmes bacterianos não foi explorada na literatura, destacando a originalidade do presente estudo.

## 8. CONCLUSÃO

Diante da crescente resistência aos antimicrobianos, o reposicionamento de fármacos se caracteriza em uma potencial estratégia. A paroxetina demonstrou atividade antibacteriana frente cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina, causando dano estrutural na célula bacteriana, com alvos de ação principalmente relacionados à integridade de membrana, DNA, biossíntese de proteínas e fatores de virulência. A paroxetina também demonstrou ação frente biofilmes de *S. aureus*, com potencial aplicação para prevenção da formação destas comunidades microbianas sésseis em cateter. Assim, este estudo contribui para a elucidação da atividade antibacteriana da paroxetina, a qual se apresenta como alternativa terapêutica frente *S. aureus*. Estudos futuros são necessários para averiguar a sua aplicabilidade *in vivo* e possibilidades sobre formulações farmacêuticas.

## 9. REFERÊNCIAS

- ABUSHAHEEN, M. A. et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, p. 1–21, 2020.
- ADEYANJU, A. et al. Local Epidemiology of Nosocomial *Staphylococcus aureus* Infection in a Nigerian University Teaching Hospital. **Antibiotics**, v. 11, n. 10, p. 1–18, 2022.
- AGNIHOTRY, S. et al. **Computer-Aided Drug Design**. 2020.
- AL-MEBAIK, N. F. et al. A review of virulence factors, pathogenesis, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Reviews and Research in Medical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 50–56, 2016.
- ALAGUMUTHU, M. et al. Computational Approaches to Develop Isoquinoline Based Antibiotics through DNA Gyrase Inhibition Mechanisms Unveiled through Antibacterial Evaluation and Molecular Docking. **Molecular Informatics**, v. 37, n. 12, 2018.
- ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2003–2020, 2018.
- ALGAMMAL, A. M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 3255–3265, 2020.
- ALHUSSEIN, F. et al. Human infections caused by *Staphylococcus argenteus* in Germany: genetic characterisation and clinical implications of novel species designation. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 39, n. 12, p. 2461–2465, 2020.
- ANDRADE, M. M. et al. The History of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2020, 2020.
- ANDRADE NETO, J. B. DE et al. Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, p. 104892, jun. 2021.
- ANDRADE NETO, J. B. 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. August 2017, p. 335–340, 2019.

- ASMA, S. T. et al. An Overview of Biofilm Formation–Combating Strategies and Mechanisms of Action of Antibiofilm Agents. **Life**, v. 12, n. 8, p. 1110, 2022.
- ASSEFA, M.; AMARE, A. Biofilm-Associated Multi-Drug Resistance in Hospital-Acquired Infections: A Review. **Infection and Drug Resistance**, v. 15, p. 5061–5068, 2022.
- BAL, A. M. et al. Future trends in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection: An in-depth review of newer antibiotics active against an enduring pathogen. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, p. 295–303, 2017.
- BALASUBRAMANIAN, D. et al. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 1, p. 1–13, 2017.
- BARBAROSSA, A. et al. Non-Antibiotic Drug Repositioning as an Alternative Antimicrobial Approach. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, p. 816, 2022.
- BAX, B. D. et al. Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. **Nature**, v. 466, n. 7309, p. 935–940, ago. 2010.
- BECKER, K. **Chapter 2 - Pathogenesis of Staphylococcus aureus**. 2018.
- BELETE, T. M. Novel targets to develop new antibacterial agents and novel alternatives to antibacterial agents. **Human Microbiome Journal**, v. 11, p. 100052, 2019.
- BHATTACHARYA, M. et al. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 13, n. 12, p. 1499–1516, 2015.
- BIALVAEI, A. Z. et al. Linezolid: A promising option in the treatment of Gram-positives. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 2, p. 354–364, 2017.
- BIOVIA, D. S. Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San DiegoDassault Systèmes, 2016.
- BOLHUIS, A.; ALDRICH-WRIGHT, J. R. DNA as a target for antimicrobials. **Bioorganic chemistry**, v. 55, p. 51–59, 2014.
- BOSWIHI, S. S.; UDO, E. E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An update on the epidemiology, treatment options and infection control. **Current Medicine Research and Practice**, v. 8, n. 1, p. 18–24, 2018.
- BOURIN, M.; CHUE, P.; GUILLON, Y. Paroxetine: A Review. **CNS drug reviews**, v. 7, n. 1, p. 25–47, 2001.
- BOYD, N. K.; TENG, C.; FREI, C. R. Brief Overview of Approaches and Challenges in New Antibiotic Development: A Focus On Drug Repurposing. **Frontiers in Cellular and**



