



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

AMANDA DIAS BARBOSA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ANLÓDIPINO
EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*:
DETERMINAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO E SUA ASSOCIAÇÃO
COM A OXACILINA**

FORTALEZA

2022

AMANDA DIAS BARBOSA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ANLODIPINO
EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*:
DETERMINAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO E SUA ASSOCIAÇÃO
COM A OXACILINA**

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.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cecília Rocha da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior

FORTALEZA
2022

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)

- B195a Barbosa, Amanda Dias.
AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ANLÓDIPINO EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*: DETERMINAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO E SUA ASSOCIAÇÃO COM A OXACILINA / Amanda Dias Barbosa. – 2022. 90 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Cecília Rocha da Silva.
Coorientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.
1. *Staphylococcus aureus*. 2. *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina. 3. Reposicionamento de Medicamentos. 4. Anlodipino. 5. Biofilmes bacterianos. I. Título.

CDD 616.9

AMANDA DIAS BARBOSA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ANLODIPINO
EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*:
DETERMINAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO E SUA ASSOCIAÇÃO
COM A OXACILINA**

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.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cecília Rocha da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior

Aprovada em ____ / ____ /2023

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.a Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti
Centro Universitário Maurício de Nassau (UNINASSAU)

A Deus.

Aos meus pais, Marlúcia Dias Barbosa e
Francisco José Barbosa Martins.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, por me sustentar e me dar forças em todos os momentos. Por guiar meus caminhos e pela sua misericórdia.

Aos meus pais, Francisco José Barbosa e Marlúcia Dias, por sempre me apoiarem em todos os meus sonhos e objetivos, por todo cuidado, dedicação e amor. À minha família por todo suporte, descontração e apoio. Ao meu namorado, Bruno Melo, por todo companheirismo, ajuda, amor, compreensão e incentivo.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas, em especial ao Daniel Sampaio e à Vitória Pessoa, por todo companheirismo, discussões enriquecedoras e momentos partilhados. Ao Thiago Mesquita, pelo suporte nos tempos de iniciação científica e pela amizade que se manteve. Aos demais mestrandos, Amanda Cavalcante, Lara Moreira, Thais Lima, por todo auxílio e disponibilidade e a todos os membros do LABIMAN, pelas conversas e contribuições diretas ou indiretas na execução deste trabalho.

À Professora Livia Gurgel, por todo auxílio, disponibilidade e compreensão.

Ao Professor João Batista, pelos ensinamentos repassados.

Ao Professor Hélio Vitoriano, pelas oportunidades e confiança em meu potencial.

À minha orientadora, Professora Cecília Rocha, por ser uma inspiração, pela confiança, dedicação, paciência e conhecimentos repassados.

Aos professores Bruno Coêlho e Emmanuel Marinho, pelas contribuições experimentais no trabalho

À Central Analítica da UFC, pela viabilização para a execução experimental de parte da metodologia.

À CAPES, pela manutenção da bolsa de auxílio.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição para o enriquecimento deste trabalho com suas sugestões.

“Transportai um punhado de terra todos os dias
e fareis uma montanha.” Confúcio

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos é um dos maiores problemas atuais para a humanidade. Diante deste cenário, a Organização Mundial da Saúde listou os principais patógenos para os quais o desenvolvimento de novos fármacos é prioritário. Nesta lista, destaca-se o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, considerado pela OMS como um patógeno de alta prioridade. Entretanto, o desenvolvimento de novos fármacos é um processo oneroso e demorado, ao passo que o surgimento de cepas resistentes é um processo que acontece de forma rápida. Por tais motivos, a busca por novas estratégias de pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos é fundamental, sendo uma delas o reposicionamento de fármacos. Relatos de várias classes de fármacos não-antibióticos que demonstraram atividade antimicrobiana estão disponíveis na literatura, dentre elas a classe das dihidropiridinas, cujo um dos representantes é o anlodipino. O presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito antimicrobiano e antibiofilme do anlodipino, avaliar o tipo de interação encontrado com a oxacilina, bem como elucidar o provável mecanismo de ação envolvido na sua atividade frente *S. aureus*. Para isto, foram empregadas técnicas de microdiluição em caldo, padronizada pelo documento M07-A10 do CLSI, *checkerboard*, para determinação da concentração inibitória fracionada (CIF), microscopia eletrônica de varredura afim de averiguar a atividade antimicrobiana do anlodipino. O provável mecanismo de ação foi avaliado por técnicas de citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e *molecular docking*. Os resultados obtidos mostraram que o anlodipino possui atividade antimicrobiana, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) equivalentes a 64 µg/ mL e 128 µg/ mL, e apresenta interações do tipo sinérgica com a oxacilina em mais de 50% das cepas utilizadas. Além disso, o anlodipino exibiu atividade frente aos biofilmes estafilocócicos formados e em formação, com erradicação destes em mais de 90% em concentrações acima de 8 vezes a CIM. O provável mecanismo de ação antimicrobiano do anlodipino parece estar associado à ligação com a DNA girase e fragmentação do DNA, tendo como efeito final a morte do microrganismo. Pode-se concluir, portanto, que o anlodipino possui atividade antimicrobiana isolado e em combinação com a oxacilina, em células planctônicas e em biofilme.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina; Reposicionamento de Medicamentos; Anlodipino; Biofilmes bacterianos

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is one of the greatest current problems for humanity. Given this scenario, the World Health Organization has listed the main pathogens for which the development of new drugs is a priority. In this list, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* stands out, considered by the WHO as a high priority pathogen. However, the development of new drugs is a costly and time-consuming process, while the emergence of resistant strains is a fast process. For these reasons, the search for new strategies for research and development of new antimicrobials is fundamental, one of them being drug repositioning. Reports of several classes of non-antibiotic drugs that have demonstrated antimicrobial activity are available in the literature, among them the class of dihydropyridines, one of whose representatives is amlodipine. The present study aims to evaluate the antimicrobial and antibiofilm effects of amlodipine, to assess the type of interaction found with oxacillin, as well as to elucidate the probable mechanism of action involved in its activity against *S. aureus*. To this end, we used broth microdilution techniques, standardized by the CLSI document M07-A10, checkerboard, to determine the fractional inhibitory concentration (FIC), and scanning electron microscopy to determine the antimicrobial activity of amlodipine. The probable mechanism of action was evaluated by flow cytometry, fluorescence microscopy, and molecular docking techniques. The results obtained showed that amlodipine possesses antimicrobial activity, with minimum inhibitory concentrations (MICs) equivalent to 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and exhibits synergistic-type interactions with oxacillin in more than 50% of the strains used. Furthermore, amlodipine exhibited activity against formed and forming staphylococcal biofilms, with the eradication of these in more than 90% at concentrations above 8 times the MIC. The probable antimicrobial mechanism of action of amlodipine seems to be associated to the binding with DNA gyrase and DNA fragmentation, having as the final effect the death of the microorganism. It can be concluded, therefore, that amlodipine has antimicrobial activity alone and in combination with oxacillin, in planktonic cells and in biofilms.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*; Repositioning of drugs; Amlodipine; Bacterial biofilms

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Linha do tempo da introdução de antimicrobianos e do ano de detecção de resistência a estes.....	18
Figura 2	– Proporção de prescrições nos Estados Unidos para antibióticos injetáveis.....	20
Figura 3	– Mecanismos de resistência dos antimicrobianos em <i>Staphylococcus aureus</i>	21
Figura 4	– Formação de biofilmes bacterianos.....	23
Figura 5	– Prevalência global de SARM.....	24
Figura 6	– Agentes etiológicos de IPCSL associada a CVC em pacientes adultos em UTIs e distribuição destes em cada região geográfica no Brasil.....	26
Figura 7	– Tipos de combinações sinérgicas de fármacos com atividade antimicrobiana.....	34
Figura 8	– Estrutura 2D e estrutura 3D do Anlodipino.....	35
Figura 9	– Fluxograma das metodologias executadas no estudo.....	38
Figura 10	– Imagens obtidas pela MEV de células representativas de <i>S. aureus</i> mostrando o efeito do ANL isolado e em combinação com oxacilina.....	51
Figura 11	– Atividade antimicrobiana do ANL contra biofilmes em crescimento de cepas clínicas de SARM e SASM, analisadas pelo ensaio MTT.....	52
Figura 12	– Atividade antimicrobiana do ANL contra biofilmes maduros de cepas clínicas de SARM e SASM analisadas pelo ensaio MTT.....	53
Figura 13	– Avaliação do dano à membrana celular da cepa SARM 2 causado pelo ANL, OXA e VAN.....	54
Figura 14	– Fragmentação de DNA induzida pelo ANL isolado e em combinação com OXA em uma cepa de SARM 2.....	55

Figura 15 – Interações dos complexos formados entre o ANL e os alvos *S. aureus*
gyrase complex with DNA (a) e *S. aureus gyrase*
(b)..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Porcentagens de SASM e SARM nas regiões brasileiras.....	25
Tabela 2	–	Parâmetros utilizados nas simulações de <i>molecular docking</i>	47
Tabela 3	–	Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), sinergismo com oxacilina e determinação do nível de tolerância (CBM/ CIM) do anlodipino contra cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	50
Tabela 4	–	Valores de energia de afinidade, RMSD, Ki e pKi dos complexos formados.....	57
Tabela 5	–	Interações entre anlodipino e os receptores SARM.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔG	Energia livre de Gibbs
1,4 DHP	1,4 Dihidropiridina
Ala	Alanina
ANL	Anlodipino
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Asp	Aspartato (Ácido aspartico)
Asn	Asparagina
Arg	Arginina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAMHB	Mueller Hinton de cátion ajustado
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
ClfA	Fator de aglutinação A
COVID-19	<i>Coronavirus disease</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
EF-G	<i>Elongation factor-G</i>
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, e Enterobacter sp</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FICI	Concentração Inibitória Fracionada
FnbpA	Proteína de ligação à fibronectina A
Gly	Glicina
Glu	Glutamato (Ácido glutâmico)
Gln	Glutamina
His	Histidina
IP	Iodeto de Propídeo
Ile	Isoleucina

LABIMAN	Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas
Lis/ Lys	Lisina
Leu	Leucina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Met	Metionina
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)]-2,5-difenil tetrazolium
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilina
PBP2A	Proteína de Ligação com a Penicilina 2 ^a
PBP	Proteína de Ligação com a Penicilina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
PVL	Panton-Valentine Leucocidina
RNA	Ácido ribonucleico
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
SCCmec	<i>staphylococcal cassette chromosome</i>
Ser	Serina
Tyr	Tirosina
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
Trp	Triptofano
UFC	Unidade Formadora de Colônias
Val	Valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Resistência aos antimicrobianos.....	15
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.3	Biofilmes.....	21
2.4	Epidemiologia.....	24
2.5	Tratamento farmacológico para infecções causadas por <i>S. aureus</i>	26
2.5.1	<i>Agentes tópicos</i>	26
2.5.2	<i>Agentes sistêmicos</i>	27
2.5.2.1	<i>Agentes antimicrobianos para o tratamento de SASM</i>	27
2.5.2.2	<i>Agentes antimicrobianos para o tratamento de SARM</i>	28
2.5.2.2.1	Glicopeptídicos.....	28
2.5.2.2.2	Oxazolidinonas.....	29
2.5.2.2.3	Lipopeptídicos.....	29
2.5.2.2.4	Cefalosporinas.....	29
2.6	Morte celular bacteriana.....	30
2.7	Estratégias contra a resistência aos antimicrobianos.....	31
2.7.1	<i>Reposicionamento de fármacos</i>	31
2.7.2	<i>Fármacos com atividade sinérgica</i>	33
2.8	Anlodipino.....	35
3	HIPÓTESES.....	36
4	OBJETIVOS.....	37
4.1	Objetivo Geral.....	37
4.2	Objetivos Específicos.....	37
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
5.1	Microrganismos.....	39
5.2	Drogas.....	39
5.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	39
5.4	Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....	40
5.5	Teste de tolerância.....	40
5.6	Verificação da interação farmacológica entre ANL e OXA.....	40

5.7	Microscopia eletrônica de varredura.....	41
5.8	Atividade em biofilmes em formação.....	42
5.9	Atividade em biofilmes formados.....	42
5.10	Avaliação do provável mecanismo de ação	43
5.10.1	<i>Preparo do inóculo</i>	43
5.10.2	<i>Avaliação da integridade de membrana</i>	43
5.10.3	<i>Avaliação de danos ao DNA</i>	44
5.10.4	<i>Análise de dados</i>	44
5.10.5	<i>Molecular docking</i>	44
5.10.5.1	<i>Otimização do ligante</i>	44
5.10.5.2	<i>Obtenção dos alvos</i>	44
5.10.5.3	<i>Preparação dos alvos e procedimentos gerais de docking</i>	46
6	RESULTADOS	49
6.1	Atividade antibacteriana do anlodipino	49
6.1.1	<i>Determinação da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima do anlodipino frente a cepas de S. aureus</i>	49
6.1.2	<i>Determinação do nível de tolerância</i>	49
6.1.3	<i>Avaliação da Interação Farmacológica entre o anlodipino e a oxacilina</i>	49
6.1.4	<i>Avaliação dos danos estruturais causados pelo anlodipino por microscopia eletrônica de varredura</i>	51
6.2	Atividade do anlodipino frente aos biofilmes em formação e formados	52
6.2.1	<i>Atividade frente biofilmes em formação</i>	52
6.2.2	<i>Atividade frente biofilmes formados</i>	53
6.3	Avaliação do possível mecanismo de ação do anlodipino frente S. aureus	54
6.3.1	<i>A integridade de membrana bacteriana é afetada pelo ANL</i>	54
6.3.2	<i>Avaliação de danos ao DNA</i>	54
6.3.3	<i>Molecular docking</i>	55
7	DISCUSSÃO	65
8	CONCLUSÃO	69
9	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) é considerado pela OMS como um patógeno de alta prioridade para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (OMS, 2017) e representa, em média, 40,3% dos isolados clínicos de *S. aureus* mundialmente (DIEKEMA et al., 2019). As taxas de mortalidade atribuídas a este microrganismo variam entre 39,9% e 42,2%, o que ressalta sua relevância clínica (HORVÁTH et al., 2020).

Apesar do SARM ser o principal alvo de pesquisas, o *S. aureus* sensível à meticilina (SASM) também é epidemiologicamente relevante, podendo apresentar até 74,6% de prevalência em hospitais (MAMA et al., 2021). Além disso, as cepas de SASM podem ser tão virulentas quanto o SARM (ROZGONYI et al., 2007), causando infecções graves, e possuem um importante potencial de desenvolvimento de resistência a variados antibióticos (LAKHUNDI; ZHANG, 2018). Outra característica importante do *S. aureus*, sensíveis ou resistentes à oxacilina, é sua capacidade de formar biofilmes, estruturas que conferem ao microrganismo proteção contra antimicrobianos e o sistema imune, bem como favorecem o desenvolvimento de infecções crônicas (LISTER; HORSWILL, 2014).

Tendo em vista a rápida disseminação, a dificuldade no tratamento, a alta mortalidade, além da necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes (ESCOLÀ-VERGÉ; LOS-ARCOS; ALMIRANTE, 2020; OMS, 2017), uma estratégia de interesse para o desenvolvimento de novos antimicrobianos é o reposicionamento de fármacos. Este método utiliza fármacos já conhecidos, reduzindo o tempo e custos de desenvolvimento (FARHA; BROWN, 2019). Além disso, a combinação de drogas que possuam efeito sinérgico também é desejável, já que este tipo de interação é capaz de reduzir a toxicidade dos fármacos quando comparados à utilização de forma isolada (CHOU, 2006).

O anlodipino é um fármaco da classe das dihidropiridinas e tem atividade farmacológica como antagonista de canais de cálcio, sendo utilizado para o tratamento de doenças cardiovasculares como angina *pectoris* e hipertensão (BULSARA; CASSAGNOL, 2020). Na literatura, é possível encontrar a descrição da atividade antimicrobiana de inibidores de canais de cálcio frente a fungos como *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., e bactérias, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., entre outras (HOMA et al., 2017; KRUSZEWSKA; ZAREBA; TYSKI, 2006; LIU et al., 2016; MAZUMDAR; ASOK KUMAR; DUTTA, 2010), entretanto o mecanismo desta atividade não é bem relatado.

Diante deste contexto, este estudo teve por objetivo avaliar a atividade *in vitro* do anlodipino frente células planctônicas e biofilmes de *S. aureus* resistentes e sensíveis à metilicina, bem como avaliar seu possível mecanismo de ação antimicrobiana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resistência aos antimicrobianos

As mutações no material genético dos microrganismos são um processo natural e espontâneo, no qual os antimicrobianos contribuem na seleção de cepas resistentes, favorecendo o seu crescimento ao reduzir a população de células sensíveis (FIOL; MATTOS FILHO; GROppo, 2000). Apesar de fazer parte de um processo natural, a resistência bacteriana é uma preocupação a nível global, tendo em vista as altas taxas de mortalidade e os altos custos com tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes (GUPTA; DATTA, 2019). O mau uso dos antimicrobianos, bem como sua aplicação em outros segmentos fora da área da saúde, como na agricultura, são fatores majoritários que favorecem o surgimento de bactérias resistentes (HUGHES, 2014; MACHOWSKA; LUNDBORG, 2019)

A resistência aos antimicrobianos pode ser classificada em três tipos: intrínseca, adaptativa e adquirida (LEE, 2019), sendo a intrínseca uma característica fenotípica, própria do microrganismo, a adaptativa corresponde a um processo evolutivo em resposta ao ambiente e é transitória, e a resistência adquirida, que ocorre quando um microrganismo recebe genes de resistência de um microrganismo doador (ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017; COX; WRIGHT, 2013; MUNITA; ARIAS, 2016).

Os tipos de resistência citados envolvem mecanismos moleculares e bioquímicos que reduzem a eficácia dos antibióticos no tratamento de infecções causadas por fungos e bactérias. Os mecanismos de resistência comuns envolvem bombas de efluxo, enzimas responsáveis que inativam ou modificam a molécula dos antimicrobianos, modificação no sítio de ligação do fármaco e alteração na permeabilidade de membrana (ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017).

As bombas de efluxo são proteínas de membrana cuja função é retirar compostos nocivos, como toxinas e metabólitos do interior da célula para o meio externo (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018). A inativação ou modificação de moléculas antimicrobianas são processos mediados por enzimas, como as β -lactamases que inativam os fármacos β -lactâmicos (GUITOR; WRIGHT, 2018) e como enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que modificam covalentemente grupos químicos da molécula de aminoglicosídeos (MUNITA; ARIAS, 2016). A alteração dos sítios de ligação reduz a capacidade de interação entre fármaco e receptor, reduzindo a efetividade do medicamento, e a alteração de permeabilidade de membrana está relacionada com as porinas, que podem ser expressas em menor quantidade, além da redução do tamanho e da função (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020a).

A resistência é um fenômeno que, apesar de complexo, ocorre de forma consideravelmente rápida. A meticilina, um fármaco β -lactâmico, foi introduzido ao mercado em 1960 e o primeiro relato de resistência ocorreu dois depois, em 1962 em uma cepa de *Staphylococcus aureus* (SENGUPTA; CHATTOPADHYAY; GROSSART, 2013). Já o primeiro relato de resistência à vancomicina ocorreu cerca de 20 anos após sua introdução no mercado (COURVALIN, 2006). São diversos os exemplos que mostram a rapidez do desenvolvimento de resistência após a introdução de um antimicrobiano ao mercado, como pode ser observado na Figura 1.

A intensa utilização de antimicrobianos de forma inadequada durante a pandemia da COVID-19 é um fator preocupante quando se pensa no impacto que esta ação pode ter a médio e longo prazo. Durante a pandemia, foi possível observar casos em que 56,6% a 70% dos pacientes internados com COVID-19 receberam tratamento empírico com antibióticos, sendo que apenas 3,5% destes pacientes realmente apresentavam alguma infecção (LANGFORD et al., 2020; VAUGHN et al., 2021).

Os dados disponíveis mostram um aumento alarmante de infecções resistentes no período de 2019 a 2020. Os principais agentes etiológicos bacterianos envolvidos neste aumento de infecções por microrganismos resistentes estão o *Acinetobacter* spp. resistente a carbapenêmicos (aumento de 78%), *Enterobacterales* resistentes a carbapenêmicos (aumento de 35%), *Enterobacterales* produtoras de ESBL (aumento de 32%), *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (aumento de 14%), *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (aumento de 32%) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (aumento de 13%) (CDC, 2022).

A velocidade de desenvolvimento da resistência, somado ao cenário atual de uso exacerbado de antimicrobianos, evidencia a importância do desenvolvimento mais rápido de alternativas farmacológicas para o tratamento de infecções bacterianas. O desenvolvimento de novos tratamentos para microrganismos resistentes são uma prioridade da Organização Mundial da Saúde (OMS), tendo em vista a dificuldade no tratamento das infecções, rápida disseminação, além de aumentar as taxas de morbidade e mortalidade (ESCOLÀ-VERGÉ; LOS-ARCOS; ALMIRANTE, 2020).

Entre os microrganismos de maior preocupação para o desenvolvimento de novos antimicrobianos, os do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) apresentam um papel de destaque (DE OLIVEIRA et al., 2020), e é neste grupo ao qual o *S. aureus* está incluído.



Figura 1. Linha do tempo da introdução de antimicrobianos e do ano de detecção de resistência. Adaptado do documento Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013, CDC

2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria de morfologia esférica, Gram-positiva, que faz parte da microbiota humana, colonizando assintoticamente a cavidade nasal de um terço da população mundial, além de fazer parte da microbiota da pele (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018). Apesar de ser um microrganismo comensal, pode ser considerado um patógeno oportunista (MEHRAJ et al., 2016) e um dos agentes infecciosos mais comuns no mundo (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021).

Isolado pela primeira vez em 1880 por Alexander Ogston, cirurgião britânico, a partir de abscessos (CHALMERS; WYLAM, 2020), este microrganismo encontra-se entre os quatro principais patógenos envolvidos em infecções de pele até os dias atuais (ROY et al., 2020). Além das infecções de pele, *Staphylococcus aureus* está relacionado a diversas patologias, sendo o principal agente causador de pneumonia e outras infecções do trato respiratório, sítio cirúrgico, prótese articular e infecções cardiovasculares, bem como bacteremia nosocomial (TONG et al., 2015).

As infecções causadas por *S. aureus* podem apresentar variados níveis de gravidade (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021). Um dos motivos que justificam esta característica é a capacidade desta bactéria de produzir toxinas com efeitos diversos (AHMAD-MANSOUR et al., 2021). Um exemplo é a pneumonia causada por *S. aureus*, que é agravada pela toxina leucocidina Panton-Valentine (PVL), um dos fatores de virulência mais importantes do *S. aureus*, associada a doença crítica e morte (HE; WUNDERINK, 2020).

Outro exemplo relevante no que se refere às toxinas são as bacteremias causadas por *S. aureus*, que dependem da ruptura da camada epitelial para que ocorra a invasão. Este microrganismo pode promover ativamente a ruptura do epitélio pela produção da α -toxina, capaz de clivar moléculas de e-caderina, quebrando as junções de oclusão e comprometendo o citoesqueleto das células epiteliais do hospedeiro (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021).

As toxinas estafilocócicas podem ser produzidas por *S. aureus* independente do seu perfil de sensibilidade, que pode ser dividido em *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (SASM) e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (SARM) (GUO et al., 2020). Por esse motivo, cepas de SASM também podem ser tão virulentas quanto o SARM (ROZGONYI et al., 2007), causando infecções graves, além de possuir um importante potencial de desenvolvimento de resistência a variados antibióticos (LAKHUNDI; ZHANG, 2018). Ademais, cepas sensíveis à meticilina apresentam alta prevalência em infecções nosocomiais, podendo estar atribuído a até 74,6% dos casos (MAMA et al., 2021).