**Infection Microbiology**, v. 11, n. May, p. 1–12, 2021.

BRAGA, I. A. et al. Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 99, n. 3, p. 318–324, 2018.

BRAMBILLA, L. Z. S. et al. Anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA of neolignans and extract of *Piper regnellii*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 1, p. 112–117, 2017.

CABALLERO, A. R. et al. Effectiveness of Alpha-toxin Fab Monoclonal Antibody Therapy in Limiting the Pathology of *Staphylococcus aureus* Keratitis. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 23, n. 4, p. 297–303, jul. 2015.

CARCIONE, D. et al. Old and new beta-lactamase inhibitors: Molecular structure, mechanism of action and clinical use. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 1–14, 2021.

CASSINI, A. et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 56–66, 2019.

CHEMAXON. Marvin A full featured chemical editor for making science accessible on all platforms, 2019. Disponível em: <https://chemaxon.com/products/marvin>.

CHEN, Y. H. et al. Prevalence and molecular characterizations of *Staphylococcus aureus* nasal colonization among patients in pediatric intensive care units in Taiwan. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2020.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021.

CHUKWUDI, C. U.; GOOD, L. Doxycycline inhibits pre-rRNA processing and mature rRNA formation in *E. coli*. **Journal of Antibiotics**, v. 72, n. 4, p. 225–236, 2019.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. **CLSI document M07-A10**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st ed. **CLSI supplement M100**. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2021.

CONG, Y.; YANG, S.; RAO, X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. **Journal of Advanced Research**, v. 21, p. 169–176, 2020.

- COSTA SILVA, R. A. et al. In vitro anti-*Candida* activity of selective serotonin reuptake inhibitors against fluconazole-resistant strains and their activity against biofilm-forming isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 341–348, 2017.
- COWAN, S. T. Classification of Staphylococci by slide agglutination. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 48, p. 169–173, 1939.
- COWAN, S. T.; SHAW, C.; WILLIAMS, R. E. O. Type strain for *Staphylococcus aureus* Rosenbach. **Journal of general microbiology**, v. 10, n. 1, p. 174–176, 1954.
- CRAFT, K. M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. **MedChemComm**, v. 10, n. 8, p. 1231–1241, 2019.
- CRUZ, A. R. et al. Staphylococcal protein A inhibits complement activation by interfering with IgG hexamer formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 7, 2021.
- CSIZMADIA, P. MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web. p. 1775, 2019. Disponível em: <https://chemaxon.com/presentation/marvinsketch-and-marvinview-molecule-applets-for-the-world-wide-web>.
- DA ROSA, T. F. et al. Alternatives for the treatment of infections caused by ESKAPE pathogens. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 45, n. 4, p. 863–873, 2020.
- DA SILVA, L. S. C. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization among healthcare workers at a tertiary care hospital in northeastern Brazil. **Infection Prevention in Practice**, v. 2, n. 4, p. 1–10, 2020.
- DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). **Cytometry**, v. 27, n. 1, p. 1–20, 1997.
- 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.
- DAVEY, H. M.; HEXLEY, P. Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 163–171, 2011.
- DE AZEVEDO, W. F. **Docking Screens for Drug Discovery**. Methods in Molecular Biology, 2019.
- DE OLIVEIRA, D. M. P. et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical**

- Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, p. 1–49, 2020.
- DECHANT, K. L.; CLISSOLD, S. P. Paroxetine. A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in Depressive Illness. **Drugs**, v. 41, n. 2, p. 225–253, 1991.
- DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3, Schrödinger LLC, 2020.
- DEY, J. et al. B and T cell epitope-based peptides predicted from clumping factor protein of *Staphylococcus aureus* as vaccine targets. **Microbial Pathogenesis**, v. 160, n. August, p. 105171, 2021.
- DIEKEMA, D. J. et al. Twenty-year trends in antimicrobial susceptibilities among *Staphylococcus aureus* from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Suppl 1, p. S47–S53, 2019.
- DIGHE, S. N.; COLLET, T. A. Recent advances in DNA gyrase-targeted antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 199, p. 112326, 2020.
- DO AV SÁ, L. G. et al. Etomidate inhibits the growth of MRSA and exhibits synergism with oxacillin. **Future Microbiology**, v. 15, n. 17, p. 1611–1619, 2020.
- DURDAGI, S. et al. Investigating the molecular mechanism of staphylococcal DNA gyrase inhibitors: A combined ligand-based and structure-based resources pipeline. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 85, p. 122–129, 2018.
- DWYER, D. J. et al. Antibiotic-Induced Bacterial Cell Death Exhibits Physiological and Biochemical Hallmarks of Apoptosis. **Molecular Cell**, v. 46, n. 5, p. 561–572, 2012.
- EL-NABARAWI, M. A. et al. Transdermal drug delivery of paroxetine through lipid-vesicular formulation to augment its bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 443, n. 1–2, p. 307–317, 2013.
- ELMESSERI, R. A. et al. Staphyloxanthin as a Potential Novel Target for Deciphering Promising Anti-*Staphylococcus aureus* Agents. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, 2022.
- FARHA, M. A.; BROWN, E. D. Drug repurposing for antimicrobial discovery. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 565–577, 2019.
- FISHER, L. E. et al. Biomaterial modification of urinary catheters with antimicrobials to give long-term broadspectrum antibiofilm activity. **Journal of Controlled Release**, v. 202, p. 57–64, 2015.
- FOLETTI, D. et al. Mechanism of Action and *In Vivo* Efficacy of a Human-Derived Antibody against *Staphylococcus aureus* alpha-Hemolysin. **Journal of Molecular**

**Biology**, v. 425, n. 10, p. 1641–1654, maio 2013.

FOLETTTO, V. S. et al. Repositioning of fluoxetine and paroxetine: study of potential antibacterial activity and its combination with ciprofloxacin. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, n. 3, p. 556–563, 2020.

FOLETTTO, V. S. et al. Repositioning of non-antibiotic drugs as an alternative to microbial resistance: a systematic review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 58, n. 3, 2021a.

FOLETTTO, V. S. et al. Repositioning of antidepressant drugs and synergistic effect with ciprofloxacin against multidrug-resistant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 1–9, 2021b.

FORD, C. A.; HURFORD, I. M.; CASSAT, J. E. Antivirulence Strategies for the Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections: A Mini Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. January, p. 1–10, 2021.

FOUNOU, R. C.; FOUNOU, L. L.; ESSACK, S. Y. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1–18, 2017.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 4, p. 369–378, 2017.

FUJITA, J. et al. Crystal structure of FtsA from *Staphylococcus aureus*. **FEBS Letters**, v. 588, n. 10, p. 1879–1885, maio 2014.

GAO, P.; DAVIES, J.; KAO, R. Y. T. Dehydrosqualene desaturase as a novel target for anti-virulence therapy against *Staphylococcus aureus*. **mBio**, v. 8, n. 5, p. 1–12, 2017.