Apesar da relevância clínica e epidemiológica do SARM, um dos protagonistas no cenário de pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos é o SARM (OMS, 2017). Nas últimas décadas, devido à capacidade de rápida mutação das bactérias e ao uso inapropriado de antimicrobianos, a resistência do *S. aureus* a este tipo de medicamento aumentou, juntamente com as taxas de infecções causadas por SARM. Como consequência, o tratamento clínico tornou-se mais difícil (GUO et al., 2020).

A resistência à meticilina do SARM ocorre pela alteração da proteína de ligação à penicilina (PBP) em PBP 2a, codificada pelo gene *mecA*, presente em um elemento genético móvel chamado *staphylococcal cassette chromosome* (SCCmec) (SHORE et al., 2011). A resistência à meticilina indica a resistência a todos os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, com exceção de cefalosporinas de quinta geração. A perda da eficácia a essa classe é relevante, uma vez que os β -lactâmicos possuem um excelente perfil de segurança (SRISUKNIMIT et al., 2017) e são fármacos amplamente utilizados, como ilustrado na Figura 2.

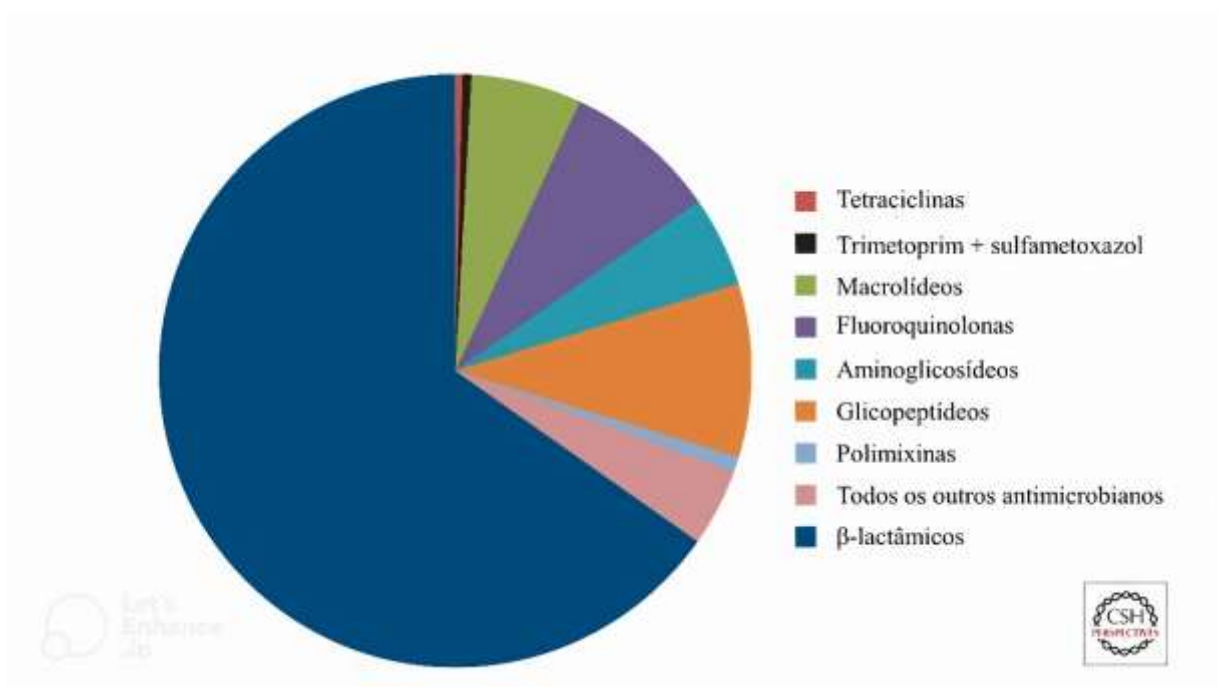


Figura 2. Proporção de prescrições nos Estados Unidos para antibióticos injetáveis (β -lactâmicos, 65,24%; glicopeptídeos, 9%; fluoroquinolonas, 8%; macrolídeos, 6%; aminoglicosídeos, 5%; polimixinas, 1%; trimetoprima/sulfametoxazol, 0,5%; tetraciclina, 0,4%; todos os outros antibióticos, 4,21%). Adaptado de Bush & Bradford, 2016.

Atualmente, a terapia de primeira escolha para SARM geralmente são β -lactâmicos, enquanto para o SARM as indicações incluem linezolida, vancomicina ou teicoplanina em

combinação com clindamicina ou rifampicina, em alguns casos (HE; WUNDERINK, 2020). Outros fármacos indicados são a daptomicina, tedizolida, ceftarolina e quinopristina/dalfopristina. Embora a maioria dos isolados de SARM sejam sensíveis ao tratamento, existe o risco de surgimento de cepas resistentes a esses antimicrobianos, com diversos mecanismos associados (Figura 3) (LADE; KIM, 2021).

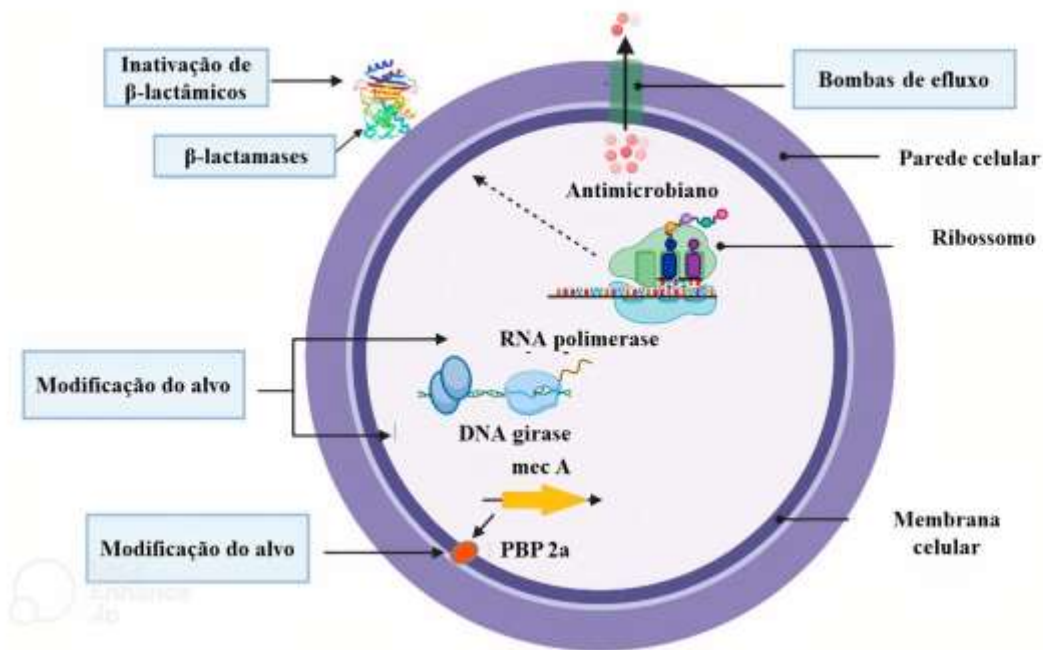


Figura 3. Mecanismos de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*. Fonte: Adaptado de Lade e Kim, 2021

Além da resistência aos antimicrobianos e da produção de toxinas, outro importante fator de virulência associado às infecções por *S. aureus* é sua capacidade de formar biofilmes, que aumentam capacidade de sobrevivência e persistência do microrganismo (LISTER; HORSWILL, 2014), sendo a formação de biofilmes uma característica que não depende do perfil de sensibilidade (GHASEMIAN et al., 2015).

2.3 Biofilmes

Staphylococcus aureus são capazes de causar quadros clínicos com diferentes graus de complexidade, por conta do abundante número de fatores de virulência. Enquanto quadros leves e autolimitados geralmente estão associados a células planctônicas, os quadros mais graves e crônicos geralmente estão associados a formação de biofilmes (BRADY et al., 2018),

comunidades de microrganismos que crescem aderidos a uma superfície e envolvidos em uma matriz extracelular (SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014).

Os biofilmes estafilocócicos podem ser encontrados em dispositivos médicos como cateter venoso, válvulas cardíacas protéticas e marca-passo cardíaco (SURESH; BISWAS; BISWAS, 2019). Endocardites e infecções associadas à implantes comumente envolvem biofilmes de *S. aureus* e possuem alta morbidade e mortalidade (HOBLEY et al., 2015).

Os biofilmes podem ser definidos como um agregado microbiano complexo, que fornecem ao microrganismo a capacidade de se adaptar ao meio ambiente (WANG; BIAN; WANG, 2022). A formação de biofilmes pode ser estimulada por condições ambientais hostis, disponibilidade de nutrientes, e pelo *quorum sensing*, que além de desencadear a formação dos biofilmes, tem papel de regularização (RATHER; GUPTA; MANDAL, 2021).

Quorum sensing é um fenômeno no qual os microrganismos são capazes de regular o comportamento das populações bacterianas por meio de secreção de moléculas de sinalizadoras chamadas de substâncias de autoindução, que regulam genes que codificam fatores de virulência, como genes envolvidos na formação de biofilme e também podem coordenar interações entre microrganismos intra e interespecies (PÉREZ-PÉREZ et al., 2017)

A formação dos biofilmes acontece em uma série de etapas (Figura 4), que incluem fixação reversível, formação de uma monocamada e estruturação e crescimento do biofilme (NASSER et al., 2022).

Inicialmente, os microrganismos encontram-se aderidos reversivelmente à superfície, entretanto, com o aumento da concentração da molécula de sinalização monofosfato de guanosina bis-(3'-5')-cíclico dimérico (c-di-GMP), há o aumento da produção de matriz extracelular e a promoção da adesão irreversível das células à superfície (RATHER; GUPTA; MANDAL, 2021).

A adesão em superfícies abióticas envolve interações dos tipos hidrofóbicas ou eletrostáticas. Em cepas de *Staphylococcus* spp., a adesão a superfícies abióticas está relacionada com moléculas de superfície, como os ácidos tecóicos (GROSS et al., 2001).

No que se refere à adesão em superfícies bióticas, as interações são mais específicas e envolvem uma grande variedade de proteínas estafilocócicas ancoradas na superfície celular que se ligam a proteínas do hospedeiro, chamadas *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule* (MSCRAMMs) (OTTO, 2013). Em *S. aureus*, alguns exemplos de MSCRAMMs são a proteína A, fator de aglutinação A (ClfA) e a proteína de ligação à fibronectina A (FnbpA) (GHASEMIAN et al., 2015). Após a adesão, os microrganismos começam a se dividir, formando microcolônias (RABIN et al., 2015).

Na maturação, a matriz extracelular desempenha um papel fundamental, uma vez que esta atua na fixação às superfícies e estabiliza a estrutura do biofilme (TOYOFUKU et al., 2016). Em *Staphylococcus* spp., a principal molécula de adesão da matriz é um exopolissacarídeo denominado adesina intercelular polissacarídica (PIA) ou poli-N-acetil glucosamina (PNAG), sintetizada a partir dos genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC* (OTTO, 2013).

Por fim, ocorre a etapa de dispersão. Esta etapa é essencial para permitir que as bactérias colonizem novos sítios quando há escassez de nutrientes e acúmulo de metabólitos tóxicos. As estratégias que viabilizam a dispersão do biofilme são o fim da síntese de componentes matriz extracelular, degradação da matriz e quebra das ligações não covalentes entre os componentes da matriz (OTTO, 2013; SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014).



Figura 4. Formação de biofilmes bacterianos. Fonte: Adaptado de Rather, Gupta e Mandal, 2021

Por conta da natureza estrutural do biofilme, na qual 80 a 90% da composição deste tipo de organização corresponde à matriz extracelular, e 10 a 20% correspondem aos microrganismos (PERCIVAL et al., 2015), as células bacterianas encontram-se em um estado de proteção contra a resposta imune do hospedeiro e agentes antimicrobianos, tornando-o um importante desafio na busca de alternativas terapêuticas (SCHILCHER; HORSWILL, 2020; WEIGELT et al., 2021).

Com a proteção fornecida pela matriz extracelular, a concentração inibitória dos fármacos antimicrobianos pode aumentar até mil vezes em relação à concentração inibitória em células planctônicas (OYAMA et al., 2016). Atualmente, muitos dos agentes antibiofilme são compostos por surfactantes, compostos à base de halogênio, compostos de quaternário de amônio, alguns compostos naturais e biguanidas, classe farmacológica de alguns agentes hipoglicemiantes (HALE et al., 2022; WEIGELT et al., 2021).

2.4 Epidemiologia

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno presente em todos os países e continentes do mundo (MONACO et al., 2017). Na década de 60, houve o surgimento e disseminação global de SARM, que logo se tornou um dos principais causadores de infecções nosocomiais e de origem comunitária (LEE et al., 2018). *S. aureus* resistentes à meticilina representa em média 40,3% dos isolados clínicos de *S. aureus* mundialmente (DIEKEMA et al., 2019). As taxas de mortalidade atribuídas a este microrganismo podem variar entre 29% e 42,2% dos casos, o que ressalta sua relevância clínica (HORVÁTH et al., 2020; KOURTIS et al., 2019). A prevalência de SARM pode variar nas diferentes regiões do mundo (Figura 5). Nas regiões da América do Norte e Europa, isolados com resistência à meticilina correspondem à 47% e 26,8%, respectivamente, enquanto na América Latina este número corresponde à 38,7%. (DIEKEMA et al., 2019).

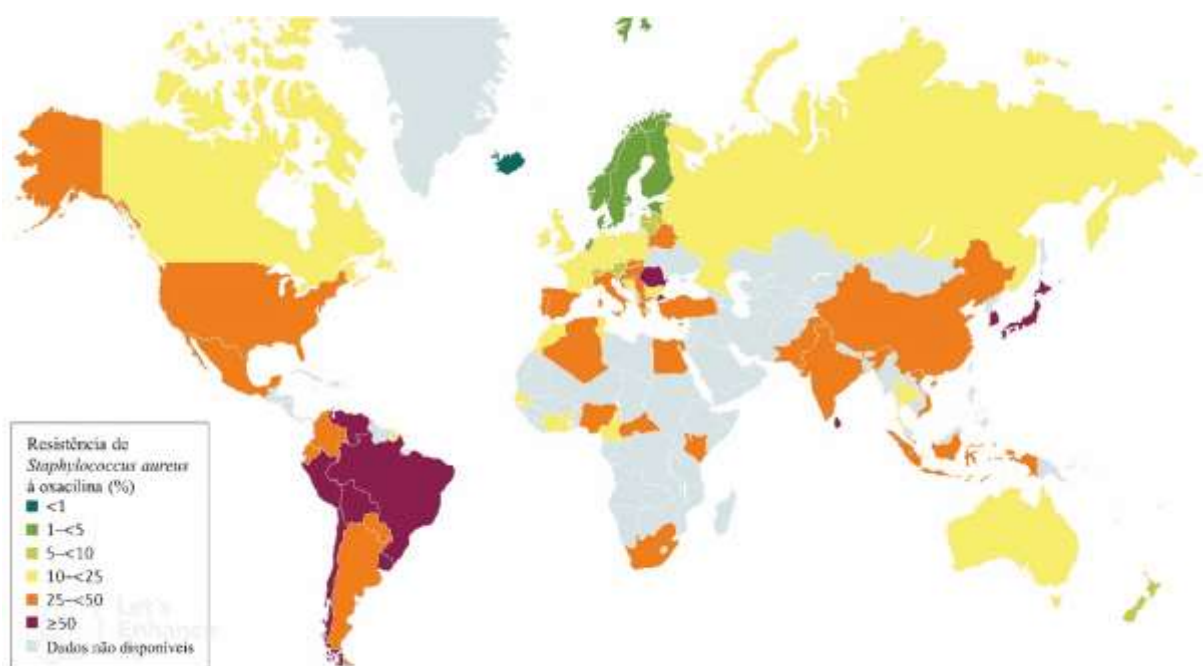


Figura 5. Prevalência global de SARM. Fonte: Adaptado de Lee *et al*, 2018

No Brasil, primeiro caso identificado de infecção causada por SARM ocorreu em 1987. Ao final desta década, a incidência de casos chegou à 33%, mantendo-se nessa faixa até os dias atuais (ANDRADE et al., 2020). As infecções nosocomiais por SARM podem ocorrer em todos os setores hospitalares, como unidades de terapia intensiva (UTI), clínica médica, centro cirúrgico, enfermaria, sendo principalmente isolado a partir de culturas de ponta de cateter,

correspondendo até à 52,2%, e amostras de sangue, equivalendo à 47,7% dos isolados (PENA et al., 2014). Documentos do Ministério da Saúde mostram que a resistência à oxacilina está presente em 57,4% das amostras de *S. aureus* obtidas em UTIs para pacientes adultos, 54,9% em UTIs pediátricas e 10% em UTI neonatal do país (Anvisa, 2016).

Em relação a *Staphylococcus aureus* sensíveis a meticilina (SASM), atualmente, sua prevalência em infecções hospitalares na Espanha pode chegar até 74,6% dos casos (MAMA et al., 2021). Nos Estados Unidos, SASM é o principal agente de infecções invasivas por *S. aureus*, correspondendo a 79% dos casos e causando infecções osteoarticulares, infecções da corrente sanguínea e pneumonia (CRANDALL et al., 2020). No Brasil, a prevalência de SASM em pacientes em unidades de saúde pode chegar até 85% dos isolados de *S. aureus* (PEREIRA-FRANCHI et al., 2019).

A alta prevalência de SASM deve acender um alerta, uma vez que estas cepas podem servir como um reservatório para o surgimento de novas cepas resistentes à meticilina (MONACO et al., 2017). Além disso, a mortalidade associada ao SASM em casos de infecções hospitalares pode equivaler a até 24%, comparável com a mortalidade associada ao SARM (KOURTIS et al., 2019).

A prevalência de SASM e SARM no Brasil podem variar conforme a região, influenciado por fatores como a notificação de casos fornecida por cada estado. Na Tabela 1, encontram-se dados sobre as porcentagens encontradas referentes ao perfil de resistência de *S. aureus* isolados de pacientes com infecções primárias de corrente sanguínea laboratorialmente confirmadas (IPCSL) associadas a cateter venoso central (CVC) em pacientes adultos em UTI. É possível notar, neste caso, que a porcentagem de SASM e SARM são equiparadas. Entretanto, deve-se estar atento às limitações encontradas no que se refere à obtenção destes dados epidemiológicos.

Tabela 1. Porcentagens de SASM e SARM nas regiões brasileiras. Fonte: Anvisa, 2016.

Microrganismo	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sul	Sudeste	N Total (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>						2.959
Sensível à oxacilina	62 (43,1)	167 (39)	114 (50,9)	224 (55,3)	693 (39,4)	1.260 (42,6)
Resistente à oxacilina	82 (56,9)	261 (61)	110 (49,1)	181 (44,7)	1065 (60,6)	1.699 (57,4)

Ao observar a prevalência de *S. aureus* em relação à outras espécies causadoras de infecções em pacientes adultos internados em UTI com IPCSL associadas a cateter venoso central, é notório que esta bactéria possui um protagonismo relevante. Na Figura 6, é possível observar as porcentagens dos principais microrganismos causadores de IPCSL a nível nacional e regional. Percebe-se, por tanto, que o *S. aureus* é um microrganismo importante epidemiologicamente em todo o Brasil.

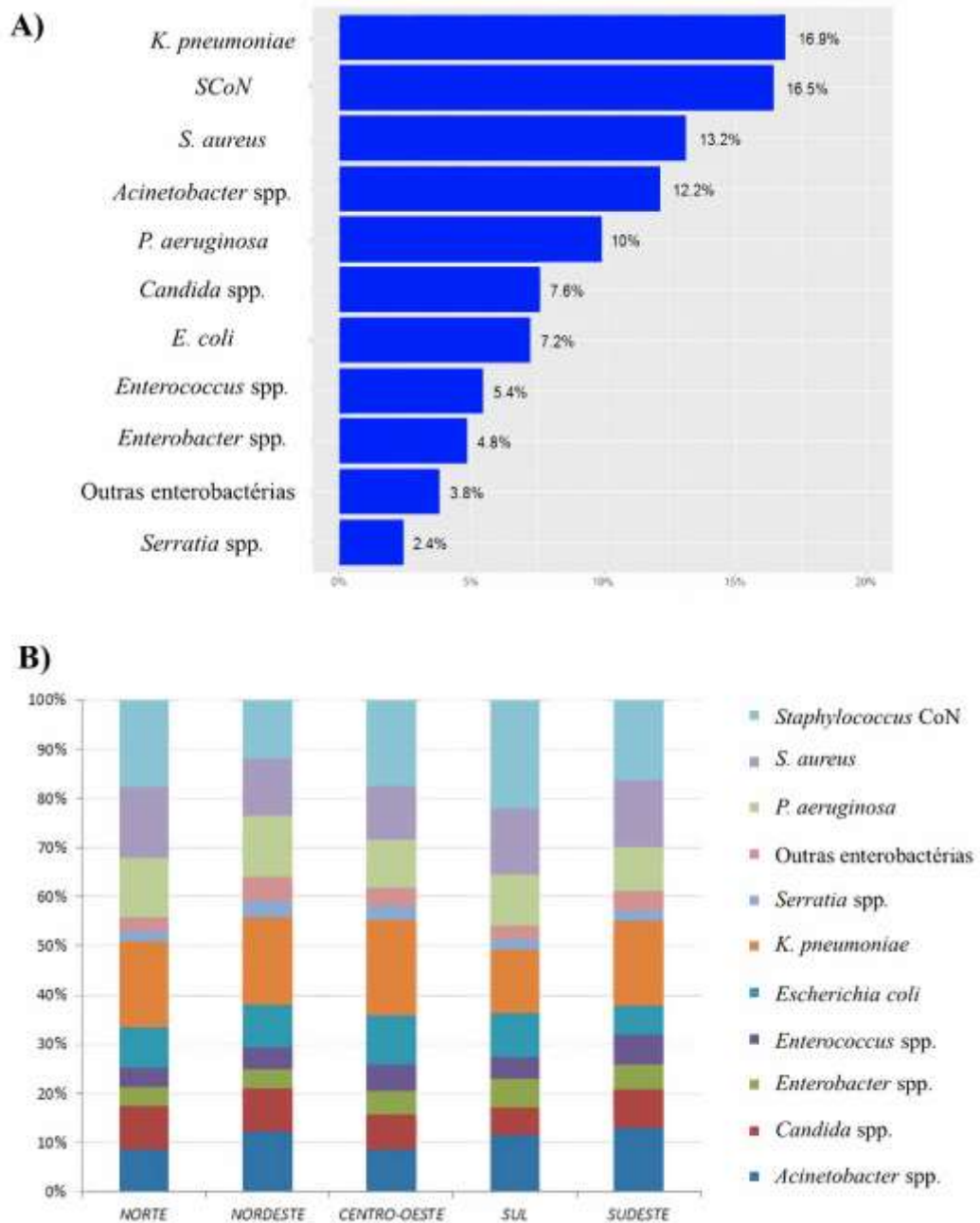


Figura 6. Agentes etiológicos de IPCSL associada a CVC em pacientes adultos em UTIs (A) e distribuição destes em cada região geográfica no Brasil (B). Fonte: Anvisa, 2016.

No que se refere aos custos com o tratamento e o tempo de hospitalização por paciente com infecção causada por SARM, estes podem variar entre \$34.657 e \$113,852, com tempo médio de 15 dias de internação (ORTWINE; BHAVAN, 2018). Estima-se que a taxa de óbitos causados por infecções por microrganismos resistentes seja de 700.000 por ano e que, até o ano de 2050, essa taxa alcance a marca de 10 milhões óbitos e que os tratamentos custem até 100 trilhões de dólares por ano (O'Neill, 2014). Por estes motivos, a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos que tratem infecções causadas por microrganismos resistentes é uma prioridade mundial (TACCONELLI et al., 2018).