GEBREYOHANNES, G. et al. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. **Heliyon**, v. 5, n. 8, p. e02192, 2019.

GERMAN, N.; KAATZ, G. W.; KERNS, R. J. Synthesis and evaluation of PSSRI-based inhibitors of *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pumps. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 4, p. 1368–1373, 2008.

GHAHREMANI, M.; JAZANI, N. H.; SHARIFI, Y. Emergence of vancomycin-intermediate and -resistant *Staphylococcus aureus* among methicillin-resistant *S. aureus* isolated from clinical specimens in the northwest of Iran. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 14, p. 4–9, 2018.

GIULIERI, S. G.; TONG, S. Y. C.; WILLIAMSON, D. A. Using genomics to understand methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Microbial**

**Genomics**, v. 6, n. 1, 2020.

GUILLET, V. et al. Crystal structure of leucotoxin S component: new insight into the Staphylococcal beta-barrel pore-forming toxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 41028–41037, set. 2004.

GUNASEKARA, N. S.; NOBLE, S.; BENFIELD, P. Paroxetine: An update of its pharmacology and therapeutic use in depression and a review of its use in other disorders. **Drugs**, v. 55, n. 1, p. 85–120, 1998.

GUO, Y. et al. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. March, p. 1–11, 2020.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, 2012.

HE, J. et al. Dihydrofolate reductase inhibitors for use as antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 195, p. 112268, 2020.

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, ago. 2009.

HEIDARY, M. et al. Daptomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 1, p. 1–11, 2018.

HERMAN-BAUSIER, P. et al. *Staphylococcus aureus* clumping factor A is a force-sensitive molecular switch that activates bacterial adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 21, p. 5564–5569, 2018.

HERNANDO-AMADO, S. et al. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1432–1442, 2019.

HIGGINS, J. et al. Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 258, n. 2, p. 290–296, 2006.

HIRAMATSUA, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 135–146, 1997.

HUA, Y. et al. Drug repositioning: Progress and challenges in drug discovery for various diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 234, p. 114239, 2022.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; FORLI, S. Using autodock 4 and autodock vina with autodocktools: a tutorial. 2012.

IMBERTY, A. et al. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631–642, 1991.

IWATA, Y. et al. D-Serine inhibits the attachment and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 537, p. 50–56, 2021.

JEVONS, M. P. “Celbenin” -resistant Staphylococci. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5219, p. 124–125, 1961.

JOHNSON, M. K. Impetigo. **Advanced Emergency Nursing Journal**, v. 42, n. 4, p. 262–269, 2020.

JORGE, P. et al. Searching for new strategies against biofilm infections: Colistin-AMP combinations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* single- and double-species biofilms. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–20, 2017.

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

JUBEH, B.; BREIJYEH, Z.; KARAMAN, R. Resistance of Gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 1–22, 2020.

KADELA-TOMANEK, M. et al. Lipophilicity, Pharmacokinetic Properties, and Molecular Docking Study on SARS-CoV-2 Target for Betulin Triazole Derivatives with Attached 1, 4-Quinone. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 781, 2021.

KADRI, S. et al. Dual inhibition of *S. aureus* TyrRS and *S. aureus* gyrase by two 4-amino-4'-acetyldiphenyl sulfide-based Schiff bases: Structural features, DFT study, Hirshfeld surface analysis and molecular docking. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 143, n. July, p. 109779, 2022.

KAUL, G. et al. Update on drug-repurposing: Is it useful for tackling antimicrobial resistance? **Future Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 829–831, 2019.

KAUR, B. et al. Focused review on dual inhibition of quorum sensing and efflux pumps: A potential way to combat multi drug resistant *Staphylococcus aureus* infections. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 190, n. April, p. 33–43, 2021.

- KIRIENKO, N. V.; RAHME, L.; CHO, Y. H. Editorial: Beyond Antimicrobials: Non-traditional Approaches to Combating Multidrug-Resistant Bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. October, p. 1–5, 2019.
- KOWALSKA, M. et al. Paroxetine—overview of the molecular mechanisms of action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1–21, 2021.
- KWON, N. H.; FOX, P. L.; KIM, S. Aminoacyl-tRNA synthetases as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 8, p. 629–650, 2019.
- LACEY, K. A. et al. Clumping factor B is an important virulence factor during *Staphylococcus aureus* skin infection and a promising vaccine target. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 4, p. 1–20, 2019.
- LADE, H.; KIM, J. S. Bacterial targets of antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, p. 398, 2021.
- LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–103, 2018.
- LASS-FLÖRL, C. et al. Antifungal properties of selective serotonin reuptake inhibitors against *Aspergillus* species *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 775–779, 2001.
- LAUX, C.; PESCHEL, A.; KRISMER, B. *Staphylococcus aureus* Colonization of the human nose and interaction with other microbiome members. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, p. 7.2.34, 2019.
- LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. May, p. 1–23, 2018.
- LIMA, L. M. et al.  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 208, p. 112829, 2020.
- LIU, C.-I. et al. A Cholesterol Biosynthesis Inhibitor Blocks *Staphylococcus aureus* Virulence. **Science**, v. 319, n. 5868, p. 1391–1394, mar. 2008.
- LIU, G. Y. et al. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 2, p. 209–215, 2005.
- LIU, L. et al. The recent advances in surface antibacterial strategies for biomedical catheters. **Biomaterials Science**, v. 8, n. 15, p. 4074–4087, 2020.
- LORENTE, L. et al. Chlorhexidine-silver sulfadiazine-impregnated venous catheters

- save costs. **American Journal of Infection Control**, v. 42, n. 3, p. 321–324, 2014.
- LORENTE, L. et al. Chlorhexidine-silver sulfadiazine- or rifampicin-miconazole-impregnated venous catheters decrease the risk of catheter-related bloodstream infection similarly. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 1, p. 50–53, 2016.
- MAHEY, N. et al. Repurposing Approved Drugs as Fluoroquinolone Potentiators to Overcome Efflux Pump Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, 2021.
- MAJTNEROVÁ, P.; ROUŠAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 5, p. 1469–1478, 2018.
- MARINHO, E. M. et al. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, n. June, p. 1–6, 2020.
- MCCARTHY, H. et al. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. January, p. 1–9, 2015.
- METI, G. Y. et al. Synthesis and Anti-Proliferative Activity of Biphenyl Derived 5-Substituted-Indolin-2-Ones. **Archives in Chemical Research**, v. 01, n. 01, 2017.
- MINATO, Y. et al. Mutual potentiation drives synergy between trimethoprim and sulfamethoxazole. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.
- MIRÓ-CANTURRI, A.; AYERBE-ALGABA, R.; SMANI, Y. Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 41, p. 1–12, 2019.
- MORRISETTE, T. et al. The evolving reduction of vancomycin and daptomycin susceptibility in MRSA—salvaging the gold standards with combination therapy. **Antibiotics**, v. 9, n. 11, p. 1–21, 2020.
- MUÑOZ-BELLIDO, J. L.; MUÑOZ-CRIADO, S.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. A. In-vitro activity of psychiatric drugs against *Corynebacterium urealyticum* (*Corynebacterium* group D2). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 1005–1009, 1996.
- MURRAY, C. J. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.
- MUTHU, D. et al. Repurposing of antidepressant drug sertraline for antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*: a potential approach for the treatment of osteomyelitis.