2.5 Tratamento farmacológico para infecções causadas por *S. aureus*

As opções terapêuticas que podem ser utilizadas no tratamento de infecções por *S. aureus* dependem do perfil de resistência apresentado pelo microrganismo e pode englobar diversas classes de antimicrobianos, que podem ser usados isolados ou em associação com outros antimicrobianos ou inibidores de β -lactamases. Algumas classes que podem ser citadas são β -lactâmicos, lipopeptídicos, glicopeptídicos, entre outros. (LEWIS et al., 2018).

2.5.1 Agentes tópicos

Os principais agentes tópicos utilizados no tratamento de infecções cutâneas por *S. aureus* são o ácido fusídico e mupirocina. (HARTMAN-ADAMS; BANVARD; JUCKETT, 2014). O ácido fusídico foi inicialmente isolado a partir do caldo de fermentação do fungo *Fusidium coccineum* (GODTFREDSSEN; ROHOLT; TYBRING, 1962), sendo que sua atividade principal é contra estafilococos, incluindo cepas multirresistentes. Apesar de ser comumente utilizado na forma de produtos para aplicação tópica, também é possível a administração para uso sistêmico (TURNIDGE, 1999).

O mecanismo de ação do ácido fusídico consiste no bloqueio da síntese de proteínas ao se ligar ao EF-G no ribossomo, interrompendo a síntese proteica. O EF-G é em um fator de alongamento associado à etapa de translocação. A ação do ácido fusídico é principalmente bacteriostática, entretanto, em altas concentrações, pode ser bactericida (HOWDEN; GRAYSON, 2006). O mecanismo de resistência a este fármaco envolve mutações no gene que codifica a EF-G e também a diminuição da permeabilidade de parede ou membrana celular, mediada por plasmídeo (DOBIE; GRAY, 2004). A monoterapia com ácido fusídico em preparações tópicas tem sido fortemente associada ao surgimento de resistência a este antimicrobiano em SARM e SASM (HOWDEN; GRAYSON, 2006).

A muripirocina é outra alternativa para o tratamento de infecções de pele causadas por *S. aureus*. Este fármaco é um antibiótico da classe dos ácidos monocarboxílicos utilizado como agente antibacteriano contra SARM e SASM, obtido a partir de uma mistura de quatro ácidos pseudomônicos originados do metabolismo de *Pseudomonas fluorescens* (TUCALIUC et al., 2019).

A muripirocina tem como mecanismo de ação a inibição da enzima isoleucil-tRNA sintetase, uma vez que este antibiótico possui similaridades estruturais com a isoleucina. O fármaco liga-se ao sítio ativo da enzima, impedindo a adição da isoleucina às cadeias proteicas da parede celular, tendo efeito bactericida (TUCALIUC et al., 2019). O mecanismo de resistência a este fármaco pode ser classificado em dois tipos: de baixo nível, a partir de mutações cromossômicas pontuais, e de alto nível, associada ao gene de resistência mupA mediado por plasmídeo, que pode ser transferido por conjugação entre diferentes cepas de *S. aureus* ou diferentes espécies (DADASHI et al., 2020).

2.5.2 Agentes sistêmicos

2.5.2.1 Antimicrobianos para o tratamento de SASM

Como alternativa para o tratamento de infecções causadas por SASM estão fármacos β -lactâmicos, principalmente as penicilinas antiestafilocócicas e, alternativamente, tem-se a cefazolina, cefalosporina de primeira geração que pode ser escolhida nos casos de alergia às penicilinas, por exemplo (LI; ECHEVARRIA; TRAUGOTT, 2017a).

As penicilinas antiestafilocócicas, que incluem os fármacos nafcilina, fucloxacilina, cloxacilina e a oxacilina, são recomendadas como tratamento de primeira linha para infecções por SASM (LEFÈVRE et al., 2021). Como todo fármaco desta classe, o mecanismo de ação destas drogas consiste na inibição da formação da parede celular bacteriana ao se ligar às PBPs, enzimas envolvidas na última etapa da formação do peptidoglicano, a transpeptidação. A afinidade entre os β -lactâmicos e as PBPs ocorre pela similaridade estrutural das drogas com o dipeptídeo d-Ala-d-Ala presente na porção terminal de precursores do peptidoglicano (BUSH; BRADFORD, 2016).

A primeira penicilina antiestafilocócica foi a penicilina G, porém logo foi possível observar uma alta taxa de resistência à esta droga (50% dos isolados de *S. aureus* em hospitais), fazendo com que houvesse o estímulo para a síntese da meticilina, primeira penicilina

semissintética resistente à ação das penicilinases, responsáveis pela hidrólise do anel β -lactâmico, contornando este problema (NEU, 1982).

Além das penicilinas, a cefalosporina cefazolina também é uma opção no tratamento de SARM, possuindo o mesmo mecanismo de ação. Alguns estudos fazem a comparação entre as penicilinas e a cefazolina, com achados que mostram eficácia e segurança similares desta cefalosporina em relação ao tratamento padrão (BIDELL; PATEL; O'DONNELL, 2018; LEFÈVRE et al., 2021; LI; ECHEVARRIA; TRAUGOTT, 2017). Contudo, a cefazolina pode apresentar algumas vantagens como probabilidade de descontinuação do tratamento devido a eventos adversos significativamente menor, melhor posologia e custo mais baixo (BIDELL; PATEL; O'DONNELL, 2018).

2.5.2.2 Antimicrobianos para o tratamento de SARM

Os antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções causadas por SARM incluem classes como os glicopeptídeos, as oxazolidinonas, lipopeptídios e cefalosporinas de gerações mais recentes (BROWN et al., 2021). Com isso, é possível observar que as opções de tratamento são limitadas, além de já existirem mecanismos de resistência aos fármacos destas classes.

2.5.2.2.1 Glicopeptídeos

Os principais representantes desta classe são a vancomicina e, secundariamente, a teicoplanina, consideradas o padrão ouro para o tratamento de infecções por SARM, apesar das preocupações sobre eficácia, dosagem e toxicidade (BROWN et al., 2021). Uma grande preocupação em relação ao uso da vancomicina é a ocorrência de insuficiência renal aguda. Por este motivo, a monitorização terapêutica é necessária para que haja a manutenção de concentrações mínimas entre 15 e 20 mg/ L nos casos de infecções graves (RYBAK et al., 2020).

A vancomicina tem atividade ao formar pontes de hidrogênio com d-alanil-d-alanina (d-Ala-d-Ala), subunidades do N-ácido acetilmurâmico e da N-acetilglucosamina, precursores do peptidoglicano. Desta forma, os precursores não podem ser processados pela transglicosilase, tendo como efeito final a inibição da formação da parede celular, deixando as células bacterianas vulneráveis à pressão osmótica, levando o microrganismo a morte (MÜHLBERG et al., 2020). A resistência à vancomicina apresentada por *S. aureus* é conferida pelo gene *vanA*, oriundo de plasmídeos obtidos pela conjugação com cepas de enterococos resistentes à

vancomicina. O gene de resistência leva à síntese de precursores com subunidades D-Ala-D-lactato ou d-Ala-d-Serina, que não se ligam à vancomicina (MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017; STOGIOS; SAVCHENKO, 2020).

2.5.2.2.2 Oxazolidinonas

Como representante das oxazolidinonas, tem-se a linezolida, cujo uso tem sido difundido nos últimos anos, apesar de não existirem evidências de uma eficácia superior em comparação a da vancomicina (BROWN et al., 2021). O mecanismo de ação desta droga está no fato que a linezolina liga-se ao sítio 23S da subunidade 50S ribossômica, inibindo a junção das subunidades 50S e 30S, tendo como efeito a inibição da formação do complexo de iniciação 70S, o que interfere a síntese proteica (LIVERMORE, 2003). O mecanismo de resistência em *Staphylococcus* spp. envolve mutações pontuais na porção 23S por conta de genes de resistência de origem cromossômica ou plasmidial (LIU et al., 2020; RUIZ-RIPA et al., 2021).

2.5.2.2.3 Lipopeptídeos

A daptomicina, representante da classe dos lipopeptídeos, é uma droga produzida por microrganismos da espécie *Streptomyces roseosporus*. Este fármaco possui um mecanismo de ação único e ainda não totalmente compreendido, entretanto, sabe-se que a daptomicina liga-se à membrana citoplasmática, despolarizando-a e alterando a homeostase celular, levando o microrganismo à morte. Além disso, evidências sugerem que a daptomicina também pode interferir diretamente na divisão celular e na síntese da parede celular (TAYLOR; PALMER, 2016). Os mecanismos de resistência propostos são o aumento da carga positiva da membrana bacteriana, mudanças na composição dos ácidos graxos de membrana, alterando a fluidez desta, aumento da concentração de de pigmento carotenóide e aumento da síntese de ácido teicoico (DE ABREU; PERDIGÃO; ALMEIDA, 2020).

2.5.2.2.4 Cefalosporinas

As cefalosporinas fazem parte do grupo dos β -lactâmicos, por tanto, seu mecanismo de ação está associado à inibição da síntese de parede celular. Esta classe possui diferentes drogas, classificadas em gerações, que variam de acordo com a ordem de desenvolvimento e espectro de atividade. A mudança de espectro ocorre devido a alterações na cadeia lateral da estrutura química básica dos fármacos (JORDAN et al., 2020).

As cefalosporinas com ação frente SARM são cefalosporinas de quinta geração, capazes de inibir as transpeptidases PBPs, incluindo PBP1a, PBP2b e PBP2a, responsável pela resistência em SARM (SORIANO, 2021). O principal exemplo é a ceftarolina, desenvolvida

pela modificação estrutural do cefozopran e que possui atividade bactericida contra microrganismos Gram-positivos multirresistentes (OLARTE-LUIS; CÁCERES-GALÍNDEZ; CORTÉS, 2018). A ceftarolina tem sido usada como terapia de salvamento para pacientes com falha terapêutica no tratamento de bacteremia por SARM (HOLUBAR et al., 2020).

Além da ceftarolina, tem-se o ceftobiprole que possui alta atividade bactericida, anti-biofilme e sinergismo com outros antimicrobianos. Este fármaco exibe sinergismo *in vitro* com a daptomicina e vancomicina frente SARM (PÉREZ-CRESPO; CORTÉS, 2021).

A resistência a cefalosporinas de quinta geração já foi reportada e está relacionada com mutações no gene *mecA*. Além disto, mutações no gene *pbp4* levam a codificação da proteína PBP4, que não possui afinidade com fármacos desta geração (MORRONI et al., 2018). Um estudo em um hospital italiano mostrou uma taxa de resistência ao ceftobiprole de 12% (MORRONI et al., 2018), o que deve acender o alerta para que haja o inventivo para o desenvolvimento de mais alternativas farmacológicas para o tratamento de SARM.

2.6 Morte celular bacteriana

A morte celular é um processo fundamental em todos os organismos vivos, uma vez que está associada à variados processos regulatórios, permitindo, portanto, a homeostase. (Bertheloot et al., 2021). A morte celular programada pode envolver diferentes mecanismos, bem estudados em organismos eucariontes, mas pouco explorados para os procariontes. A falta de estudos nessa área está relacionada com a ideia de que a morte programada em organismos unicelulares é contraintuitiva, entretanto, a morte celular de procariontes ocorre e pode apresentar benefícios em casos de convivência em comunidades microbianas (ALLOCATI et al., 2015).

Em organismos eucariontes, a morte celular programada é dividida em apoptose, necrose e piroptose (BERTHELOOT et al., 2021), já em procariontes, a divisão é feita em processos apoptose-*like* e autólise (BAYLES, 2014), que ocorrem nas bactérias quando existem danos irreparáveis ao DNA. Importante ressaltar que alguns autores, como Häcker (2013), desaconselham o uso do termo apoptose para definir a morte celular em bactérias, por conta dos distintos eventos bioquímicos que ocorrem em células de mamíferos e células bacterianas.

O processo da morte celular programada inicia-se com o estresse celular, como o causado por agentes antimicrobianos, que podem induzir a ativação de mecanismos de reparo do DNA ou de vias de morte celular. O reparo ocorre em casos de danos mínimos ao DNA. Caso os danos sejam irreparáveis, o sistema Cid-/Lrg, proteínas que servem como mediadoras

da morte ou lise celular, é ativado, e a morte celular induzida (BAYLES, 2014). Alternativamente, a morte celular pode ser induzida pelo sistema toxina-antitoxina (TA), formados por complexos estáveis de toxinas e antitoxinas que, em caso de danos celulares ou condições de estresse, as antitoxinas são degradadas, permitindo que a toxina livre ligue o seu alvo celular. O mecanismo molecular pelo qual estas toxinas agem levando à morte celular está provavelmente relacionado à despolarização e aumento da permeabilidade da membrana, conduzindo o microrganismo a morte. (ALLOCATI et al., 2015; BAYLES, 2014).

2.7 Estratégias contra a resistência aos antimicrobianos

Atualmente, os principais esforços contra bactérias resistentes estão na melhoria do diagnóstico, controle das prescrições, com o objetivo de reduzir o uso desnecessário dos antimicrobianos, além das estratégias de prevenção de infecções. Essas são estratégias fundamentais no que tange a prevenção da resistência aos antimicrobianos. Entretanto, no que se refere às opções farmacológicas, sabe-se que existem poucas moléculas antimicrobianas em desenvolvimento e que poucas destas representam novas classes antibióticas, o que aumenta as chances de uma rápida adaptação por parte dos microrganismos (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020; NATHAN, 2020). Por tanto, outras estratégias devem ser pensadas para que haja o aumento no arsenal terapêutico contra microrganismos resistentes, como o reposicionamento de fármacos e a busca por drogas com atividade sinérgica.

2.7.1 Reposicionamento de fármacos

O desenvolvimento de um novo medicamento é um processo caro e demorado, custando bilhões de dólares e levando em média de 10 a 15 anos para que uma nova molécula chegue ao mercado (BERDIGALIYEV; ALJOFAN, 2020). Uma das razões para isso é o fato de que é preciso um longo caminho para identificar um alvo e escolher uma droga que possa se ligar a um receptor e gerar o efeito desejado (HUGHES et al., 2011).

Desenhos assistidos por computador, fontes biológicas, como anticorpos monoclonais, ou fontes naturais, como plantas ou animais, são as principais fontes para a descoberta de uma nova molécula com atividade farmacológica (BERDIGALIYEV; ALJOFAN, 2020). Tais moléculas devem passar por testes pré-clínicos, que avaliam a atividade da nova molécula *in vitro* e *in vivo*, utilizando animais. Após esses testes, é necessário passar por ensaios clínicos, que avaliam a eficácia e segurança dos medicamentos (BRODNIEWICZ; GRYNKIEWICZ, 2010).

Apesar de ser um processo realizado com muita cautela, as taxas de insucesso em ensaios clínicos são consideravelmente altas, uma vez que cerca de 54% dos novos medicamentos desenvolvidos podem falhar nesta etapa, enquanto uma média de 36% chega a ser aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) (HWANG et al., 2016). Entretanto, no que se refere aos medicamentos destinados ao tratamento de doenças infecciosas, a taxa de aprovação destes ficou próxima de 50%. Essa taxa de aprovação mais alta pode estar correlacionada com vários programas de aprovação acelerada da FDA para novas terapias antibacterianas. No entanto, essa estratégia pode aumentar as chances de aprovação de medicamentos menos eficazes ou menos seguros (FLOYD; PSATY, 2014).

A descoberta de moléculas antimicrobianas não é uma questão simples. A descoberta da penicilina em 1928 deu início à era dos antibióticos, cuja fase mais relevante ocorreu entre as décadas de 40 e 60 (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019), seguido por uma lacuna temporal na qual nenhum outro antibacteriano foi introduzido no mercado após essas décadas. Novas drogas foram introduzidas somente no início dos anos 2000, quando as oxazodinolonas e os lipopeptídeos foram descobertos (FISCHBACH; WALSH, 2009; MILLS, 2006).

A dificuldade em desenvolver novos antimicrobianos é notável e reflete nas opções limitadas para o tratamento de doenças infecciosas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) alerta que a falta de desenvolvimento de novos antimicrobianos ameaça os esforços para conter infecções por microrganismos resistentes, o que eleva os custos do tratamento e as taxas de mortalidade (OMS, 2020). Por esses motivos, alternativas para aumentar o arsenal terapêutico contra microrganismos resistentes devem ser consideradas.

Nesse contexto, surge como estratégia o reposicionamento de fármacos, que é a utilização de medicamentos já aprovados para uso em novas propostas, favorecendo a produtividade e possibilitando que novas alternativas terapêuticas cheguem ao mercado entre em um período que pode variar entre 3 a 12 anos (ASHBURN; THOR, 2004).

Os medicamentos reposicionados não devem alterar sua estrutura molecular, utilizando-os apenas para novas propriedades biológicas, formulações ou vias de administração (JOURDAN et al., 2020). Estudos para avaliar a atividade de medicamentos reposicionados podem ser realizados por meio de programas de computador, ensaios biológicos experimentais e abordagens mistas (XUE et al., 2018).

Embora seja uma alternativa promissora, o reposicionamento de medicamentos enfrenta desafios como a necessidade de reformulação devido aos novos usos propostos. Ademais, há a barreira da propriedade intelectual, a falta de investimento, além da epidemiologia da doença

ou produtos concorrentes que também podem ser fatores complicadores (RASTEGAR-MOJARAD et al., 2015). Porém, sabe-se que a demanda por novos antibióticos é crescente e necessária.

Alguns exemplos de fármacos reposicionados e aprovados por órgãos regulamentadores para fins de tratamento de doenças infecciosas que podem ser mencionados são: a anfotericina B, antifúngico, reposicionada para o tratamento de leishmaniose (MEYERHOFF, 1999), eflornitina, desenvolvida para uso como agente antitumoral, reposicionado para tratar a tripanossomíase africana (SIMARRO et al., 2012) e a zidovudina, um fármaco antirretroviral, inibidor da transcriptase reversa, que foi originalmente desenvolvido para o tratamento de câncer (YARCHOAN et al., 1986).

Apesar dos desafios, os custos e o tempo de desenvolvimento reduzidos tornam o reposicionamento de fármacos uma estratégia de interesse, pois utiliza fármacos já conhecidos, a estrutura, toxicidade, biodisponibilidade e outras características já são conhecidas, permitindo iniciar com os ensaios nos estudos fase II (MERCORELLI; PALÙ; LOREGIAN, 2018).

2.7.2 *Fármacos com atividade sinérgica*

Aliada ao reposicionamento de fármacos, a terapia combinada de fármacos com atividade sinérgica é outra importante estratégia para o tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos resistentes. Estudos para a avaliação de atividade sinérgica examinam os resultados obtidos a partir de combinações de duas ou mais drogas com objetivo de alcançar um efeito geral que seja maior do que a soma de suas partes individuais (CHEESMAN et al., 2017).

Exemplos clássicos de medicamentos combinados já utilizados na prática clínica são trimetoprima + sulfametoxazol, gentamicina + ampicilina e o esquema terapêutico multimedicamentoso utilizado no tratamento da tuberculose (WRIGHT, 2016). De acordo com a OMS, a terapia combinada é preferível à monoterapia no tratamento de várias doenças infecciosas que representem risco de vida ao paciente, por conta da capacidade de reduzir a resistência e dispor de mecanismos de ação diversos (OMS, 2016).

Além do exposto, a interação sinérgica entre as drogas é relevante pois age aumentando a potência em combinação, reduzindo a toxicidade e minimizando a indução de resistência (CHOU, 2006). Os mecanismos que podem estar relacionados ao sinergismo entre drogas com atividade antimicrobiana são alteração da permeabilidade da membrana, redução da atividade

da bomba de efluxo, inibição da formação de biofilme e inibição de enzimas importantes para o funcionamento das células microbianas (LIU et al., 2014).

O sinergismo entre fármacos pode ocorrer de três maneiras (Figura 7): por meio de combinações congruentes, na qual os compostos já apresentam individualmente atividade inibitória do crescimento do microrganismo, combinações sincréticas, que incluem pelo menos uma droga que não apresenta atividade antimicrobiana acentuada, e a combinação denominada coalismo, que ocorre entre compostos que não possuem atividade antimicrobiana isoladamente, mas são ativos em combinação (TYERS; WRIGHT, 2019).

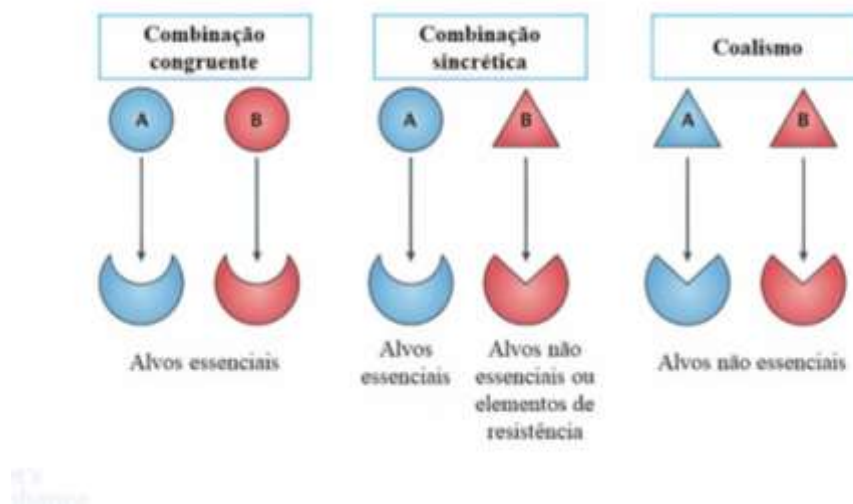


Figura 7. Tipos de combinações sinérgicas de fármacos com atividade antimicrobiana. Fonte: Adaptado de Tyers e Wright (2019)

A interação sinérgica de drogas é particularmente útil no reposicionamento de fármacos uma vez que alguns compostos com atividade antimicrobiana fraca, o que impede a aplicação isolada devido à concentração limitada do fármaco no plasma humano, podem ser resgatados uma vez que agem em sinergismo com outro fármaco (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018).

2.8 Anlodipino

O anlodipino, nomenclatura IUPAC 3-O-ethyl 5-O-methyl 2-(2-aminoethoxymethyl)-4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate, (Figura 8), é um fármaco pertencente à classe das 1,4-diidropiridinas, aprovado em 1987 pela FDA (WAGNER; KENREIGH, 2022). Os derivados do 1,4-dihidropiridina (1,4-DHP) são amplamente utilizados clinicamente como bloqueadores de canais de cálcio do tipo L, resultando em bradicardia e vasodilatação e, por conseguinte, são utilizados no tratamento da hipertensão e doenças cardiovasculares (BADE et al., 2017).

O 1,4-DHP é um dos anéis heterocíclicos mais importantes na química farmacêutica, possuindo efeitos terapêuticos proeminentes e versáteis. Este anel é um potente antagonista de canais de cálcio e tem atividade como anti-hipertensivo e antianginoso, além de atividade antitumoral, anti-inflamatório, antituberculoso, anticancerígeno, anti-hiperplasia, agente antimutagênico, antidislipidêmico e antiúlcera e estima-se que a adição de grupos funcionais a este anel pode adicionar outros efeitos como anticonvulsivante, antioxidante e antimicrobiano (MISHRA; BAJPAI; RAI, 2019).