- New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 14, p. 5315–5324, 2019.
- NACLERIO, G. A.; SINTIM, H. O. Multiple ways to kill bacteria via inhibiting novel cell wall or membrane targets. **Future Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 13, p. 1253–1279, 2020.
- NAIR, S. V. et al. Antimicrobial activity of plumbagin, a naturally occurring naphthoquinone from *Plumbago rosea*, against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 4, p. 237–248, 2016.
- NANRA, J. S. et al. Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 9, n. 3, p. 480–487, 2013.
- NASSER, A. et al. *Staphylococcus aureus* versus neutrophil: Scrutiny of ancient combat. **Microbial Pathogenesis**, v. 131, n. April, p. 259–269, 2019.
- NAWROTEK, P.; KARAKULSKA, J.; FIJAŁKOWSKI, K. The Staphylococcal Panton-Valentine Leukocidin (PVL). 2018.
- NEIDLE, S. et al. Symmetric bis-benzimidazoles: new sequence-selective DNA-binding molecules. **Chemical Communications**, n. 10, p. 929–930, 1999.
- NGUYEN, T. et al. Targeting Mannitol Metabolism as an Alternative Antimicrobial Strategy Based on the Structure-Function Study of Mannitol-1-Phosphate Dehydrogenase in *Staphylococcus aureus*. **mBio**, v. 10, n. 4, ago. 2019.
- NIMAL, R. et al. Elucidating the interaction of antidepressant drug paroxetine with ct-dsDNA: A comparative study by electrochemical, spectroscopic, and molecular docking approaches. **Bioelectrochemistry**, v. 149, n. October 2022, p. 108285, 2023.
- NOBILE, C. J. et al. A selective serotonin reuptake inhibitor, a proton pump inhibitor, and two calcium channel blockers inhibit *Candida albicans* biofilms. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 5–11, 2020.
- NZAKIZWANAYO, J. et al. Fluoxetine and thioridazine inhibit efflux and attenuate crystalline biofilm formation by *Proteus mirabilis*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.
- O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**. 2016.
- O'RIORDAN, K.; LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 218–234, 2004.

- OCHSNER, U. A. et al. Aminoacyl-tRNA synthetases: Essential and still promising targets for new anti-infective agents. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 16, n. 5, p. 573–593, 2007.
- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.
- OGSTON, A. Report upon micro-organisms in surgical diseases. **British Medical Journal**, v. 1, p. 369–375, 1881.
- OGSTON, A. Micrococcus poisoning. **J Anat Physiol**, v. 16, p. 526–567, 1882.
- OLIVEIRA, D. M. DE S. et al. High rates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation in a Brazilian Intensive Care Unit. **Intensive and Critical Care Nursing**, v. 49, p. 51–57, 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**, v. 110, n. 42, p. 16808–16813, out. 2013.
- PALOMINO, J. C.; MARTIN, A. The potential role of trimethop - sulfamethoxazole in the treatment of drug-resistant tuberculosis. **Future Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 539–547, 2016.
- PARASTAN, R. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. **Gene Reports**, v. 20, n. March, 2020.
- PARLET, C. P.; BROWN, M. M.; HORSWILL, A. R. Commensal Staphylococci Influence *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Disease. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 497–507, 2019.
- PEACOCK, S. J.; PATERSON, G. K. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, p. 577–601, 2015.
- PENTEADO, F. D. et al. Frequency of Community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pediatric Population in a General Hospital in São Paulo, Brazil, over 5 Years. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 38, n. 5, p. E87–E89, 2019.
- PEREIRA, T. C. et al. In vitro synergistic effects of fluoxetine and paroxetine in combination with amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Pathogens and Disease**, 8 jan. 2021.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera — A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. 2004.
- PIECHOTA, M. et al. Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-

Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains from Hospitalized Patients in Poland. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

POLLY, M. et al. Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence of multidrug-resistant bacterial infections in an acute care hospital in Brazil. **American Journal of Infection Control**, v. 50, n. 1, p. 32–38, 2022.

PROCOP, G. W. et al. **Diagnóstico microbiológico|texto e atlas**. 2018.

QIU, X. et al. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* tyrosyl-tRNA synthetase in complex with a class of potent and specific inhibitors. **Protein Science**, v. 10, n. 10, p. 2008–2016, out. 2001.