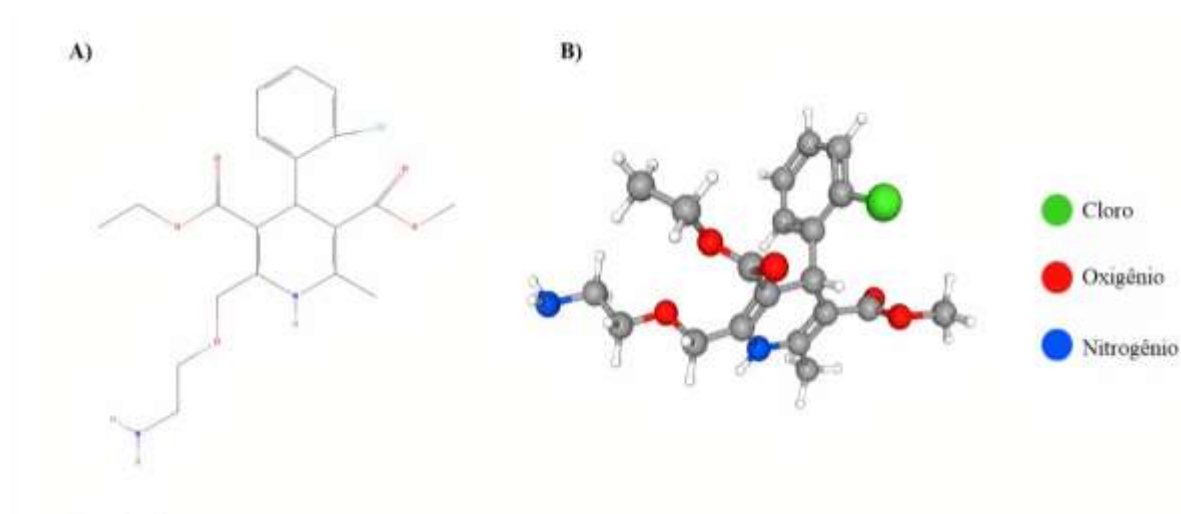


Figura 8. Representação estrutural (A) e estrutura otimizada (B) do Anlodipino. Fonte: Pubchem

O anlodipino é um fármaco administrado de forma oral e, em comparação com outros medicamentos da classe, apresenta meia-vida mais longa de 30 a 50 horas, o que torna possível a redução da sua posologia (WAGNER; KENREIGH, 2022). Isso porque, em pH fisiológico, o anlodipino encontra-se na sua forma ionizada, o que aumenta sua afinidade pelas membranas celulares, o que contribuindo para um metabolismo hepático e alcance de picos plasmáticos lentos (VAN ZWIETEN, 1994).

Os usos aprovados do anlodipino pelo FDA incluem o tratamento de hipertensão, angina estável crônica (angina pectoris), angina de Prinzmetal (angina vasoespástica) e doença arterial coronariana (aterosclerose coronariana) (WAGNER; KENREIGH, 2022). Entretanto, o anlodipino apresenta outros usos que ainda não são aprovados pelo FDA, como no tratamento de nefropatia diabética (TABUR et al., 2015) e na Doença de Raynaud (LEE et al., 2014).

A segurança do anlodipino em doses terapêuticas é conhecida, não apresentando efeitos tóxicos e sendo seguro para o uso em mulheres grávidas, por não oferecer efeitos deletérios ao feto (MITO et al., 2019), sendo que a concentração plasmática média do anlodipino é de 6–14

ng/mL (BOYD et al., 2021). Doses elevadas do anlodipino podem causar ao paciente hipotensão (PATEL; TIETZE; MEHTA, 2013) e depressão cardiovascular (OK; SOHN, 2018).

No que se refere a atividade antimicrobiana do anlodipino, esta já foi observada em microrganismos distintos, incluindo fungos filamentosos e leveduriformes, protozoários e bactérias (KRUSZEWSKA; ZAREBA; TYSKI, 2006; LIU et al., 2016; MAZUMDAR; ASOK KUMAR; DUTTA, 2010; PALIT; ALI, 2008).

Tais estudos, como o de Kruszewska, Zareba & Tyski (2006) mostraram dados obtidos a partir de um *screening* de produtos não-antibióticos frente alguns microrganismos, no qual o anlodipino exibiu a concentração inibitória mínima equivalente a 3 mg/ mL frente *S. aureus*. Já no estudo de Liu e colaboradores (2016) é possível observar o sinergismo do anlodipino com o fluconazol frente *Candida albicans*. Todavia, os mecanismos que envolvem a atividade antimicrobiana desta droga não são bem elucidados.

Por tanto, diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo a avaliação da atividade do anlodipino frente *S. aureus* em sua forma de células planctônicas e biofilme, além de avaliar o provável mecanismo de ação envolvido na atividade antimicrobiana deste fármaco.

3. HIPÓTESES

3.1 O anlodipino apresenta atividade antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

3.2 O anlodipino apresenta atividade sinérgica quando associado à oxacilina frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

3.3 O anlodipino apresenta atividade antimicrobiana frente aos biofilmes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

3.4 O anlodipino possui efeito antimicrobiano ao provocar danos na membrana celular e ao DNA bacteriano, bem como formar ligações com importantes alvos proteicos de *S. aureus*

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana do anlodipino frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (SARM) na forma de células planctônicas e em biofilme, e elucidar o possível mecanismo de ação envolvido nesta atividade.

4.2 Objetivos específicos

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

4.2.2 Determinar o nível de tolerância ao anlodipino, bem como sua Concentração Bactericida Mínima (CBM).

4.2.3 Verificar o tipo de interação farmacológica encontrada na combinação do anlodipino com a oxacilina, através da determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI).

4.2.4 Avaliar possíveis alterações morfológicas nas células bacterianas causadas pelo anlodipino isolado e em associação com a oxacilina por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

4.2.5 Avaliar o efeito anlodipino na viabilidade celular de biofilmes em formação de *Staphylococcus aureus*.

4.2.6 Avaliar o efeito anlodipino na viabilidade celular de biofilmes formados de *Staphylococcus aureus*.

4.2.7 Averiguar o possível mecanismo de ação envolvido na atividade do anlodipino frente a cepas de SARM, utilizando técnicas de citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e *molecular docking*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

As metodologias empregadas no presente estudo seguiram conforme o ilustrado na Figura 9. As etapas iniciais envolveram a obtenção da droga e testes de sensibilidade antibacteriana em células planctônicas. Em seguida, foram realizados testes frente biofilmes, e por fim, testes para elucidação do possível mecanismo de ação do anlodipino frente *S. aureus*.

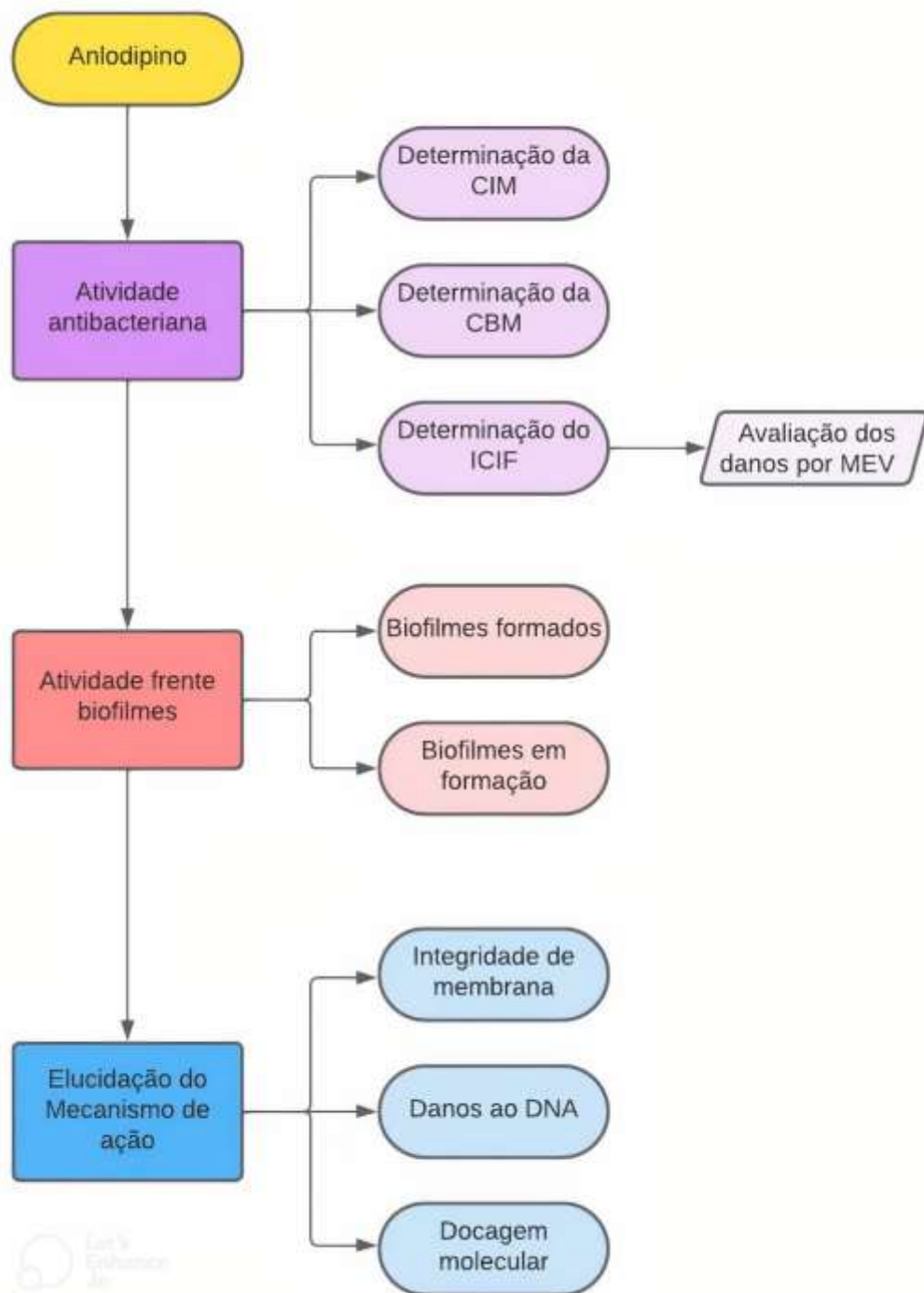


Figura 9. Fluxograma das metodologias executadas no estudo. Elaborado pela autora.

5.1 Microrganismos

Neste estudo, foram utilizadas 18 cepas clínicas de *S. aureus*, das quais 12 consistiam em cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (SARM) e 6 eram cepas de *S. aureus* sensíveis à meticilina (SASM). Além disso, foram utilizadas duas cepas provenientes da *American Type Culture Collection* (*S. aureus* ATCC 6825P, sensível à meticilina, e *S. aureus* ATCC 65398, resistente à meticilina). Todos os microrganismos utilizados pertencem à bacterioteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC). O projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código A995903.

5.2 Drogas

Foram utilizados o besilato de anlodipino (ANL) e oxacilina sódica (OXA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), sendo que o ANL foi diluído em solução aquosa contendo 2% de dimetilsulfóxido (DMSO), enquanto a OXA foi diluída em água destilada estéril.

5.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi encontrada por meio da técnica de microdiluição em caldo, seguindo o protocolo do CLSI M07-A10 (CLSI, 2015). As concentrações utilizadas nos testes foram de 1024-2 µg/ mL para o ANL e 1024- 2 µg/ mL para a OXA em cepas resistentes e 32-0.0625 µg/ mL para as cepas sensíveis. Para o teste com ANL foi utilizado meio caldo Mueller Hinton cátion ajustado (CAMHB), enquanto para OXA foi usado CAMHB acrescido de 2% de NaCl.

Foram utilizadas placas de cultura estéreis de 96 poços com poços de fundo chato, onde nos poços da coluna 2 desta, foram adicionados 200 µL da droga diluída nas concentrações iniciais supracitadas, seguida da diluição seriada com 100 µL até os poços da coluna 11. Nos poços da coluna 12, havia somente meio de cultura e inóculo, sendo utilizado como controle positivo do teste. Na coluna 1 foi adicionado apenas o meio de cultura, servindo como controle negativo.

Em relação ao preparo do microrganismo, após o repique e crescimento de 24 h a 35°C das cepas, foram preparados inóculos em solução salina estéril na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/ mL, equivalente à escala 0,5 de McFarland. Os inóculos foram diluídos em meio

CAMHB para obtenção inóculos com concentração equivalente a 5×10^5 UFC/ mL. Foram adicionados 100 μ L do inóculo nos poços da coluna 2 à coluna 12. As placas foram incubadas em estufa por 20 horas a 35°C, realizando-se a leitura visual após este período. A CIM foi definida como aquela que visualmente inibiu 100% do crescimento das células bacterianas (CLSI, 2015).

Visando a maior fidedignidade e reprodutibilidade do estudo, os ensaios foram realizados em triplicata. As cepas padrão foram utilizadas como controle, sendo definido como o ponto de corte a $CIM \geq 4 \mu\text{g/ mL}$ para oxacilina (CLSI, 2016).

5.4 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A determinação da concentração bactericida mínima do ANL seguiu os métodos descritos por Andrade Neto *et al* (BATISTA DE ANDRADE NETO *et al.*, 2019). Após a realização da microdiluição em caldo nas placas de 96 poços, foram retiradas alíquotas de 10 μ L dos poços nos quais não houve o crescimento visível de microrganismos. As alíquotas foram semeadas em meio Mueller Hinton ágar, e as placas foram incubadas a 35°C por 20h. A CBM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento das cepas na placa de ágar.

5.5 Teste de tolerância

O nível de tolerância foi avaliado conforme o cálculo proposto por Das *et al* (DAS *et al.*, 2016), no qual o valor da CBM é dividido pelo valor da CIM. Os resultados são interpretados a partir dos valores obtidos nesta divisão, sendo que valores ≥ 16 definem a atividade bacteriostática e valores de ≤ 4 são descritos como atividade bactericida frente a cepa em estudo.

5.6 Verificação da interação farmacológica entre ANL e OXA

A interação farmacológica entre o ANL e a OXA foi avaliado por meio da técnica do *checkerboard* (ODDS, 2003). As concentrações iniciais das drogas em combinação utilizadas no teste variaram conforme as CIMs encontradas para cada cepa. Na coluna 2 da placa de 96 poços, foram adicionados 200 μ L de soluções das drogas em combinação, nos demais poços, foram adicionados 100 μ L de CAMHB acrescido de 2% de NaCl. O teste prosseguiu com a

microdiluição seriada dos poços da coluna 2 até a coluna 11, com adição do inóculo nos poços da coluna 2 a 12, semelhante ao procedimento de determinação do CIM.

O tipo de interação farmacológica encontrada foi definido pelos valores do Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI), resultante da soma dos valores da Concentração Inibitória Fracionária (FIC) de cada fármaco, sendo que a $FICI = CIM \text{ em combinação} \div CIM \text{ do fármaco isolado}$. Os resultados obtidos foram interpretados de modo que o sinergismo foi indicado por valor de $FICI \leq 0.5$, efeito aditivo por $0.5 < FICI \leq 1$, indiferença por $1 < FICI \leq 4$ e antagonismo indicado por $FICI > 4.0$ (JORGE et al., 2017).

5.7 Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliar eventuais danos à estrutura celular causados pelo ANL isolado e em associação com a oxacilina, foi performada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a execução do procedimento, a cepa SARM 2, escolhida como cepa representativa do grupo em análise, foi semeada em ágar Mueller Hinton e, após 20 horas de incubação, foram feitos inóculos de concentração 5×10^5 UFC/ mL em meio *Tryptic Soy Broth* (TSB), (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), suplementado com 2% de glicose. Esses inóculos foram tratados com o ANL e a OXA isoladamente em suas respectivas concentrações inibitórias, e com estas drogas em associação, também na CIM. Além disso, foi feito o controle com células sem tratamento para fins de comparação. As células tratadas e o controle foram incubados por 20 horas a 37°C.

Após o período de incubação, os tubos com as amostras foram centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos para posterior remoção do sobrenadante. As células foram ressuspensas e adicionadas em lamínulas de vidro circulares de 13mm de diâmetro contendo silano como agente promotor de adesão entre as células planctônicas e as lamínulas. Em seguida, as lamínulas foram imersas em solução de glutaraldeído a 2,5%, e incubadas *overnight* em refrigeração. No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas com solução tampão de cacodilato 0.1M e passaram pelo processo de desidratação alcóolica, com uma série crescente concentrações de álcool (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%) por 10 min cada. Logo após, as lamínulas foram cobertas com hexametildisilazano e deixadas em temperatura ambiente para secagem e eliminação deste reagente. As amostras foram metalizadas com ouro e visualizadas sob microscópio eletrônico de varredura Quanta 450-FEG (FEI) para evidenciar danos estruturais.

5.8 Atividade em biofilmes em formação

Para avaliar a atividade do ANL na formação dos biofilmes, foram selecionadas 3 cepas de SARM e 1 cepa de SASM, as quais foram expostas à CIM/2, CIM, 2 x CIM, 4 x CIM e 8 x CIM, sendo os valores equivalentes a 32, 64, 128, 256 e 512 µg/ mL para a SASM 1 e SARM 6, e os valores de 64, 128, 512 e 1024 µg/ mL para as cepas SARM 1 e SARM 2. Além disso, foi avaliada a atividade do ANL e da OXA em combinação e da OXA isolada, em suas respectivas CIMs. As drogas foram diluídas em meio TSB suplementado com 2% de glicose. A metodologia seguiu conforme descrito por Costa *et al* (COSTA et al., 2014), com algumas modificações.

As cepas selecionadas foram inicialmente semeadas em tubos contendo meio TBS + 2% glicose, e incubadas por 24h à 35°C. Após a incubação, foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e lavadas três vezes com solução salina. Posteriormente, o inóculo foi preparado com concentração de 3×10^8 UFC/ mL também em meio TSB + 2% glicose.

Foram adicionados 100 µL dos inóculos e das diluições das drogas em microplacas de 96 poços de poliestireno, as quais foram incubadas à 35° por 48 horas. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e os biofilmes foram lavados três vezes com solução salina. A avaliação da atividade metabólica dos biofilmes foi avaliada por ensaio colorimétrico utilizando solução de 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT 1 mg/ mL) que foi adicionado nas placas que foram incubadas por 2 horas a 35°C. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e DMSO foi adicionado aos poços para a solubilização do cristal de formazan formado por células metabolicamente ativas. A leitura das placas foi feita em espectrofotômetro Biochrom Asys UVM 340 microplate reader (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) a 492 nm.

5.9 Atividade em biofilmes formados

A avaliação da atividade do ANL, sua associação com a OXA e da OXA isolada foi feita conforme a metodologia de Brambilla *et al* (BRAMBILLA et al., 2017) com algumas modificações, utilizando as mesmas cepas e concentrações descritas na seção anterior. Inicialmente, o inóculo foi preparado em meio TSB + 2% glicose em concentração de 3×10^8 UFC/ mL, e alíquotas de 200 µL foram adicionados nos poços da microplaca de poliestireno, as quais foram incubadas por 48 horas a 35°C.

Após a incubação, o sobrenadante foi retirado e os biofilmes foram lavados três vezes com solução salina. Em seguida, foram adicionados 200 µL das diluições das drogas, feitas em

meio TSB + 2% glicose. As placas foram novamente incubadas a 35°C por 24 horas e, após esse período, o sobrenadante foi retirado e os biofilmes foram novamente lavados três vezes com salina.

Após as lavagens, a solução de MTT foi adicionada às placas, que foram incubadas por 2 horas a 35°C, e cristal de formazan formado após esse período foi dissolvido em DMSO. A leitura das placas foi feita em espectrofotômetro Biochrom Asys UVM 340 microplate reader (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) a 492 nm.

5.10 Avaliação do provável mecanismo de ação

Para determinar o possível mecanismo de ação exibido pelo ANL frente ao *S. aureus*, foram realizados ensaios por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, possibilitando a análise do possível alvo celular do ANL. Foram feitos testes para avaliar a integridade de membrana do microrganismo, bem como avaliar eventuais danos ao DNA. A cepa escolhida para este ensaio foi a SARM 2, por conta da homogeneidade dos resultados. Além disto, foi feita a análise *in silico* dos possíveis alvos proteicos do ANL em *S. aureus*.

5.10.1 Preparo do inóculo

Para o preparo do microrganismo, foi feito um inóculo na concentração 1×10^6 UFC/ mL em caldo infusão cérebro e coração ou *brain heart infusion* (BHI), conforme descrito por Sá *et al* (DO AV SÁ *et al.*, 2020). O microrganismo foi exposto à OXA (CIM), vancomicina (CIM), ANL (CIM e 2 x CIM) e à associação ANL + OXA, em suas respectivas CIMs isoladas. A VAN foi utilizada como controle de morte. Como controle de crescimento, foi utilizado o microrganismo em meio de cultura sem droga.

5.10.2 Avaliação da integridade de membrana

O método de exclusão com iodeto de propídio (2 µg/mL) foi performado para realizar a determinação da integridade da membrana celular do microrganismo. Após o tratamento com as drogas, seguido pelo período de incubação, a fluorescência celular emitida foi avaliada por citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e o software CytoSoft 4.1. Um total de 10,000 eventos foram avaliados por análise (n=2), e os debris celulares foram omitidos (NETO *et al*, 2015; SHI *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2011).

5.10.3 Avaliação de danos ao DNA

A partir do ensaio do terminal *deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end-labeling* (TUNEL) a análise de eventuais danos ao DNA causados pelas drogas utilizadas pode ser realizada (DWYER et al., 2012; NETO et al., 2014). Inicialmente, as células bacterianas foram tratadas e fixadas com paraformaldeído a 7%. Em seguida, as células fixadas foram expostas ao Triton X-100 a 1% em gelo por 10 minutos e incubadas com o TUNEL por 1h a 37° C. A determinação da porcentagem de células positivas foi feita a partir da contagem de duzentas células em microscópio de fluorescência (Olympus, Tokyo, Japan).

5.10.4 Análise de dados

A análise dos dados foi realizada utilizando a média de três experimentos independentes, via software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os dados obtidos nos testes de sensibilidade contra biofilmes foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguida de testes de Tukey ($p < 0,05$). Os dados obtidos nas análises de citometria foram comparados pelo Student Newman Keuls ($p < 0,05$), utilizando o mesmo software.

5.10.5 *Molecular docking*

5.10.5.1 *Otimização do ligante*

A estrutura química do anlodipino foi obtida no repositório *Pubchem* por meio do CID 2162 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2162>), o confômero de menor energia foi salvo usando o código MarvinSketch™ (<https://chemaxon.com/products/marvin>) (CHEMAXON, 2019; CSIZMADIA, 2019), que posteriormente foi otimizado utilizando o campo de força MMFF94 (*Merck Molecular Force Field 94*) usando algoritmo *steepest descent* e ciclos de 50 interações por meio do código Avogadro™ (<http://avogadro.cc/>) (HANWELL et al., 2012).

5.10.5.2 *Obtenção dos alvos*

Para avaliar o mecanismo de ação do anlodipino contra receptores SARM, 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 α -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 1JJJ), 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).

5.10.5.3 Preparação dos alvos e procedimentos gerais de Docking

A etapa de 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* seguiu a metodologia utilizada por Andrade Neto et al (ANDRADE NETO et al., 2021). Na preparação dos alvos C(30) *carotenoid dehydrosqualene synthase from Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus FtsA* foram mantidos os íons Mg^{+2} , foi mantido o Fab LTM14 no alvo *S. aureus α -hemolysin*, sendo 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). Foi realizada a remoção das moléculas de água e inibidores co-cristalizados em todos os alvos, bem como a adição dos hidrogênios polares e cargas *Gasteiger* (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, 2010), utilizando *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA), *Exhaustiveness* 64 (MARINHO et al., 2020) e grid de simulação envolvendo toda a estrutura dos alvos selecionados por meio dos eixos (x, y, z) e *size* (x, y, z) para cada alvo (Tabela 2). Foram realizadas 50 simulações independentes e os resultados foram analisados utilizando os códigos *Discovery studio visualizer™ viewer* (BIOVIA, 2016), *Pymol* (DELANO, 2020) e *UCSF Chimera™* (PETTERSEN et al., 2004).

Tabela 2. Parâmetros utilizados nas simulações de *molecular docking*.

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

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 of *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 of *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

Cada simulação de *molecular docking* gera 20 poses do ligante com relação ao alvo proteico, onde a *Best Pose* é inicialmente selecionada a partir do *Root Mean Square Deviation* (RMSD) de até 2 Å (YUSUF et al., 2008), sendo este valor um critério de validação das simulações, posteriormente, é utilizada a energia de afinidade (ΔG), para seleção da *Best Pose*, sendo considerada ideal quando apresenta valores iguais ou inferiores a -6.0 kcal/mol (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014). A equação 1 foi utilizada para determinar os valores das constantes de inibição (K_i) de cada complexo formado a partir da energia de afinidade (KADELA-TOMANEK et al., 2021), onde K_i é a constante de inibição, ΔG é a energia de afinidade ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), R é a constante do gás ($8.32 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (298K).