QUEIROZ, H. A. AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DICLOFENACO SÓDICO FRENTE ÀS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (SARM). 2020.

QUEIROZ, H. 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.

RAGUNATHAN, A. et al. FtsA as a cidal target for *Staphylococcus aureus*: Molecular docking and dynamics studies. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 5, p. 7751–7758, 2019.

RAMANDINIANTO, S. C.; KHAIRULLAH, A. R.; EFFENDI, M. H. DETECTION ON METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA) AND METHICILLIN RESISTANT Coagulase Negative Staphylococci (MR-CNS) FROM SEVERAL DAIRY FARMS IN EAST JAVA , INDONESIA. **Interciencia journal**, v. 46, n. June, p. 65–77, 2021.

RAMMELKAMP, C. H.; MAXON, T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 51, n. 3, p. 386–389, 1942.

RAYNER, C.; MUNCKHOF, W. J. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. **Internal medicine journal**, v. 35, p. S3-16, 2005.

RICARDO, S. I. C. et al. A Glance at Antimicrobial Strategies to Prevent Catheter-Associated Medical Infections. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 12, p. 3109–3130, 2020.

ROMERO, L. C.; DA CUNHA, M. DE L. R. DE S. Insights into the epidemiology of

community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in special populations and at the community-healthcare interface. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. 6, p. 101636, 2021.

ROSENTHAL, V. D. et al. An eight-year multicenter study on short-term peripheral intravenous catheter-related bloodstream infection rates in 100 intensive care units of 9 countries in Latin America: Argentina, Brazil, Colombia, Costa Rica, Dominican Republic, Ecuador, Mexico, Pa. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 42, n. 9, p. 1098–1104, 2021.

RUDRA, P.; BOYD, J. M. Metabolic control of virulence factor production in *Staphylococcus aureus*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 55, p. 81–87, 2020.

SAHASRABUDHE, P. et al. Driving Drug Discovery with Biophysical Information. **Applied Biophysics for Drug Discovery**, p. 241–261, 2017.

SAINI, V. et al. Paradigm shift in antimicrobial resistance pattern of bacterial isolates during the covid-19 pandemic. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 1–11, 2021.

SAKR, A. et al. *Staphylococcus aureus* nasal colonization: An update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, p. 1–15, 2018.

SARKAR, P.; HALDAR, J. Glycopeptide Antibiotics: Mechanism of Action and Recent Developments. 2020.

SATO, A. et al. Peripheral venous catheter-related bloodstream infection is associated with severe complications and potential death: A retrospective observational study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–6, 2017.

SCHILCHER, K.; HORSWILLA, A. R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 3, p. e00026-19, 2020.

SCHINDLER, B. D.; JACINTO, P.; KAATZ, G. W. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. **Future microbiology**, v. 8, n. 4, p. 491–507, 2013.

SHALABY, M. A. W. et al. Penicillin binding protein 2a: An overview and a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 199, p. 112312, 2020.

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

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, A. R. O. et al. Increased Use of Antibiotics in the Intensive Care Unit During Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic in a Brazilian Hospital. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. December, p. 1–11, 2021.

SINGH, A. et al. Bacterial biofilm infections, their resistance to antibiotics therapy and current treatment strategies. **Biomedical Materials**, v. 17, n. 2, 2022.

SINGH, S. B. et al. Tricyclic 1,5-naphthyridinone oxabicyclooctane-linked novel bacterial topoisomerase inhibitors as broad-spectrum antibacterial agents-SAR of left-hand-side moiety (Part-2). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 9, p. 1831–1835, maio 2015.

SOARES, C. R. P. et al. Prevalence of nasal colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in outpatients living with HIV/AIDS in a Referential Hospital of the Northeast of Brazil. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2018.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 223–229, 2013.

SPÍŽEK, J.; ŘEZANKA, T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 20–28, 2017.

STRAUME, D. et al. Class A PBPs: It is time to rethink traditional paradigms. **Molecular Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 41–52, 2021.