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

Também avaliamos a força das ligações de hidrogênio (*H-bonds*) utilizando os valores das distâncias entre os átomos doadores e receptores, em que são consideradas ligações fortes (*Strong*) as interações que ficaram entre 2.5-3.1 Å, são classificadas como moderadas (*Average*) as interações que ficaram entre 3.1-3.55 Å e consideradas ligações fracas (*Weak*) aquelas que apresentaram distâncias superiores a 3.55 Å (IMBERTY et al., 1991).

6 RESULTADOS

6.1 Atividade antibacteriana do anlodipino

6.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima do anlodipino frente a cepas de *S. aureus*

O anlodipino apresentou atividade antimicrobiana dentro das concentrações testadas, apresentando a CIM variando entre 64 e 128 µg/ mL para todas as cepas de SARM e SASM utilizadas no estudo. Em relação aos valores de CBM, estes variaram entre 64 a 256 µg/ mL (Tabela 3).

6.1.2 Determinação do nível de tolerância

O nível de tolerância para o ANL foi determinado partir dos resultados obtidos com a razão entre CBM e CIM encontrado para cada cepa em análise. Foi possível observar que o ANL apresentou efeito bactericida frente a todas as cepas de MSSA e MRSA utilizadas no estudo (Tabela 3).

6.1.3 Avaliação da Interação Farmacológica entre o anlodipino e a oxacilina

A partir do ensaio do *checkerboard*, seguido pelo cálculo do índice da concentração inibitória fracionada (FICI), foi possível determinar que o ANL e a OXA apresentam interação farmacológica dos tipos sinérgica e aditiva, equivalendo a, respectivamente, 57,89% e 42,10% das cepas utilizadas no estudo (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), sinergismo com oxacilina e determinação do nível de tolerância (CBM/CIM) do anlodipino contra cepas de *Staphylococcus aureus*.

Cepas ^a	Isolado ^c		Combinação ^d			Nível de Tolerância			
	ANL	OXA	ANL	OXA	FICI	Interpretação ^e	CBM ^f	CBM/CIM ^g	Interpretação
SASM ATCC 6825P	128	0,125	64	0,0625	1	ADT	128	1	Bactericida
SASM 1	64	2	16	0,5	0,5	SIN	64	1	Bactericida
SASM 2	128	2	16	0,25	0,25	SIN	128	1	Bactericida
SASM 3	64	1	32	0,5	1	ADT	128	2	Bactericida
SASM 4	64	2	8	0,25	0,25	SIN	128	2	Bactericida
SASM 5	128	0,5	32	0,125	0,5	SIN	256	2	Bactericida
SARM ATCC 65398	64	8	32	4	1	ADT	128	2	Bactericida
SARM 1	128	256	64	128	1	ADT	256	2	Bactericida
SARM 2 *	128	256	16	32	0,25	SIN	256	2	Bactericida
SARM 3	128	128	16	16	0,25	SIN	256	2	Bactericida
SARM 4	64	64	16	16	0,5	SIN	128	2	Bactericida
SARM 5	64	32	32	16	1	ADT	64	1	Bactericida
SARM 6	64	64	16	16	0,5	SIN	128	2	Bactericida
SARM 7	128	64	32	16	0,5	SIN	128	1	Bactericida
SARM 8	128	512	64	256	1	ADT	256	2	Bactericida
SARM 9	64	8	32	4	1	ADT	64	1	Bactericida
SARM 10	128	256	32	64	0,5	SIN	256	2	Bactericida
SARM 11	64	1024	32	512	1	ADT	64	1	Bactericida
SARM 12	128	64	32	16	0,5	SIN	256	2	Bactericida

^a Cepas de *S. aureus* de coleção ^b CIM – Concentração Inibitória Mínima necessária para inibir o crescimento de 99% do crescimento dos microrganismos após incubação por 20 h. ^c A microdiluição em caldo foi realizada de acordo com o protocolo CLSI M07-A9 para drogas isoladas. ^d Combinação do anlodipino com oxacilina. ^e ADT- Aditivo/ SIN- Sinérgico. ^f Os valores de CBM foram determinados a partir do subcultivo das diluições de CIM em placas de ágar estéreis, incubadas a 37 °C por 24 h, nas quais sua concentração foi determinada quando não apareceu nenhum crescimento visível na placa de ágar. ^g CBM/CIM ≥16 (bacteriostático); ≤4 (Bactericida). (*) Cepa selecionada para os experimentos usando citometria de fluxo. ANL: anlodipino; OXA: oxacilina

6.1.4 Avaliação dos danos estruturais causados pelo anlodipino por microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi capaz de revelar importantes alterações estruturais na célula bacteriana. Imagens representativas (Figura 10) mostram as células sem e com o tratamento com o anlodipino isolado e em associação com a oxacilina. No controle, é possível observar células íntegras, com a morfologia preservada e com aspecto uniforme na parede celular, sem a presença de alterações estruturais (Figura 10A). Em contraste, observa-se que tratamento com o anlodipino 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 10B) causou danos na parede celular bacteriana, evidenciando o um provável extravasamento de material intracelular. Danos similares foram observados no tratamento das células com oxacilina 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 10C). Em relação à associação do anlodipino 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e da oxacilina 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, é possível observar que o dano celular se apresentou de forma mais intensa, não somente com o extravasamento de material intracelular, mas também perda total da estrutura celular (Figura 10D).

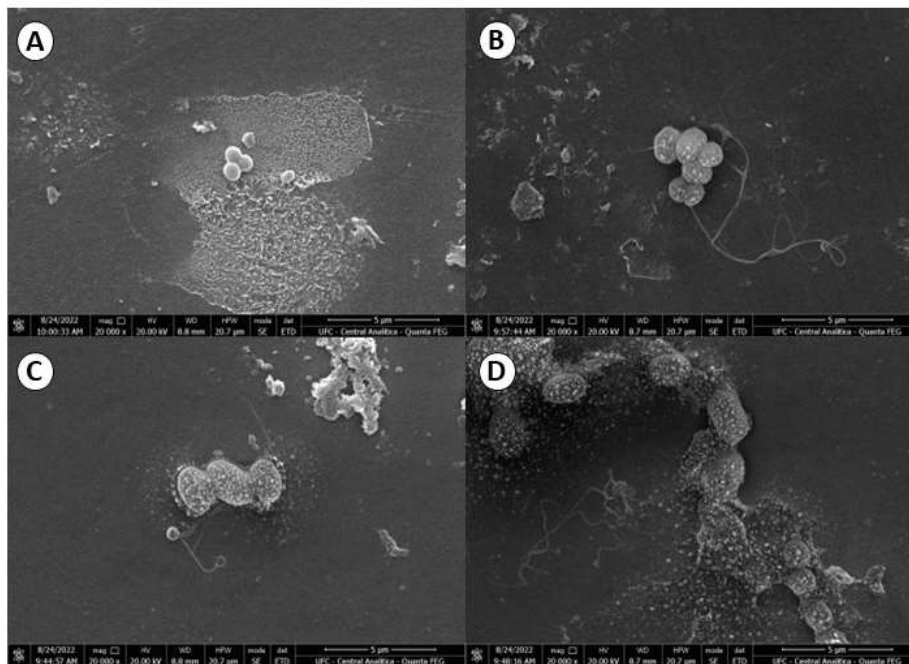


Figura 10. Imagens obtidas pela MEV de células representativas de *S. aureus* mostrando o efeito da ANL isolado e em combinação com oxacilina. (A) Controle mostrando células com morfologia preservada. (B) Células de *S. aureus* tratadas com 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ANL exibindo provável extravasamento de material intracelular. (C) Células de *S. aureus* tratadas com 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OXA também apresentando extravasamento de material intracelular. (D) Associação de ANL (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e OXA (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) exibindo extravasamento de material intracelular e perda da morfologia da célula bacteriana.

6.2 Atividade do anlodipino frente aos biofilmes em formação e formados

6.2.1 Atividade frente biofilmes em formação

O ANL apresentou atividade frente aos biofilmes em formação, com significância estatística ($p < 0,05$) encontrada a partir de 2 x CIM para as cepas SASM 1 e SARM 2, com viabilidade celular equivalentes a 91,32% e 94,41%, respectivamente. Já para as cepas SARM 1 e SARM 6, os valores foram equivalentes à 4 x CIM, com viabilidade de 38,15% e 41,96% e 8 x CIM, com viabilidade de 9,47% e 7,07%. No geral, as concentrações equivalentes à 8 x CIM inibiram em mais de 90% a atividade metabólica dos biofilmes em formação. Quando avaliamos a associação entre ANL e OXA, é possível perceber que houve uma redução significativa do metabolismo das células em todos os casos, com viabilidade celular para as cepas SASM 1, SARM 1, SARM 2 e SARM 6 equivalentes à 49,69%, 10,98%, 7,95% e 13,84% respectivamente (Figura 11).

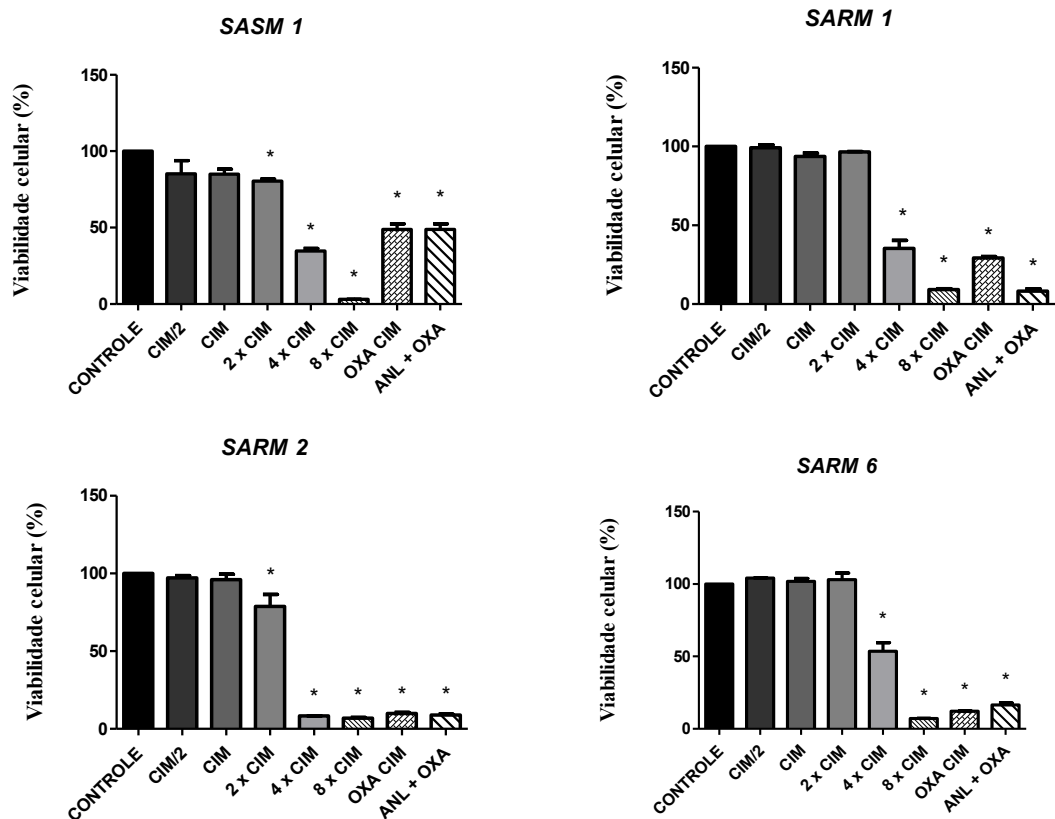


Figura 11. Atividade antimicrobiana do ANL contra biofilmes em formação de cepas clínicas de SARM e SASM analisadas pelo ensaio da redução do MTT. As cepas selecionadas foram expostas ao ANL em CIM/2, CIM/, 2x CIM, 4x CIM, e 8x CIM, com valores equivalentes a 32, 64, 128, 256, e 512 $\mu\text{g/mL}$ para SASM 1 e SARM 6, e valores de 64, 128, 512 e 1024 $\mu\text{g/mL}$ para SARM 1 e SARM 2 A combinação ANL + OXA foi testada

a 64 µg/mL + 2 µg/mL (SASM 1), 128 µg/mL + 256 µg/mL (SARM 1 e SARM 2), 64 µg/mL + 64 µg/mL (SARM 6). OXA foi testado em CIM, equivalente a 2 µg/mL (SASM 1), 256 µg/mL (SARM 1 e SARM 2), e 64 µg/mL (SARM 6) * $p < 0,05$ em comparação com o controle por ANOVA seguido de teste de Tukey.

6.2.2 Atividade frente biofilmes formados

O ANL apresentou atividade frente biofilmes formados de *S. aureus* nas cinco concentrações utilizadas nos ensaios, incluindo valores subinibitórios. com a viabilidade celular reduzida a 62,87%, 42,85%, 56,84% e 74,74% nas cepas SASM 1, SARM 1, SARM 2 e SARM 6, respectivamente. Já concentração equivalente a 8 x CIM reduziu em mais de 90% a atividade metabólica das células do biofilme em todas as cepas avaliadas tendo os valores de viabilidade celular equivalentes a 5,78%, 6,89%, 7,42% e 8,98%, na mesma ordem de cepas anteriormente citada.

A combinação entre ANL e OXA em seus respectivos CIMs (Tabela 3) também apresentou um efeito significativo frente aos biofilmes maduros, com uma maior redução da atividade metabólica quando comparada à oxacilina isolada, como pode ser observado na Figura 12. A associação entre os fármacos resultou em valores de viabilidade correspondentes a 25,31%, 19,29%, 25,03% e 8,38% nas cepas SASM 1, SARM 1, SARM 2 e SARM 6.

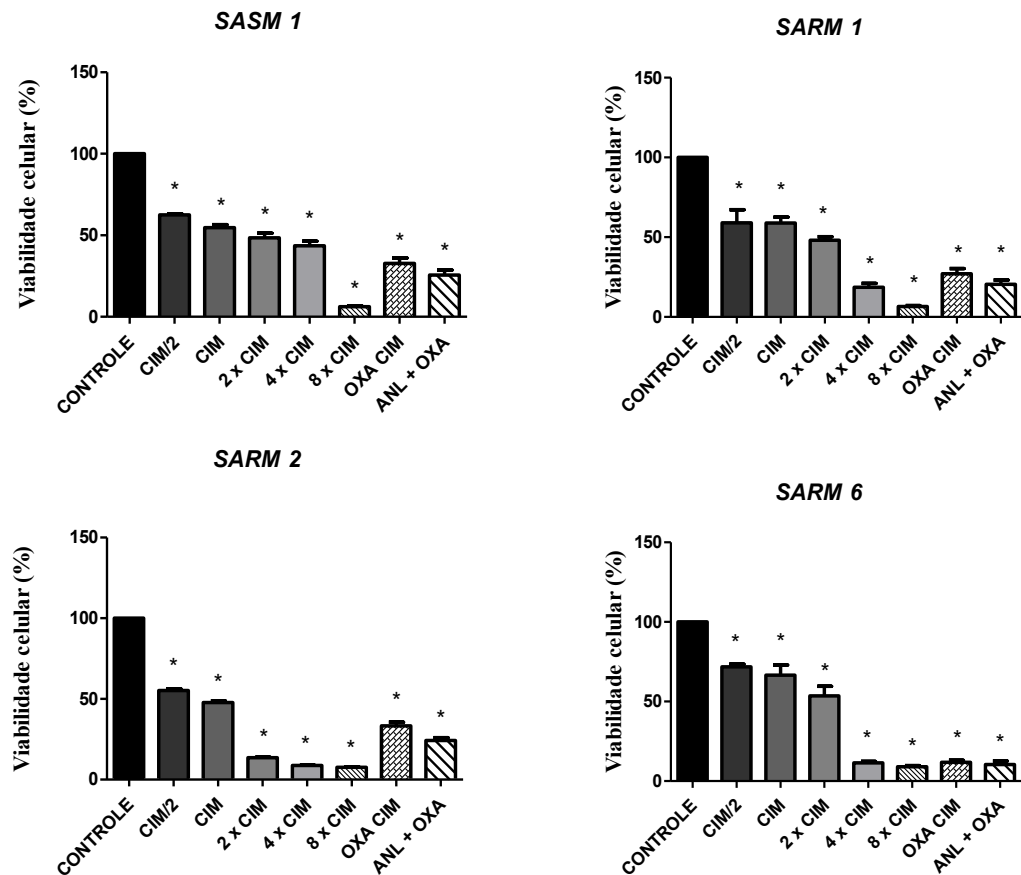


Figura 12. Atividade antimicrobiana do ANL contra biofilmes formados de cepas clínicas de SARM e SASM analisadas pelo ensaio da redução do MTT. As cepas selecionadas foram expostas ao ANL em CIM/2, CIM/, 2x CIM, 4x CIM, e 8x CIM, com valores equivalentes a 32, 64, 128, 256, e 512 $\mu\text{g/mL}$ para SASM 1 e SARM 6, e valores de 64, 128, 512 e 1024 $\mu\text{g/mL}$ para SARM 1 e SARM 2. A combinação ANL + OXA foi testada a 64 $\mu\text{g/mL}$ + 2 $\mu\text{g/mL}$ (SASM 1), 128 $\mu\text{g/mL}$ + 256 $\mu\text{g/mL}$ (SARM 1 e SARM 2), 64 $\mu\text{g/mL}$ + 64 $\mu\text{g/mL}$ (SARM 6). OXA foi testado em CIM, equivalente a 2 $\mu\text{g/mL}$ (SASM 1), 256 $\mu\text{g/mL}$ (SARM 1 e SARM 2), e 64 $\mu\text{g/mL}$ (SARM 6) * $p < 0,05$ em comparação com o controle por ANOVA seguido de teste de Tukey.

6.3 Avaliação do possível mecanismo de ação do anlodipino frente *S. aureus*

6.3.1 A integridade de membrana bacteriana é afetada pelo ANL

Observando os resultados expostos na Figura 13, nota-se que o ANL isolado na CIM e em 2 x CIM foi capaz de reduzir a viabilidade celular bacteriana em níveis equivalentes à $42,21 \pm 6,55\%$ e $55,79 \pm 4,13\%$, respectivamente, quando comparados ao controle. A OXA isolada no CIM (256 $\mu\text{g/mL}$), equivalente a $59,31 \pm 7,00$. A VAN apresentou dano equivalente a $69,37 \pm 4,99\%$

A associação ANL + OXA em seus CIMs em combinação (16 $\mu\text{g/mL}$ e 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), apresentou uma redução de $63,90 \pm 3,43\%$. Já a associação entre o ANL e a

OXA em suas CIM isoladas (128 µg/mL e 256 µg/mL, respectivamente), causou $75,02 \pm 4,23\%$ de redução da viabilidade celular, mais intensa do que a causada pela oxacilina, vancomicina e anlodipino isolados.

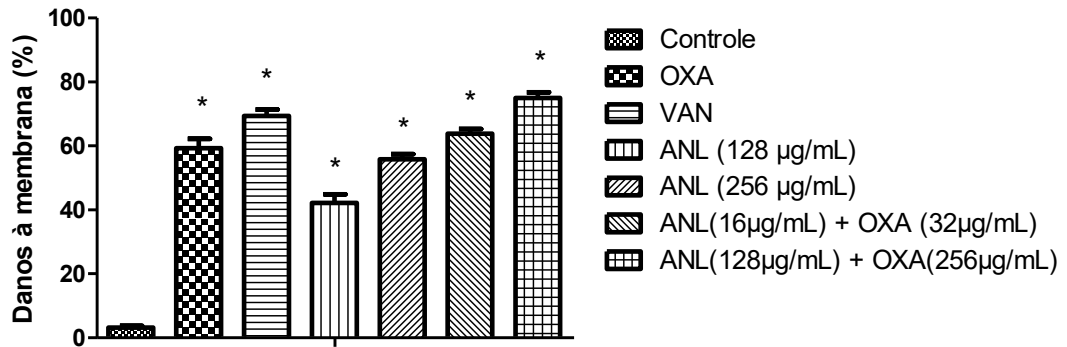


Figura 13. Avaliação da viabilidade celular da cepa SARM 2 causada pelos fármacos utilizados no estudo. O CAMHB foi utilizado como controle para células viáveis. A vancomicina (VAN) foi utilizada como controle de morte. * $p < 0,05$ em comparação com o controle por ANOVA, seguido do teste Newman-Keuls. Oxa: Oxacilina. ANL: Anlodipino.

6.3.2 Avaliação de danos ao DNA

A partir do ensaio do TUNEL, foi possível observar que o ANL foi capaz de causar fragmentação no DNA da cepa em estudo. De forma isolada, o ANL gerou $36,94 \pm 7,15\%$ e $49,45 \pm 6,31\%$ de células TUNEL-positivas em CIM (128 µg/mL) e 2x CIM (256 µg/mL), respectivamente. A OXA apresentou $53,15 \pm 4,04\%$ de células TUNEL-positivas, enquanto a VAN essa porcentagem foi de $62,90 \pm 5,68\%$.

A associação ANL + OXA nas CIMs em combinação (16 µg/mL e 32 µg/mL) também foi capaz de causar danos ao material genético em $54,37 \pm 2,50\%$ do grupo avaliado, enquanto a associação ANL + OXA utilizando os CIMs isolados (128 µg/mL e 256 µg/mL) causou $67,69 \pm 5,09\%$ de células TUNEL-positivas, maior porcentagem quando compara-se todas as drogas utilizadas isoladamente no teste (Figura 14).

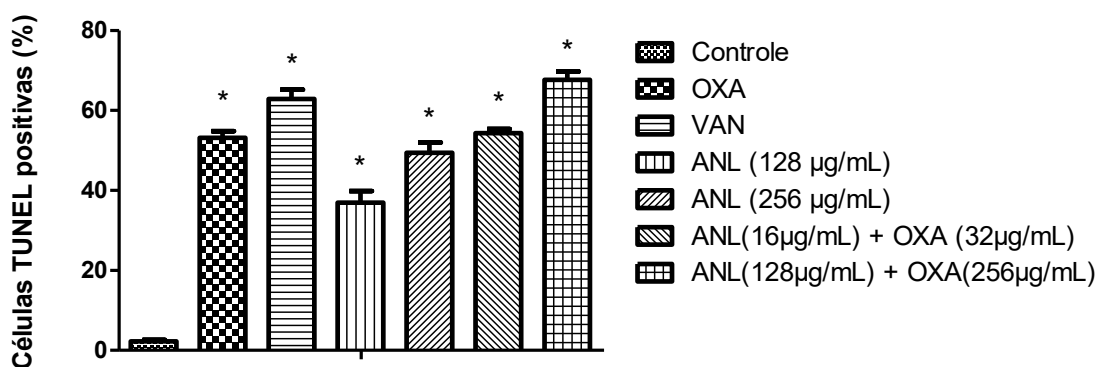


Figura 14. Avaliação do número de células TUNEL positivas da cepa SARM 2 causada pelos fármacos utilizados no estudo. O CAMHB foi utilizado como controle para células viáveis. A vancomicina (VAN) foi utilizada como controle de morte. * $p < 0,05$ em comparação com o controle por ANOVA, seguido do teste Newman-Keuls. Oxa: Oxacilina. ANL: Anlodipino.

6.3.4 Molecular docking

O mecanismo de ação do anlodipino contra receptores SARM foi avaliado *in silico* por meio de simulações de *molecular docking*, em que entre os onze complexos receptor-ligante formados, destacamos dois complexos (Figura 15) que apresentaram maiores valores para energia de afinidade, formados entre o anlodipino e os receptores *S. aureus gyrase complex with DNA*^c (-7.9 kcal/mol) e *S. aureus gyrase*^d (-7.1 kcal/mol) (Tabela 4). Os complexos apresentaram valores RMSD de 1.112 e 1.611 Å respectivamente, evidenciando que estão dentro do padrão de idealidade, que é até 2.0 Å. Na Tabela 3 também é possível observar as constantes de inibição dos complexos formados com variação de valores K_i de 1.62×10^{-6} a 1.30×10^{-4} . Por meio do K_i calculado foi determinado o valor de pK_i dos complexos, em que obtivemos valores pK_i com variação de 3.88 a 5.79.

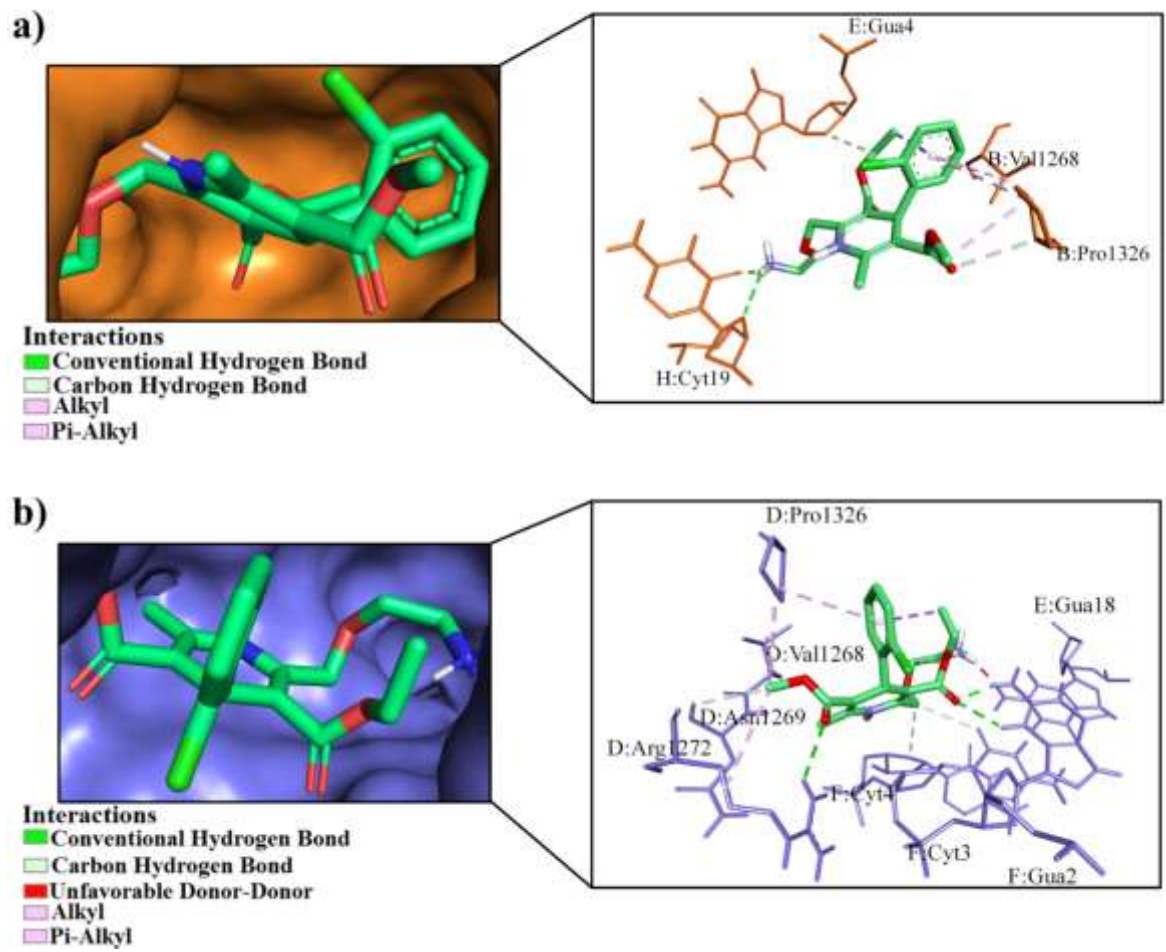


Figura 15. Interações dos complexos formados entre o anlodipino e os alvos *S. aureus* gyrase complex with DNA (a) e *S. aureus* gyrase (b).

Tabela 4. Valores de energia de afinidade, RMSD, Ki e pKi dos complexos formados.

Receptor	Energia (kcal/mol)	Ki	pKi	RMSD (Å)
<i>S. aureus</i> FtsA ^a	-6.5	1.72 x 10 ⁻⁵	4.76	1.569
Wild-type <i>S. aureus</i> DHFR ^b	-5.3	1.30 x 10 ⁻⁴	3.88	1.518
<i>S. aureus</i> gyrase complex with DNA ^c	-7.9	1.62 x 10 ⁻⁶	5.79	1.112
<i>S. aureus</i> gyrase ^d	-7.1	6.26 x 10 ⁻⁶	5.20	1.611
DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') ^e	-5.7	6.65 x 10 ⁻⁵	4.18	1.991
C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase ^f	-6.5	1.72 x 10 ⁻⁵	4.76	1.420
MtlD ^g	-6.3	2.41 x 10 ⁻⁵	4.62	1.875
Panton-Valentine Leucocidin S Component ^h	-6.0	4.00 x 10 ⁻⁵	4.40	1.475
<i>S. aureus</i> alpha hemolysin ⁱ	-6.5	1.72 x 10 ⁻⁵	4.76	1.634
Acyl-PBP2a ^j	-6.3	2.41 x 10 ⁻⁵	4.62	1.815
<i>S. aureus</i> TyrRS ^k	-5.4	1.10 x 10 ⁻⁴	3.96	1425

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 of *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 of *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: 1JIJ

As interações moleculares dos complexos formados foram descritas na Tabela 5, onde se pode observar que o complexo anlodipino - *S. aureus* FtsA apresentou sete interações hidrofóbicas com os resíduos Pro128D (3.56 e 5.20 Å), Ala371D (4.27 Å), Phe372D (3.62 Å), Leu375D (4.03, 4.99 e 5.31 Å), cinco H-Bonds envolvendo os resíduos Pro128D (3.50 Å), Ile129D (3.50 Å), Tyr187D (3.48 Å) Lys198D (2.26 Å), Gly220D (2.46 Å), uma Salt Bridge com Glu221D (2.19 Å) e uma Unfavorable Donor-Donor com o resíduo Lys198D (1.99 Å).

O complexo anlodipino - Wild-type *S. aureus* DHFR é formado predominantemente por H-Bonds envolvendo os resíduos Asn26A (2.30 e 3.46 Å), His30A (2.28 Å), Gly139A (3.29 Å) Lys140A (2.13 Å), o complexo também apresentou duas interações hidrofóbicas com His30A (4.66 Å), Lys33A (4.49 Å) e uma Unfavorable Positive-Positive com Lys140A (5.08 Å).

O complexo anlodipino - *S. aureus gyrase complex with DNA* é formado por sete interações, sendo três hidrofóbicas com os resíduos Val1268B (5.08 Å), Pro1326B (3.94 e 4.24 Å) e quatro H-Bonds com Pro1326B (3.34 Å), Gua4E (3.70 Å), Cyt19H (2.72 e 3.58 Å). O complexo anlodipino - *S. aureus gyrase* é formado por dez interações, sendo quatro hidrofóbicas com Val1268D (4.63 Å), Arg1272D (4.27 Å), Pro1326D (4.09 e 4.25 Å), cinco H-Bonds com Asn1269D (3.42 Å), Arg1272D (2.92 Å), Gua2F (4.88 Å), Cyt3F (3.43 Å), Cyt4F (3.57 Å) e uma *Unfavorable Donor-Donor* com Gua18E (1.84 Å).

O complexo anlodipino - DNA (5'-D (*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') é formado predominantemente por H-Bonds envolvendo os resíduos Cyt3A (2.36 e 2.41 Å), Gua4A (2.12, 2.57 e 2.58 Å), Ade6A (3.75 Å), Gua22B (2.74 Å), Cyt23B (2.63 Å), o complexo também apresentou uma interação hidrofóbica com Ade5A (5.01 Å), duas π -Cation com Gua4A (4.34 e 4.43 Å) e uma *Unfavorable Donor-Donor* com Gua22B (2.56 Å).

O complexo anlodipino - C (30) *carotenoid dehydrosqualene synthase* é formado por duas interações hidrofóbicas com His18A (4.47 Å), Val53A (4.98 Å), seis H-Bonds envolvendo os resíduos His18A (3.72 Å), Arg45A (5.88 Å), Asp48A (3.69 Å), Arg171A (2.75 Å), Asn179A (2.98 Å), Arg265A (5.40 Å), uma *Attractive Charge* com Asp114A (4.49 Å), três *Salt Bridge; Attractive Charge* com Asp48A (2.07 Å) Asp52A (2.54 e 2.69 Å) e uma *Metal-Acceptor* com MG453A (2.47 Å).

O complexo anlodipino - MtlD é formado por cinco interações hidrofóbicas com Ile152A (4.25 Å), His208A (4.66 e 4.77 Å), Val281A (5.07 e 5.14 Å), cinco H-Bonds com Asn119A (2.33 Å), Val149A (2.95 Å), Asp150A (3.70 Å), Arg280A (2.04 e 2.46 Å), uma π -Cation com Arg280A (4.08 Å) e uma *Attractive Charge* com Asp150A (5.04 Å).

O complexo anlodipino - *Panton-Valentine Leucocidin S Component* é formado predominantemente por H-Bonds envolvendo os resíduos Leu91B (2.52 e 3.00 Å), Ile92C (3.79 Å), Tyr94B (2.45 Å), Ser128D (4.09 Å), Gln149B (2.08 e 2.79 Å), o complexo também apresentou três interações hidrofóbicas com Tyr41C (5.39 Å) e Ile92C (3.70 e 4.87 Å).

O complexo anlodipino - *S. aureus alpha hemolysin* é formado predominantemente por interações hidrofóbicas com Ile14A (4.59 Å), Val20A (3.61 e 3.66 Å), Ile43A (4.67, 4.97 e 5.42 Å), Val54A (5.00 Å), Tyr118A (5.34 Å), Val124A (3.67 Å), Ile142A (5.28 Å), três H-Bonds com Ser41A (2.35 e 3.55 Å), His144A (2.03 Å) e uma interação *Unfavorable Positive-Positive* com Arg56A (5.53 Å).

O complexo anlodipino - *Acyl-PBP2a* é formado por cinco interações hidrofóbicas com Val217A (5.12 Å), Lys219A (4.49 Å), Pro370A (4.08 e 5.39 Å), Tyr373A (5.30 Å), seis H-

Bonds com Glu189A (3.33 Å), Lys215A (2.59 Å), Lys218A (2.43 Å), Lys219A (1.83 Å), Tyr223A (2.32 Å), Gly374A (3.53 Å), uma π -*Cation* com Phe227A (4.47 Å) e uma *Salt Bridge; Attractive Charge* com Glu189A (2.57 Å). O complexo anlodipino - *S. aureus TyrRS* é formado por cinco *H-Bonds* com Lys305A (2.26 e 3.66 Å), Phe306A (2.24, 2.47 e 3.56 Å), uma π - π *Stacked* Phe273A (4.71 Å) e uma π - π *T-shaped* com Phe306A (4.84 Å).

Tabela 5. Interações entre anlodipino e os receptores SARM. (continua)

Receptor	Resíduo	Interação	Distância (Å)
<i>S. aureus</i> FtsA ^a	Pro128D	Hidrofóbica	3.56
	Pro128D	Hidrofóbica	5.20
	Ala371D	Hidrofóbica	4.27
	Phe372D	Hidrofóbica	3.62
	Leu375D	Hidrofóbica	4.03
	Leu375D	Hidrofóbica	4.99
	Leu375D	Hidrofóbica	5.31
	Pro128D	Ligação de Hidrogênio	3.50
	Ile129D	Ligação de Hidrogênio	3.50
	Tyr187D	Ligação de Hidrogênio	3.48
	Lys198D	Ligação de Hidrogênio	2.26
	Gly220D	Ligação de Hidrogênio	2.46
	Glu221D	<i>Salt Bridge</i>	2.19
Lys198D	<i>Unfavorable Donor-Donor</i>	1.99	
Wild-type <i>S. aureus</i> DHFR ^b	His30A	Hidrofóbica	4.66
	Lys33A	Hidrofóbica	4.49
	Asn26A	Ligação de Hidrogênio	2.30
	Asn26A	Ligação de Hidrogênio	3.46
	His30A	Ligação de Hidrogênio	2.28
	Gly139A	Ligação de Hidrogênio	3.29
	Lys140A	Ligação de Hidrogênio	2.13
	Lys140A	<i>Unfavorable Positive-Positive</i>	5.08

Tabela 5. Interações entre anlodipino e os receptores SARM. (continua)

Receptor	Resíduo	Interação	Distância (Å)	
<i>S. aureus</i> gyrase complex with DNA ^c	Val1268B	Hidrofóbica	5.08	
	Pro1326B	Hidrofóbica	3.94	
	Pro1326B	Hidrofóbica	4.24	
	Pro1326B	Ligação de Hidrogênio	3.34	
	Gua4E	Ligação de Hidrogênio	3.70	
	Cyt19H	Ligação de Hidrogênio	2.72	
	Cyt19H	Ligação de Hidrogênio	3.58	
<i>S. aureus</i> gyrase ^d	Val1268	Hidrofóbica	4.63	
	D			
	Arg1272	Hidrofóbica	4.27	
	D			
	Pro1326D	Hidrofóbica	4.09	
	Pro1326D	Hidrofóbica	4.25	
	Asn1269	Ligação de Hidrogênio	3.42	
	D			
	Arg1272	Ligação de Hidrogênio	2.92	
	D			
	Gua2F	Ligação de Hidrogênio	4.88	
	Cyt3F	Ligação de Hidrogênio	3.43	
	Cyt4F	Ligação de Hidrogênio	3.57	
	Gua18E	<i>Unfavorable Donor-Donor</i>	1.84	
	DNA (5'- D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP* TP *CP*GP*CP*G)-3') ^e	Ade5A	Hidrofóbica	5.01
		Cyt3A	Ligação de Hidrogênio	2.36
	Cyt3A	Ligação de Hidrogênio	2.41	
	Gua4A	Ligação de Hidrogênio	2.12	
	Gua4A	Ligação de Hidrogênio	2.57	
	Gua4A	Ligação de Hidrogênio	2.58	
	Ade6A	Ligação de Hidrogênio	3.75	

Tabela 5. Interações entre anlodipino e os receptores SARM. (continua)

Receptor	Resíduo	Interação	Distância (Å)
C (30) carotenoid dehydro-squalene synthase ^f	Gua22B	Ligação de Hidrogênio	2.74
	Cyt23B	Ligação de Hidrogênio	2.63
	Gua4A	π -Cation	4.34
	Gua4A	π -Cation	4.43
	Gua22B	<i>Unfavorable Donor-Donor</i>	2.56
	His18A	Hidrofóbica	4.47
	Val53A	Hidrofóbica	4.98
	His18A	Ligação de Hidrogênio	3.72
	Arg45A	Ligação de Hidrogênio	5.88
	Asp48A	Ligação de Hidrogênio	3.69
	Arg171A	Ligação de Hidrogênio	2.75
	Asn179A	Ligação de Hidrogênio	2.98
	Arg265A	Ligação de Hidrogênio	5.40
	Asp114A	<i>Attractive Charge</i>	4.49
	Asp48A	<i>Salt Bridge; Attractive Charge</i>	2.07
	Asp52A	<i>Salt Bridge; Attractive Charge</i>	2.54
	Asp52A	<i>Salt Bridge; Attractive Charge</i>	2.69
MtlD ^g	MG453A	<i>Metal-Acceptor</i>	2.47
	Ile152A	Hidrofóbica	4.25
	His208A	Hidrofóbica	4.66
	His208A	Hidrofóbica	4.77
	Val281A	Hidrofóbica	5.07
	Val281A	Hidrofóbica	5.14
	Asn119A	Ligação de Hidrogênio	2.33
	Val149A	Ligação de Hidrogênio	2.95
	Asp150A	Ligação de Hidrogênio	3.70
	Arg280A	Ligação de Hidrogênio	2.04

Tabela 5. Interações entre anlodipino e os receptores SARM. (continua)

Receptor	Resíduo	Interação	Distância (Å)
Panton-Valentine Leucocidin S Component ^h	Arg280A	Ligação de Hidrogênio	2.46
	Arg280A	π -Cation	4.08
	Asp150A	<i>Attractive Charge</i>	5.04
	Tyr41C	Hidrofóbica	5.39
	Ile92C	Hidrofóbica	3.70
	Ile92C	Hidrofóbica	4.87
	Leu91B	Ligação de Hidrogênio	2.52
	Leu91B	Ligação de Hidrogênio	3.00
	Ile92C	Ligação de Hidrogênio	3.79
	Tyr94B	Ligação de Hidrogênio	2.45
<i>S. aureus</i> alpha hemolysin ⁱ	Ser128D	Ligação de Hidrogênio	4.09
	Gln149B	Ligação de Hidrogênio	2.08
	Gln149B	Ligação de Hidrogênio	2.79
	Ile14A	Hidrofóbica	4.59
	Val20A	Hidrofóbica	3.61
	Val20A	Hidrofóbica	3.66
	Ile43A	Hidrofóbica	4.67
	Ile43A	Hidrofóbica	4.97
	Ile43A	Hidrofóbica	5.42
	Val54A	Hidrofóbica	5.00
	Tyr118A	Hidrofóbica	5.34
	Val124A	Hidrofóbica	3.67
	Ile142A	Hidrofóbica	5.28
	Ser41A	Ligação de Hidrogênio	2.35
	Ser41A	Ligação de Hidrogênio	3.55
His144A	Ligação de Hidrogênio	2.03	
Arg56A	<i>Unfavorable Positive- Positive</i>	5.53	
Acyl-PBP2a ^j	Val217A	Hidrofóbica	5.12
	Lys219A	Hidrofóbica	4.49

Tabela 5. Interações entre anlodipino e os receptores SARM. (conclusão)

Receptor	Resíduo	Interação	Distância (Å)
	Pro370A	Hidrofóbica	4.08
	Pro370A	Hidrofóbica	5.39
	Tyr373A	Hidrofóbica	5.30
	Glu189A	Ligação de Hidrogênio	3.33
	Lys215A	Ligação de Hidrogênio	2.59
	Lys218A	Ligação de Hidrogênio	2.43
	Lys219A	Ligação de Hidrogênio	1.83
	Tyr223A	Ligação de Hidrogênio	2.32
	Gly374A	Ligação de Hidrogênio	3.53
	Phe227A	π - Cation	4.47
	Glu189A	<i>Salt Bridge; Attractive Charge</i>	2.57
<i>S. aureus</i> TyrRS ^k	Lys305A	Ligação de Hidrogênio	2.26
	Lys305A	Ligação de Hidrogênio	3.66
	Phe306A	Ligação de Hidrogênio	2.24
	Phe306A	Ligação de Hidrogênio	2.47
	Phe306A	Ligação de Hidrogênio	3.56
	Phe273A	π - π Stacked	4.71
	Phe306A	π - π T-shaped	4.84

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 dehydroqualene 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: 1JIJ

7 DISCUSSÃO

A resistência bacteriana é um problema global que ameaça a eficácia dos antimicrobianos comercialmente disponíveis. O desenvolvimento de novas moléculas antimicrobianas é um processo caro e demorado (BERDIGALIYEV; ALJOFAN, 2020) e, portanto, outras alternativas podem ser pensadas para que haja o aumento no arsenal terapêutico disponível para o tratamento de infecções bacterianas, sendo uma dessas alternativas o reposicionamento de fármacos. O anlodipino é um fármaco inibidor de canais de cálcio que possui características farmacocinéticas interessantes, como a boa biodisponibilidade, absorção e efeito de longa duração (VAN ZWIETEN, 1994) e que apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas testadas neste estudo.

Os ensaios de sensibilidade realizados neste estudo mostraram que o anlodipino exerceu atividade inibitória nas cepas de *S. aureus* nas concentrações entre 64 e 128 µg/ mL, Tal achado corrobora com estudos que também utilizaram cepas clínicas de SARM, que apresentaram a CIM equivalente a 64 µg/ mL (BOYD et al., 2021). Outros estudos que avaliaram a atividade isolada do anlodipino mostram concentrações inibitórias mínimas equivalentes a 32 até 64 µg/ mL frente a cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SILVEIRA COELHO et al., 2018). Outras cepas padrão de *S. aureus*, a NCTC 6571 e a NCTC 8530, tiveram seu crescimento inibido pelo anlodipino na concentração de 25 µg/ mL (KUMAR et al, 2003).

No que se refere ao nível de tolerância do anlodipino por *S. aureus*, no presente estudo, foi visto que o fármaco exerce atividade bactericida em concentrações entre 64 a 256 µg/ mL, semelhante ao encontrado por Boyd et al (2021), cujos valores de CBM que variaram entre 64 e 128 µg/ mL. Além disso, a atividade bactericida frente *S. aureus* do anlodipino havia sido anteriormente descrita por Kumar et al (2003), por meio da avaliação da curva de morte, na qual o anlodipino foi capaz de inibir o crescimento da bactéria em um período de duas horas.

A interação do anlodipino com antimicrobianos é discutida em poucos estudos disponíveis na literatura, não havendo análises que mostrem sua atividade associado com a oxacilina frente *S. aureus*, até o momento. Entretanto, o anlodipino já foi descrito como um fármaco que apresenta efeito aditivo e sinérgico quando associado com carbapenêmicos e cefalosporinas (WANG et al., 2020; YI, 2019). A interação farmacológica favorável entre o anlodipino e β-lactâmicos encontrada na literatura também pôde ser observada no presente estudo, com interações dos tipos sinérgica e aditiva entre o anlodipino e a oxacilina. Esse efeito pode ser observado pela MEV, na qual foi evidenciada um dano mais intenso nas células quando o anlodipino e a oxacilina estavam em combinação.

A interação do anlodipino com aminoglicosídeos também pode ser encontrada na literatura. A associação do anlodipino e da estreptomicina mostrou interações do tipo sinérgica frente cepas de *S. aureus* NCTC 8530 e *S. aureus* NCTC 8532, e em outras cepas como *Bacillus pumilus* NCTC 8241, *Bacillus licheniformis* NCTC 10341, *Salmonella typhimurium* NCTC 74, *Shigella dysenteriae* 7 NCTC 519/66 e *Shigella boydii* 8 NCTC 254/66. Esta associação também foi testada *in vivo*, em camundongos infectados com *S. typhimurium*, onde os resultados sugeriam que a associação anlodipino e estreptomicina foi altamente sinérgica (ASOK KUMAR et al., 2004). Tendo em vista que os resultados obtidos *in vitro* também puderam ser observados em modelos animais, nosso estudo serve como fundamento para futuros estudos similares para a avaliação *in vivo* que envolvam a interação farmacológica entre o anlodipino e a oxacilina, ou outros fármacos β -lactâmicos.

Além da atividade em células planctônicas, o anlodipino também apresentou atividade frente biofilmes formados e em formação, com redução maior que 90% quando utilizadas concentrações equivalentes a 8x CIM, e redução de 50% quando tratados com concentrações equivalentes à 2x e 4x a CIM. Devido à complexidade estrutural, é normal que sejam necessárias concentrações maiores de droga para debelar biofilmes maduros, chegando a apresentar concentrações inibitórias de dez a mil vezes maior quando comparados aos valores da concentração inibitória em células planctônicas de acordo com a literatura (OYAMA et al., 2016). O anlodipino mostrou-se eficaz frente a biofilmes em concentrações menores que dez vezes a CIM, além de manter sua eficácia quando associado à oxacilina. Até então, a atividade antibiofilme do anlodipino somente havia sido mostrada frente cepas de *Candida* spp. (GUPTA et al., 2016).