SUBHADRA, B. et al. Control of biofilm formation in healthcare: Recent advances exploiting quorum-sensing interference strategies and multidrug efflux pump inhibitors. **Materials**, v. 11, n. 9, 2018.

SUN, J.; LV, P. C.; ZHU, H. L. Tyrosyl-tRNA synthetase inhibitors: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 5, p. 557–564, 2017.

SUN, W.; SANDERSON, P. E.; ZHENG, W. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 7, p. 1189–1195, 2016.

SURESH, M. K.; BISWAS, R.; BISWAS, L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 309, n. 1, p. 1–12, 2019.

SUREWAARD, B. G. J. et al.  $\alpha$ -Toxin Induces Platelet Aggregation and Liver Injury

during *Staphylococcus aureus* Sepsis. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 2, p. 271- 284.e3, 2018.

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.

TAM, K.; TORRES, V. J. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 2, p. 1–34, 2019.

TAVARES, A. et al. Insights into Alpha-Hemolysin (Hla) evolution and expression among *Staphylococcus aureus* clones with hospital and community origin. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e98634, 2014.

THITIANANPAKORN, K. et al. Association of mprF mutations with cross-resistance to daptomycin and vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020.

THORPE, K. E.; JOSKI, P.; JOHNSTON, K. J. Antibiotic-resistant infection treatment costs have doubled since 2002, now exceeding \$2 billion annually. **Health Affairs**, v. 37, n. 4, p. 662–669, 2018.

TRIPATHY, S.; SAHU, S. K. FtsZ inhibitors as a new genera of antibacterial agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 91, p. 103169, 2019.

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.

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

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P. Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*. 2018.

VIJAYAKUMAR, K. et al. Quebrachitol inhibits biofilm formation and virulence production against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, n. February, p. 104286, 2020.

WAGSTAFF, A. J. et al. Paroxetine: An update of its use in psychiatric disorders in adults. **Drugs**, v. 62, n. 4, p. 655–703, 2002.

WANG, X. et al. Characterisation of community-acquired *Staphylococcus aureus* causing skin and soft tissue infections in a children’s hospital in Shanghai, China. **Epidemiology and Infection**, v. 147, p. 1–6, 2019.

- WILLIAMS, S. C. et al. Distinguishing between living and nonliving bacteria: Evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 3, p. 225–236, 1998.
- XUE, H. et al. Review of drug repositioning approaches and resources. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 10, p. 1232–1244, 2018.
- XUE, L. et al. Staphyloxanthin: A potential target for antivirulence therapy. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 2151–2160, 2019.
- YAN, J. et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, 2014.
- YEHIA, F. A. ZAHRAA A.; YOUSEF, N.; ASKOURA, M. Celastrol mitigates staphyloxanthin biosynthesis and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* via targeting key regulators of virulence; in vitro and in vivo approach. **BMC Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 1–18, 2022.
- YOSHIDA, T. et al. Incidence of central venous catheter-related bloodstream infections: Evaluation of bundle prevention in two intensive care units in central Brazil. **Scientific World Journal**, v. 2019, 2019.
- YOUNG, T. J. et al. Antifungal activity of selective serotonin reuptake inhibitors attributed to non-specific cytotoxicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1045–1047, 2003.
- YUSUF, D. et al. An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance : RSR vs RMSD. p. 1411–1422, 2008.
- ZIGO, F. et al. Dairy Cows' Udder Pathogens and Occurrence of Virulence Factors in Staphylococci. **Animals**, v. 12, n. 4, p. 470, 2022.
- ZIMMERMANN, S. et al. Clinically Approved Drugs Inhibit the *Staphylococcus aureus* Multidrug NorA Efflux Pump and Reduce Biofilm Formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. December, p. 1–13, 2019.
- ZURITA, J.; MEJÍA, C.; GUZMÁN-BLANCO, M. Diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. SUPPL. 2, 2010.