Em relação à atividade em biofilmes bacterianos, o estudo de Elkhatib *et al* (2009) mostrou que o anlodipino apresenta efeito sinérgico com a levofloxacina frente biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. Tais observações, somados aos resultados obtidos no presente estudo, mostram que o anlodipino é um fármaco com potencial atividade frente biofilmes de diferentes espécies microbianas, isolado ou em associação com um antimicrobiano clássico. (ELKHATIB; HAYNES; NOREDDIN, 2009)

No que se refere ao possível mecanismo de ação do anlodipino frente *S. aureus*, observamos sua intensa ação na parede bacteriana, membrana celular e até no DNA. Tais mecanismos são pouco elucidados. Na literatura, encontra-se que o mecanismo de ação do anlodipino frente a *S. aureus* está associado com inibição de β -lactamases (YI, 2019). Sabe-se que a resistência do SARM a todos os β -lactâmicos acontece por dois mecanismos distintos: a produção de PBP2a, transpeptidase resistente à inibição por β -lactâmicos, e a produção de β -

lactamases, que hidrolisam o anel β -lactâmico (LADE; KIM, 2021). Acerca deste fato, a inibição das β -lactamases pode vir a ser um dos fatores que auxiliem no mecanismo sinérgico entre o anlodipino e β -lactâmicos, como foi discutido anteriormente. Deve-se observar, porém, que a meticilina e a oxacilina são β -lactâmicos estruturalmente modificados para serem resistentes à β -lactamase que é produzida pela maioria dos *S. aureus* (HE et al., 2016).

Outro mecanismo de ação atribuído ao anlodipino, no que diz respeito ao efeito antiparasitário deste, é a redução do consumo de oxigênio. Tal redução aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio, que levam à perda do potencial de membrana mitocondrial e liberação de citocromo c no citoplasma (MAZUMDAR; ASOK KUMAR; DUTTA, 2010). O citocromo c desempenha um papel vital na cadeia de transporte de elétrons, além de desempenhar um papel fundamental na apoptose, agindo como uma molécula de sinalização quando é liberada para o citosol durante o estresse celular, tendo como efeito final a morte celular (KALPAGE et al., 2019).

Os ensaios por citometria de fluxo realizados revelaram que o anlodipino é capaz de causar danos na membrana celular bacteriana, estrutura que apresenta similaridades com as mitocôndrias (PALLEN, 2011), especialmente no que se refere à produção de energia por reações de oxidação e redução. Nesse sentido, é possível que o dano causado pelo anlodipino na membrana bacteriana esteja associado à perda de potencial da membrana por conta do aumento de espécies reativas de oxigênio. Importante observar também que o dano na membrana é mais acentuado quando o anlodipino e a oxacilina estão em combinação.

Outro importante mecanismo de ação do anlodipino frente *S. aureus* observado no presente estudo é o dano ao DNA. Não são encontrados na literatura dados sobre a ação do anlodipino no DNA bacteriano, entretanto, a partir do ensaio do TUNEL, observamos que o anlodipino é capaz de causar a fragmentação do DNA de *S. aureus*. Tal fragmentação ocorreu com maior intensidade quando o anlodipino e a oxacilina estavam associados

De forma complementar à análise da fragmentação de DNA, a análise por *molecular docking* mostrou que as principais interações do anlodipino com o *S. aureus* ocorreu nos receptores *S. aureus* gyrase complex with DNA e com a *S. aureus* gyrase. A DNA girase é uma topoisomerase, e todas as topoisomerases tem a função de relaxar a fita de DNA, porém apenas a girase pode produzir o efeito de superenrolamento negativo (BUSH et al., 2020), crucial para vários processos associados ao DNA, como replicação e transcrição (BATES; MAXWELL, 2005). A inibição da DNA girase, e por consequência inibição da replicação do DNA, configura em um dos mecanismos de ação dos fármacos antibacterianos da classe das quinolonas (LEVINE; HIASA; MARIANS, 1998).

As quinolonas são fármacos que podem ser utilizados em infecções estafilocócicas causadas por cepas resistentes a meticilina. Alguns dos casos são as infecções de ossos (osteomielite), articulações e infecção de articulação protética (TONG et al., 2015).

O anlodipino formou complexos com a *S. aureus* gyrase complex with DNA ao se ligar aos resíduos Val1268B, Pro1326B, Pro1326B, Gua4E, Cyt19H, e no caso do complexo formando entre o anlodipino e a *S. aureus* gyrase, as ligações ocorreram nos resíduos Val1268D, Arg1272D, Pro1326D, Asn1269D, Arg1272D, Gua2F, Cyt3F, Cyt4F e Gua18E. As quinolonas ligam-se à girase por interações que incluem os resíduos Ser-83, Asp-87, Ser-80 e Glu-84, sendo que a substituição destes resíduos está associada à resistência à essa classe antimicrobiana (FÀBREGA et al., 2009).

Observa-se, por tanto, que os resíduos que formam complexos com anlodipino são diferentes dos resíduos que sofrem alterações nos casos de resistência as quinolonas, sugerindo que o anlodipino possa apresentar efeito antibacteriano mesmo nos casos de resistência às quinolonas. Além disso, a ligação em sítios diferentes pode permitir que o anlodipino aja de forma sinérgica com os antimicrobianos desta classe, como já foi observado na interação do anlodipino com o levofloxacino frente *Pseudomonas aeruginosa* (ELKHATIB; HAYNES; NOREDDIN, 2013).

As quinolonas são fármacos bactericidas (HEIZMANN; HEIZMANN, 2007), que podem causar uma morte lenta ou rápida, sendo este processo dose dependente. A primeira etapa do efeito letal das quinolonas é a ligação da droga a um complexo de clivagem da topoisomerase. Os complexos de clivagem contêm o DNA dividido que não pode ser novamente ligado pela mesma topoisomerase, se a enzima estiver ligada à droga. (BUSH et al., 2020). Este processo leva à morte celular, podendo ser acelerado pela presença de espécies reativas de oxigênio, capaz de causar mais quebras ao DNA (HONG et al., 2020). Conforme discutido anteriormente, é sabido que o anlodipino é capaz de causar a morte celular dentro de algumas horas (KUMAR et al, 2003).

Correlacionando o exposto com os mecanismos encontrados e discutidos no presente estudo, é possível presumir que o anlodipino é um fármaco com alguns possíveis mecanismos de ação antimicrobiano. A inibição da β -lactamase, a possível produção de EROs, com base nos danos observados na membrana celular, a fragmentação do DNA, somada à ligação com a DNA girase, mostra o quão deletéria a exposição do *S. aureus* ao anlodipino pode ser.

8 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de novos antimicrobianos é de fundamental importância diante do cenário de resistência crescente enfrentando na atualidade. O anlodipino, inibidor de canais de cálcio utilizado no tratamento de hipertensão, apresentou potencial para o reposicionamento tendo em vista sua potente ação antimicrobiana. Sua atividade isolada e em combinação com a oxacilina resultou na inibição considerável do crescimento de *S. aureus* na sua forma de células planctônicas e de biofilme, além de apresentar importantes mecanismos de ação que explicam o efeito bactericida desta droga.

A elucidação dos mecanismos de ação do anlodipino frente *S. aureus*, bem como suas aplicações clínicas no contexto do tratamento de infecções bacterianas, ainda necessitam de mais estudos futuros, incluindo ensaios *in vivo*. Entretanto, os mecanismos aqui discutidos mostram que esta droga pode apresentar diversos efeitos capazes de levar à morte celular bacteriana. Por tanto, diante do exposto, o anlodipino é um fármaco com considerável potencial antimicrobiano, podendo vir a ser uma adição às opções terapêuticas no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

2022 SPECIAL REPORT: COVID-19 U.S. Impact on Antimicrobial Resistance. [S. l.], [s.d.]. DOI: 10.15620/cdc:117915. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.15620/cdc:117915>. Acesso em: 24 out. 2022.

AHMAD-MANSOUR, Nour; LOUBET, Paul; POUGET, Cassandra; DUNYACH-REMY, Catherine; SOTTO, Albert; LAVIGNE, Jean Philippe; MOLLE, Virginie. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. **Toxins**, [S. l.], v. 13, n. 10, 2021. DOI: 10.3390/TOXINS13100677. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34678970/>. Acesso em: 10 out. 2022.

ALAV, Ilyas; SUTTON, J. Mark; RAHMAN, Khondaker Miraz. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 73, n. 8, p. 2003–2020, 2018. DOI: 10.1093/jac/dky042. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/73/8/2003/4913710>. Acesso em: 30 jan. 2021.

Amlodipine: a cardiovascular drug with powerful antimicrobial property - PubMed. [s.d.]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14743981/>. Acesso em: 7 ago. 2022.

ANDRADE, Mariana Moreira; LUIZ, Wilson Barros; DA SILVA OLIVEIRA SOUZA, Rayane; AMORIM, Jaime Henrique. The History of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, [S. l.], v. 2020, 2020. DOI: 10.1155/2020/1721936.

ANDRADE NETO, João Batista De et al. Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 155, p. 104892, 2021. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.104892.

ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States. [S. l.], 2013. Acesso em: 10 out. 2022.

“**Antimicrobial Resistance : Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations** / the Review on Antimicrobial Resistance Chaired by Jim O’Neill.” Wellcome Collection, <https://wellcomecollection.org/works/rdpck35v>. Acessado 21 de janeiro de 2022.

ARZANLOU, Mohsen; CHAI, Wern Chern; VENTER, Henrietta. **Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria.** (Henrietta Venter, Org.) **Essays in Biochemistry** Portland Press Ltd, , 2017. DOI: 10.1042/EBC20160063. Disponível em: <https://portlandpress.com/essaysbiochem/article/61/1/49/78496/Intrinsic-adaptive-and-acquired-antimicrobial>. Acesso em: 30 jan. 2021.

ASHBURN, Ted T.; THOR, Karl B. **Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs.** **Nature Reviews Drug Discovery** Nature Publishing Group, , 2004. DOI: 10.1038/nrd1468. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrd1468>. Acesso em: 17 jan. 2021.

ASOK KUMAR, Kuppusamy; MAZUMDAR, Kaushiki; DUTTA, Noton Kumar; KARAK, Prithviraj; DASTIDAR, Sujata Ghosh; RAY, Raja. Evaluation of synergism between the aminoglycoside antibiotic streptomycin and the cardiovascular agent amlodipine. **Biological &**

pharmaceutical bulletin, [S. l.], v. 27, n. 7, p. 1116–1120, 2004. DOI: 10.1248/BPB.27.1116. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15256751/>. Acesso em: 13 out. 2022.

BADE, Tahseen S.; EBRAHIMI, Hossein Pasha; ALSALIM, Tahseen A.; TITINCHI, Salam J. J.; ABBO, Hanna S.; BOLANDNAZAR, Zeinab; EBRAHIMI, Amirpasha. A novel series of 1, 4-Dihydropyridine (DHP) derivatives bearing thiazolidin-4-one: From synthesis to structure. **Journal of Molecular Structure**, [S. l.], v. 1138, p. 136–148, 2017. DOI: 10.1016/J.MOLSTRUC.2017.03.005. Acesso em: 12 out. 2022.

BATISTA DE ANDRADE NETO, João et al. A mechanistic approach to the in-vitro resistance modulating effects of fluoxetine against meticillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial pathogenesis**, [S. l.], v. 127, p. 335–340, 2019. DOI: 10.1016/J.MICPATH.2018.11.056. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30529514/>. Acesso em: 1 mar. 2022.

BAX, Benjamin D. et al. Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. **Nature**, [S. l.], v. 466, n. 7309, p. 935–940, 2010. DOI: 10.1038/nature09197.

BERDIGALIYEV, Nurken; ALJOFAN, Mohamad. An overview of drug discovery and development. **Future medicinal chemistry**, [S. l.], v. 12, n. 10, p. 939–947, 2020. DOI: 10.4155/FMC-2019-0307. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32270704/>. Acesso em: 1 ago. 2022.

BIDELL, Monique R.; PATEL, Nimish J.; O'DONNELL, Nicholas. Optimal treatment of MSSA bacteraemias: a meta-analysis of cefazolin versus antistaphylococcal penicillins. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [S. l.], v. 73, n. 10, p. 2643–2651, 2018. DOI: 10.1093/JAC/DKY259. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30085140/>. Acesso em: 27 nov. 2022.

BIOVIA, Dassault Systèmes. **Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego. Dassault Systèmes**, 2016.

Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14 — Português (Brasil). 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/boletim-seguranca-do-paciente/boletim-de-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-no-14-avaliacao-dos-indicadores-nacionais-das-infeccoes-relacionadas-a-assistencia-a-saude-iras-e-resistencia.pdf/view>. Acesso em: 24 nov. 2022.

BOYD, Natalie K.; LEE, Grace C.; TENG, Chengwen; FREI, Christopher R. In vitro activity of non-antibiotic drugs against *Staphylococcus aureus* clinical strains. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [S. l.], v. 27, p. 167–171, 2021. DOI: 10.1016/J.JGAR.2021.09.003. Acesso em: 10 mar. 2022.

BRADY, Rebecca A.; MOCCA, Christopher P.; PLAUT, Roger D.; TAKEDA, Kazuyo; BURNS, Drusilla L. Comparison of the immune response during acute and chronic *Staphylococcus aureus* infection. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 3, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0195342.

BRAMBILLA, Lara Z. S.; ENDO, Eliana H.; CORTEZ, Diógenes A. G.; FILHO, Benedito P. Dias. Anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA of neolignans and

extract of *Piper regnellii*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 112–117, 2017. DOI: 10.1016/J.BJP.2016.08.008. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rbfar/a/g4GVVH9kJs36KMvfgRD63hf/abstract/?lang=en>. Acesso em: 1 mar. 2022.

BROWN, Nicholas M.; BROWN, Nicholas M.; GOODMAN, Anna L.; HORNER, Carolyne; JENKINS, Abi; BROWN, Erwin M. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): updated guidelines from the UK. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [S. l.], v. 76, n. 6, p. 1377–1378, 2021. DOI: 10.1093/JAC/DKAB036. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33582806/>. Acesso em: 25 nov. 2022.

BULSARA, Kishen G.; CASSAGNOL, Manouchkathé. **Amlodipine**. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519508/>. Acesso em: 27 fev. 2021.

BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, [S. l.], v. 6, n. 8, 2016. DOI: 10.1101/CSHPERSPECT.A025247. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27329032/>. Acesso em: 27 nov. 2022.

BUSH, Natassja G.; DIEZ-SANTOS, Isabel; ABBOTT, Lauren R.; MAXWELL, Anthony. Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 23, 2020. DOI: 10.3390/MOLECULES25235662. Disponível em: </pmc/articles/PMC7730664/>. Acesso em: 13 out. 2022.

BYRD, Allyson L.; BELKAID, Yasmine; SEGRE, Julia A. The human skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 143–155, 2018. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.157. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.157>. Acesso em: 23 fev. 2021.

CABALLERO, Armando R.; FOLETTI, Davide L.; BIERDEMAN, Michael A.; TANG, Aihua; ARANA, Angela M.; HASA-MORENO, Adela; SANGALANG, Emma Ruth B.; O'CALLAGHAN, Richard J. Effectiveness of Alpha-toxin Fab Monoclonal Antibody Therapy in Limiting the Pathology of *Staphylococcus aureus* Keratitis. **Ocular Immunology and Inflammation**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 297–303, 2015. DOI: 10.3109/09273948.2014.920035.

CHALMERS, Sarah J.; WYLAM, Mark E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection and treatment options. *Em: Methods in Molecular Biology*. [s.l.] : Humana Press Inc., 2020. v. 2069p. 229–251. DOI: 10.1007/978-1-4939-9849-4_16. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-9849-4_16. Acesso em: 6 jan. 2021.

CHEESMAN, Matthew J.; ILANKO, Aishwarya; BLONK, Baxter; COCK, Ian E. Developing New Antimicrobial Therapies: Are Synergistic Combinations of Plant Extracts/Compounds with Conventional Antibiotics the Solution? **Pharmacognosy Reviews**, [S. l.], v. 11, n. 22, p. 57, 2017. DOI: 10.4103/PHREV.PHREV_21_17. Disponível em: </pmc/articles/PMC5628525/>. Acesso em: 10 out. 2022.

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

CHEUNG, Gordon Y. C.; BAE, Justin S.; OTTO, Michael. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 547, 2021. a. DOI:

10.1080/21505594.2021.1878688. Disponível em: </pmc/articles/PMC7872022/>. Acesso em: 9 out. 2022.

CHEUNG, Gordon Y. C.; BAE, Justin S.; OTTO, Michael. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 547, 2021. b. DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688. Disponível em: </pmc/articles/PMC7872022/>. Acesso em: 10 out. 2022.

CHOU, Ting Chao. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological reviews**, [S. l.], v. 58, n. 3, p. 621–681, 2006. DOI: 10.1124/PR.58.3.10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16968952/>. Acesso em: 1 mar. 2022.

CHRISTAKI, Eirini; MARCOU, Markella; TOFARIDES, Andreas. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 26–40, 2020. a. DOI: 10.1007/s00239-019-09914-3. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00239-019-09914-3>. Acesso em: 5 mar. 2021.

CHRISTAKI, Eirini; MARCOU, Markella; TOFARIDES, Andreas. **Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence**. **Journal of Molecular Evolution** Springer, , 2020. b. DOI: 10.1007/s00239-019-09914-3.

COSTA, E. M.; SILVA, S.; MADUREIRA, A. R.; CARDELLE-COBAS, A.; TAVARIA, F. K.; PINTADO, M. M. A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. **Carbohydrate polymers**, [S. l.], v. 101, n. 1, p. 1081–1086, 2014. DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2013.09.041. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24299877/>. Acesso em: 1 mar. 2022.

COX, Georgina; WRIGHT, Gerard D. **Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions**. **International Journal of Medical Microbiology**, 2013. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.02.009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422113000246>. Acesso em: 30 jan. 2021.

CRANDALL, Hillary et al. Clinical and molecular epidemiology of invasive *Staphylococcus aureus* infection in Utah children; continued dominance of MSSA over MRSA. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 9, p. e0238991, 2020. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0238991. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0238991>. Acesso em: 24 nov. 2022.

CSIZMADIA, Péter. **MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web**. , 2019.

DADASHI, Masoud; HAJIKHANI, Bahareh; DARBAN-SAROKHALIL, Davood; VAN BELKUM, Alex; GOUDARZI, Mehdi. Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [S. l.], v. 20, p. 238–247, 2020. DOI: 10.1016/J.JGAR.2019.07.032. Acesso em: 25 nov. 2022.

DAS, Balaram; MANDAL, Debasis; DASH, Sandeep Kumar; CHATTOPADHYAY, Sourav; TRIPATHY, Satyajit; DOLAI, Durga Pada; DEY, Sankar Kumar; ROY, Somenath. Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage-Associated Antibacterial Activity Against Clinically Isolated Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Infectious diseases**, [S.

l.], v. 9, p. IDRT.S31741, 2016. DOI: 10.4137/IDRT.S31741. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26917967/>. Acesso em: 1 mar. 2022.

DE ABREU, Vinicius A. C.; PERDIGÃO, José; ALMEIDA, Sintia. Metagenomic Approaches to Analyze Antimicrobial Resistance: An Overview. **Revista Espanola de Quimioterapia**, [*S. l.*], v. 11, p. 575592, 2020. DOI: 10.3389/fgene.2020.575592. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33537056>. Acesso em: 25 nov. 2022.

DE OLIVEIRA, David M. P.; FORDE, Brian M.; KIDD, Timothy J.; HARRIS, Patrick N. A.; SCHEMBRI, Mark A.; BEATSON, Scott A.; PATERSON, David L.; WALKER, Mark J. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical microbiology reviews**, [*S. l.*], v. 33, n. 3, 2020. DOI: 10.1128/CMR.00181-19. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32404435/>. Acesso em: 15 set. 2022.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3. Schrödinger LLC**, 2020.

DIEKEMA, Daniel J.; PFALLER, Michael A.; SHORTRIDGE, Dee; ZERVOS, Marcus; JONES, Ronald N. Twenty-Year Trends in Antimicrobial Susceptibilities Among *Staphylococcus aureus* From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Open Forum Infectious Diseases**, [*S. l.*], v. 6, n. Supplement_1, p. S47–S53, 2019. DOI: 10.1093/ofid/ofy270. Disponível em: https://academic.oup.com/ofid/article/6/Supplement_1/S47/5381623. Acesso em: 27 fev. 2021.

DNA Topology - Andrew D. Bates, School of Biological Sciences Andrew D Bates, Anthony Maxwell, Head Department of Biological Chemistry Anthony Maxwell - Google Livros. [s.d.]. Disponível em: https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=WGBAGyzvQOUC&oi=fnd&pg=PR17&ots=TX7NeoCWat&sig=a9GQUrdbIj_HV-7Dp5UbWTGGYhQ&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 13 out. 2022.

DO AV SÁ, Livia G. et al. Etomidate inhibits the growth of MRSA and exhibits synergism with oxacillin. **Future microbiology**, [*S. l.*], v. 15, n. 17, p. 1611–1619, 2020. DOI: 10.2217/FMB-2020-0078. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33215536/>. Acesso em: 11 set. 2022.

DOBIE, D.; GRAY, J. Fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. **Archives of Disease in Childhood**, [*S. l.*], v. 89, n. 1, p. 74, 2004. DOI: 10.1136/ADC.2003.019695. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1755935/>. Acesso em: 25 nov. 2022.

DWYER, Daniel J.; CAMACHO, Diogo M.; KOHANSKI, Michael A.; CALLURA, Jarred M.; COLLINS, James J. Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. **Molecular cell**, [*S. l.*], v. 46, n. 5, p. 561–572, 2012. DOI: 10.1016/J.MOLCEL.2012.04.027. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22633370/>. Acesso em: 1 mar. 2022.

ELKHATIB, W. F.; HAYNES, V. L.; NOREDDIN, A. M. Microbiological appraisal of levofloxacin activity against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in combination with different calcium channel blockers in vitro. **Journal of chemotherapy (Florence, Italy)**, [*S. l.*], v. 21, n. 2, p. 135–143, 2009. DOI: 10.1179/JOC.2009.21.2.135. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19423465/>. Acesso em: 28 set. 2022.

ELKHATIB, W. F.; HAYNES, V. L.; NOREDDIN, A. M. Microbiological Appraisal of Levofloxacin Activity Against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm in Combination with Different Calcium Channel Blockers In Vitro. <http://dx.doi.org/10.1179/joc.2009.21.2.135>, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 135–143, 2013. DOI: 10.1179/JOC.2009.21.2.135. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/joc.2009.21.2.135>. Acesso em: 31 ago. 2022.

ESCOLÀ-VERGÉ, Laura; LOS-ARCOS, Ibai; ALMIRANTE, Benito. New antibiotics for the treatment of infections by multidrug-resistant microorganisms. **Medicina Clinica**, [S. l.], v. 154, n. 9, p. 351–357, 2020. DOI: 10.1016/J.MEDCLI.2019.11.002. Acesso em: 1 mar. 2022.

FÀBREGA, Anna; MADURGA, Sergi; GIRALT, Ernest; VILA, Jordi. Mechanism of action of and resistance to quinolones. **Microbial biotechnology**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 40, 2009. DOI: 10.1111/J.1751-7915.2008.00063.X. Disponível em: /pmc/articles/PMC3815421/. Acesso em: 29 ago. 2022.

FARHA, Maya A.; BROWN, Eric D. Drug repurposing for antimicrobial discovery. **Nature Microbiology**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 565–577, 2019. DOI: 10.1038/S41564-019-0357-1. Acesso em: 1 mar. 2022.

FIOL, Fernando de Sá Del; MATTOS FILHO, Thales Rocha De; GROppo, Francisco Carlos. Resistência bacteriana. **RBM rev. bras. med.**, [S. l.], v. 57, n. 10, p. 1129–1129, 2000. . Acesso em: 21 jan. 2021.

FISCHBACH, Michael A.; WALSH, Christopher T. Antibiotics for emerging pathogens. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 325, n. 5944, p. 1089–1093, 2009. DOI: 10.1126/SCIENCE.1176667. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19713519/>. Acesso em: 15 set. 2022.

FLOYD, James S.; PSATY, Bruce M. The potential risks of expedited approval of drugs for acute bacterial infections. **JAMA internal medicine**, [S. l.], v. 174, n. 9, p. 1436–1437, 2014. DOI: 10.1001/JAMAINTERNMED.2014.3055. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25023994/>. Acesso em: 15 set. 2022.

FOLETTI, Davide et al. Mechanism of Action and In Vivo Efficacy of a Human-Derived Antibody against *Staphylococcus aureus* alpha-Hemolysin. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 425, n. 10, p. 1641–1654, 2013. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.02.008.

FUJITA, Junso et al. Crystal structure of FtsA from *Staphylococcus aureus*. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 588, n. 10, p. 1879–1885, 2014. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.04.008.

GHASEMIAN, Abdolmajid; PEERAYEH, Shahin Najar; BAKHSHI, Bitá; MIRZAEI, Mohsen. The Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) Genes among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* from Hospitalized Children. **Iranian Journal of Pathology**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 258, 2015. Disponível em: /pmc/articles/PMC4539745/. Acesso em: 24 nov. 2022.

Global Tuberculosis Programme. [s.d.]. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports>. Acesso em: 10 out. 2022.

GROSS, M.; CRAMTON, S. E.; GÖTZ, F.; PESCHEL, A. Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. **Infection and**

Immunity, [S. l.], v. 69, n. 5, p. 3423, 2001. DOI: 10.1128/IAI.69.5.3423-3426.2001. Disponível em: /pmc/articles/PMC98303/. Acesso em: 23 nov. 2022.

GUILLET, Valérie; ROBLIN, Pierre; WERNER, Sandra; CORAIOLA, Manuela; MENESTRINA, Gianfranco; MONTEIL, Henri; PRÉVOST, Gilles; MOUREY, Lionel. Crystal structure of leucotoxin S component: new insight into the *Staphylococcal* beta-barrel pore-forming toxins. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 279, n. 39, p. 41028–41037, 2004. DOI: 10.1074/jbc.M406904200.

GUIITOR, Allison K.; WRIGHT, Gerard D. **Antimicrobial Resistance and Respiratory Infections**. ChestElsevier Inc, , 2018. DOI: 10.1016/j.chest.2018.06.019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369218309668>. Acesso em: 30 jan. 2021.

GUO, Yunlei; SONG, Guanghui; SUN, Meiling; WANG, Juan; WANG, Yi. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, [S. l.], v. 10, 2020. DOI: 10.3389/FCIMB.2020.00107. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32257966/>. Acesso em: 9 out. 2022.

GUPTA, Payal; CHANDA, Reshmi; RAI, Nishant; KATARIA, Vijay K.; KUMAR, Navin. Antihypertensive, Amlodipine Besilate Inhibits Growth and Biofilm of Human Fungal Pathogen *Candida*. **Assay and drug development technologies**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 291–297, 2016. DOI: 10.1089/ADT.2016.714. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27336942/>. Acesso em: 7 ago. 2022.

GUPTA, Varsha; DATTA, Priya. **Next-generation strategy for treating drug resistant bacteria: Antibiotic hybrids**. **Indian Journal of Medical Research**Wolters Kluwer Medknow Publications, , 2019. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_755_18.

HALE, Samuel J. M.; WAGNER MACKENZIE, Brett; LUX, Christian A.; BISWAS, Kristi; KIM, Raymond; DOUGLAS, Richard G. Topical Antibiofilm Agents With Potential Utility in the Treatment of Chronic Rhinosinusitis: A Narrative Review. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 13, 2022. DOI: 10.3389/FPHAR.2022.840323. Disponível em: /pmc/articles/PMC9234399/. Acesso em: 4 out. 2022.

HANWELL, Marcus D.; CURTIS, Donald E.; LONIE, David C.; VANDERMEERSCHD, Tim; ZUREK, Eva; HUTCHISON, Geoffrey R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, [S. l.], 2012. DOI: 10.1186/1758-2946-4-17.

HARTMAN-ADAMS, Holly; BANVARD, Christine; JUCKETT, Gregory. Impetigo: Diagnosis and treatment. **American Family Physician**, [S. l.], v. 90, n. 4, p. 229–235, 2014. DOI: 10.36290/der.2018.042.

HE, Hangyong; WUNDERINK, Richard G. *Staphylococcus aureus* Pneumonia in the Community. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 470–479, 2020. DOI: 10.1055/S-0040-1709992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32521547/>. Acesso em: 10 out. 2022.

HE, M.; SHAO, L.; LIU, Q.; LI, J.; LIN, H.; JING, L.; LI, M.; CHEN, D. Mechanism of synergy between SIPI-8294 and β -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 63, n. 1, p. 3–10, 2016. DOI:

10.1111/LAM.12583. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/lam.12583>. Acesso em: 13 out. 2022.

HEASLET, Holly; HARRIS, Melissa; FAHNOE, Kelly; SARVER, Ronald; PUTZ, Henry; CHANG, Jeanne; SUBRAMANYAM, Chakrapani; BARREIRO, Gabriela; MILLER, J. Richard. Structural comparison of chromosomal and exogenous dihydrofolate reductase from *Staphylococcus aureus* in complex with the potent inhibitor trimethoprim. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S. l.], v. 76, n. 3, p. 706–717, 2009. DOI: 10.1002/prot.22383.

HEIZMANN, Petra; HEIZMANN, Wolfgang R. Bakteriostase – Bakterizidie. **Medizinische Klinik** 2007 102:9, [S. l.], v. 102, n. 9, p. 720–726, 2007. DOI: 10.1007/S00063-007-1090-8. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00063-007-1090-8>. Acesso em: 13 out. 2022.

HOBLEY, Laura; HARKINS, Catriona; MACPHEE, Cait E.; STANLEY-WALL, Nicola R. **Giving structure to the biofilm matrix: An overview of individual strategies and emerging common themes. FEMS Microbiology Reviews** Oxford University Press, , 2015. DOI: 10.1093/femsre/fuv015.

HOLUBAR, Marisa; MENG, Lina; ALEGRIA, William; DERESINSKI, Stan. Bacteremia due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Update on New Therapeutic Approaches. **Infectious disease clinics of North America**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 849–861, 2020. DOI: 10.1016/J.IDC.2020.04.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33011050/>. Acesso em: 25 nov. 2022.

HOMA, Mónika; HEGEDUS, Kinga; FÜLÖP, Ádám; WOLFÁRT, Vanessza; KADAIKUNNAN, Shine; KHALED, Jamal M.; ALHARBI, Naiyf S.; VÁGVÖLGYI, Csaba; GALGÓCZY, László. In vitro activity of calcium channel blockers in combination with conventional antifungal agents against clinically important filamentous fungi. **Acta biologica Hungarica**, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 334–344, 2017. DOI: 10.1556/018.68.2017.3.10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28901803/>. Acesso em: 1 mar. 2022.

HONG, Yuzhi; LI, Qiming; GAO, Qiong; XIE, Jianping; HUANG, Haihui; DRLICA, Karl; ZHAO, Xilin. Reactive oxygen species play a dominant role in all pathways of rapid quinolone-mediated killing. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [S. l.], v. 75, n. 3, p. 576–585, 2020. DOI: 10.1093/JAC/DKZ485. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31793990/>. Acesso em: 13 out. 2022.

HORVÁTH, Andrea; DOBAY, Orsolya; SAHIN-TÓTH, Judit; JUHÁSZ, Emese; PONGRÁCZ, Júlia; IVÁN, Miklós; FAZAKAS, Eniko; KRISTÓF, Katalin. Characterisation of antibiotic resistance, virulence, clonality and mortality in MRSA and MSSA bloodstream infections at a tertiary-level hospital in Hungary: A 6-year retrospective study. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, [S. l.], v. 19, n. 1, 2020. DOI: 10.1186/s12941-020-00357-z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32381015/>. Acesso em: 27 fev. 2021.

HOWDEN, Benjamin P.; GRAYSON, M. Lindsay. Dumb and dumber - The potential waste of a useful antistaphylococcal agent: Emerging fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 42, n. 3, p. 394–400, 2006. DOI: 10.1086/499365/2/42-

3-394-FIG001.GIF. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/42/3/394/379125>. Acesso em: 25 nov. 2022.

HUEY, Ruth; MORRIS, Garrett M.; FORLI, Stefano. Using autodock 4 and autodock vina with autodocktools : a tutorial. *[S. l.]*, 2012.

HUGHES, Diarmaid. Selection and evolution of resistance to antimicrobial drugs. **IUBMB Life**, *[S. l.]*, v. 66, n. 8, p. 521–529, 2014. DOI: 10.1002/iub.1278. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/iub.1278>. Acesso em: 31 jan. 2021.

HUGHES, J. P.; REES, S. S.; KALINDJIAN, S. B.; PHILPOTT, K. L. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 162, n. 6, p. 1239–1249, 2011. DOI: 10.1111/J.1476-5381.2010.01127.X. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>. Acesso em: 15 set. 2022.

HUTCHINGS, Matt; TRUMAN, Andrew; WILKINSON, Barrie. Antibiotics: past, present and future. **Current opinion in microbiology**, *[S. l.]*, v. 51, p. 72–80, 2019. DOI: 10.1016/J.MIB.2019.10.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31733401/>. Acesso em: 15 set. 2022.

HWANG, Thomas J.; CARPENTER, Daniel; LAUFFENBURGER, Julie C.; WANG, Bo; FRANKLIN, Jessica M.; KESSELHEIM, Aaron S. Failure of Investigational Drugs in Late-Stage Clinical Development and Publication of Trial Results. **JAMA internal medicine**, *[S. l.]*, v. 176, n. 12, p. 1826–1833, 2016. DOI: 10.1001/JAMAINTERNMED.2016.6008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27723879/>. Acesso em: 15 set. 2022.

IMBERTY, Anne; HARDMAN, Karl D.; CARVER, Jeremy P.; PEREZ, Serge. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, *[S. l.]*, v. 1, n. 6, p. 631–642, 1991. DOI: 10.1093/glycob/1.6.631.

JORDAN, Emmanuelle; VOIDE, Cathy; PETIGNAT, Pierre-Auguste; GOBIN, Niels. Cephalosporins in clinical practice. **Revue Médicale Suisse**, *[S. l.]*, p. 14–16, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33058575/>. Acesso em: 25 nov. 2022.

JORGE, Paula; GRZYWACZ, Daria; KAMYSZ, Wojciech; LOURENÇO, Analia; PEREIRA, Maria Olívia. Searching for new strategies against biofilm infections: Colistin-AMP combinations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* single- and double-species biofilms. **PLoS ONE**, *[S. l.]*, v. 12, n. 3, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0174654. Disponível em: </pmc/articles/PMC5371341/?report=abstract>. Acesso em: 20 jan. 2021.

JOURDAN, Jean Pierre; BUREAU, Ronan; ROCHAIS, Christophe; DALLEMAGNE, Patrick. Drug repositioning: a brief overview. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 72, n. 9, p. 1145–1151, 2020. DOI: 10.1111/JPHP.13273. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jphp.13273>. Acesso em: 15 set. 2022.

KADELA-TOMANEK, Monika; JASTRZ, Maria; MARCINIEC, Krzysztof; CHROBAK, Elwira; EWA, B. Lipophilicity , Pharmacokinetic Properties , and Molecular Docking Study on SARS-CoV-2 Target for Betulin Triazole Derivatives with Attached 1 , 4-Quinone. **Pharmaceutics**, *[S. l.]*, v. 13, n. 6, p. 781, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13060781.

KALPAGE, Hasini A. et al. Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 1540, 2019. DOI: 10.1096/FJ.201801417R. Disponível em: /pmc/articles/PMC6338631/. Acesso em: 13 out. 2022.

KOURTIS, Athena P. et al. Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections — United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, [S. l.], v. 68, n. 9, p. 214, 2019. DOI: 10.15585/MMWR.MM6809E1. Disponível em: /pmc/articles/PMC6421967/. Acesso em: 18 set. 2022.

KRUSZEWSKA, Hanna; ZAREBA, Tomasz; TYSKI, Stefan. Estimation of antimicrobial activity of selected non-antibiotic products. **Acta poloniae pharmaceutica**, [S. l.], v. 63, n. 5, p. 457–460, 2006. DOI: 10.7287/peerj.preprints.1807. Disponível em: https://europepmc.org/article/med/17357616. Acesso em: 21 jan. 2021.

Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections. [s.d.]. Disponível em: https://www.who.int/news/item/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections. Acesso em: 15 set. 2022.

LADE, Harshad; KIM, Jae Seok. Bacterial Targets of Antibiotics in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics** 2021, Vol. 10, Page 398, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 398, 2021. DOI: 10.3390/ANTIBIOTICS10040398. Disponível em: https://www.mdpi.com/2079-6382/10/4/398/htm. Acesso em: 10 out. 2022.

LAKHUNDI, Sahreena; ZHANG, Kunyan. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical microbiology reviews**, [S. l.], v. 31, n. 4, 2018. DOI: 10.1128/CMR.00020-18. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30209034/. Acesso em: 1 mar. 2022.

LANGFORD, Bradley J.; SO, Miranda; RAYBARDHAN, Sumit; LEUNG, Valerie; WESTWOOD, Duncan; MACFADDEN, Derek R.; SOUCY, Jean Paul R.; DANEMAN, Nick. Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 26, n. 12, p. 1622, 2020. DOI: 10.1016/J.CMI.2020.07.016. Disponível em: /pmc/articles/PMC7832079/. Acesso em: 13 set. 2022.

LEE, Andie S.; DE LENCASTRE, Herminia; GARAU, Javier; KLUYTMANS, Jan; MALHOTRA-KUMAR, Surbhi; PESCHEL, Andreas; HARBARTH, Stephan. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers** 2018 4:1, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1–23, 2018. DOI: 10.1038/nrdp.2018.33. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nrdp201833. Acesso em: 20 jan. 2023.

LEE, Eun Young et al. Head-to-head comparison of udenafil vs amlodipine in the treatment of secondary Raynaud's phenomenon: a double-blind, randomized, cross-over study. **Rheumatology (Oxford, England)**, [S. l.], v. 53, n. 4, p. 658–664, 2014. DOI: 10.1093/RHEUMATOLOGY/KET417. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24352340/. Acesso em: 12 out. 2022.

LEE, Joon Hee. **Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population.** **Journal of Microbiology** Microbiological Society of Korea, , 2019. DOI: 10.1007/s12275-019-

0718-8. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-019-0718-8>. Acesso em: 30 jan. 2021.

LEFÈVRE, B. et al. Antistaphylococcal penicillins vs. cefazolin in the treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infective endocarditis: a quasi-experimental monocentre study. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 40, n. 12, p. 2605–2616, 2021. DOI: 10.1007/S10096-021-04313-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34383175/>. Acesso em: 27 nov. 2022.

LEVINE, Cindy; HIASA, Hiroshi; MARIANS, Kenneth J. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, [S. l.], v. 1400, n. 1–3, p. 29–43, 1998. DOI: 10.1016/S0167-4781(98)00126-2. Acesso em: 29 ago. 2022.

LEWIS, Paul O.; HEIL, Emily L.; COVERT, Kelly L.; CLUCK, David B. **Treatment strategies for persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia**. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics** Blackwell Publishing Ltd, , 2018. DOI: 10.1111/jcpt.12743.

LI, Julius; ECHEVARRIA, Kelly L.; TRAUGOTT, Kristi A. β -Lactam Therapy for Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Comparative Review of Cefazolin versus Antistaphylococcal Penicillins. **Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 346–360, 2017. a. DOI: 10.1002/PHAR.1892. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28035690/>. Acesso em: 27 nov. 2022.

LI, Julius; ECHEVARRIA, Kelly L.; TRAUGOTT, Kristi A. β -Lactam Therapy for Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Comparative Review of Cefazolin versus Antistaphylococcal Penicillins. **Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 346–360, 2017. b. DOI: 10.1002/PHAR.1892. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28035690/>. Acesso em: 27 nov. 2022.

LISTER, Jessica L.; HORSWILL, Alexander R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, [S. l.], v. 4, n. DEC, 2014. DOI: 10.3389/FCIMB.2014.00178. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25566513/>. Acesso em: 1 mar. 2022.

LIU, B. G.; YUAN, X. L.; HE, D. D.; HU, G. Z.; MIAO, Ming San; XU, Er Ping. Research progress on the oxazolidinone drug linezolid resistance. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 24, n. 18, p. 9274–9281, 2020. DOI: 10.26355/EURREV_202009_23009. Acesso em: 25 nov. 2022.

LIU, Chia-I.; LIU, George Y.; SONG, Yongcheng; YIN, Fenglin; HENSLER, Mary E.; JENG, Wen-Yih; NIZET, Victor; WANG, Andrew H. J.; OLDFIELD, Eric. A Cholesterol Biosynthesis Inhibitor Blocks *Staphylococcus aureus* Virulence. **Science**, [S. l.], v. 319, n. 5868, p. 1391–1394, 2008. DOI: 10.1126/science.1153018.

LIU, Shuyuan; HOU, Yinglong; CHEN, Xu; GAO, Yuan; LI, Hui; SUN, Shujuan. **Combination of fluconazole with non-antifungal agents: A promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery**.

International Journal of Antimicrobial Agents Elsevier B.V., , 2014. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.12.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24503221/>. Acesso em: 17 jan. 2021.

LIU, Shuyuan; YUE, Longtao; GU, Wenrui; LI, Xiuyun; ZHANG, Liuping; SUN, Shujuan. Synergistic Effect of Fluconazole and Calcium Channel Blockers against Resistant *Candida albicans*. **PloS one**, [S. l.], v. 11, n. 3, 2016. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0150859. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26986478/>. Acesso em: 1 mar. 2022.

LIVERMORE, David M. Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [S. l.], v. 51 Suppl 2, n. SUPPL. 2, 2003. DOI: 10.1093/JAC/DKG249. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12730138/>. Acesso em: 25 nov. 2022.

M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition. [S. l.], 2015. Disponível em: www.clsi.org. Acesso em: 1 mar. 2022.

MACHOWSKA, Anna; LUNDBORG, Cecilia Stålsby. **Drivers of irrational use of antibiotics in Europe. International Journal of Environmental Research and Public Health** MDPI AG, , 2019. DOI: 10.3390/ijerph16010027.

MAMA, Olouwafemi Mistourath et al. Penicillin susceptibility among invasive MSSA infections: a multicentre study in 16 Spanish hospitals. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [S. l.], v. 76, n. 10, p. 2519–2527, 2021. DOI: 10.1093/JAC/DKAB208. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34245259/>. Acesso em: 28 fev. 2022.

MARINHO, Emanuelle Machado; BATISTA DE ANDRADE NETO, João; SILVA, Jacilene; ROCHA DA SILVA, Cecília; CAVALCANTI, Bruno Coelho; MARINHO, Emmanuel Silva; NOBRE JÚNIOR, Hélio Vitoriano. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 148, p. 104365, 2020. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104365.

MAZUMDAR, K.; ASOK KUMAR, K.; DUTTA, N. K. **Potential role of the cardiovascular non-antibiotic (helper compound) amlodipine in the treatment of microbial infections: Scope and hope for the future. International Journal of Antimicrobial Agents** Elsevier, , 2010. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.05.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857910002037?via%3Dihub>. Acesso em: 11 mar. 2021.

MCGUINNESS, Will A.; MALACHOWA, Natalia; DELEO, Frank R. Focus: Infectious Diseases: Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, [S. l.], v. 90, n. 2, p. 269, 2017. DOI: 10.1201/9780849340574-15. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5482303/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34245259/). Acesso em: 25 nov. 2022.

MEHRAJ, Jaishri; WITTE, Wolfgang; AKMATOV, Manas K.; LAYER, Franziska; WERNER, Guido; KRAUSE, Gérard. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. **Current topics in microbiology and immunology**, [S. l.], v. 398, p. 55–87, 2016. DOI: 10.1007/82_2016_497. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27370344/>. Acesso em: 9 out. 2022.

MERCORELLI, Beatrice; PALÙ, Giorgio; LOREGIAN, Arianna. Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases: How Far Are We? **Trends in microbiology**, [S. l.], v. 26, n. 10, p. 865–876, 2018. DOI: 10.1016/J.TIM.2018.04.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29759926/>. Acesso em: 15 set. 2022.

MEYERHOFF, Andrea. U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 42–48, 1999. DOI: 10.1086/515085. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10028069/>. Acesso em: 12 out. 2022.

MILLS, Scott D. When will the genomics investment pay off for antibacterial discovery? **Biochemical pharmacology**, [S. l.], v. 71, n. 7, p. 1096–1102, 2006. DOI: 10.1016/J.BCP.2005.11.025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16387281/>. Acesso em: 15 set. 2022.

MISHRA, Abhinav Prasoan; BAJPAI, Ankit; RAI, Awani Kumar. 1,4-Dihydropyridine: A Dependable Heterocyclic Ring with the Promising and the Most Anticipable Therapeutic Effects. **Mini reviews in medicinal chemistry**, [S. l.], v. 19, n. 15, p. 1219–1254, 2019. DOI: 10.2174/1389557519666190425184749. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31735158/>. Acesso em: 12 out. 2022.

MITO, Asako et al. Safety of Amlodipine in Early Pregnancy. **Journal of the American Heart Association**, [S. l.], v. 8, n. 15, 2019. DOI: 10.1161/JAHA.119.012093. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.119.012093>. Acesso em: 18 jan. 2021.

MONACO, Monica; PIMENTEL DE ARAUJO, Fernanda; CRUCIANI, Melania; COCCIA, Eliana M.; PANTOSTI, Annalisa. Worldwide Epidemiology and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus*. **Current topics in microbiology and immunology**, [S. l.], v. 409, p. 21–56, 2017. DOI: 10.1007/82_2016_3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27025380/>. Acesso em: 18 set. 2022.

MORRONI, Gianluca et al. High Rate of Ceftobiprole Resistance among Clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from a Hospital in Central Italy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [S. l.], v. 62, n. 12, 2018. DOI: 10.1128/AAC.01663-18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30275082/>. Acesso em: 25 nov. 2022.

MÜHLBERG, Eric; UMSTÄTTER, Florian; KLEIST, Christian; DOMHAN, Cornelius; MIER, Walter; UHL, Philipp. Renaissance of vancomycin: Approaches for breaking antibiotic resistance in multidrug-resistant bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 11–16, 2020. DOI: 10.1139/CJM-2019-0309/ASSET/IMAGES/CJM-2019-0309TAB1.GIF. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/cjm-2019-0309>. Acesso em: 25 nov. 2022.

MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 4, n. 2, 2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. Disponível em: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>. Acesso em: 30 jan. 2021.

NASSER, Ahmad; DALLAL, Mohammad Mehdi Soltan; JAHANBAKHSHI, Shiva; AZIMI, Taher; NIKOUEI, Leila. *Staphylococcus aureus*: Biofilm Formation and Strategies Against it.

Current pharmaceutical biotechnology, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 664–678, 2022. DOI: 10.2174/1389201022666210708171123. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34238148/>. Acesso em: 6 out. 2022.

NATHAN, Carl. **Resisting antimicrobial resistance**. **Nature Reviews Microbiology**. Nature Research, , 2020. DOI: 10.1038/s41579-020-0348-5.

NEIDLE, Stephen et al. Symmetric bis-benzimidazoles: new sequence-selective DNA-binding molecules. **Chemical Communications**, [S. l.], n. 10, p. 929–930, 1999. DOI: 10.1039/a901074b.

NETO, João B. A. et al. Antifungal Activity of Naphthoquinoidal Compounds In Vitro against Fluconazole-Resistant Strains of Different *Candida* Species: A Special Emphasis on Mechanisms of Action on *Candida tropicalis*. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. e93698, 2014. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0093698. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093698>. Acesso em: 1 mar. 2022.

NEU, H. C. Antistaphylococcal penicillins. **The Medical clinics of North America**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 51–60, 1982. DOI: 10.1016/S0025-7125(16)31441-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7038340/>. Acesso em: 27 nov. 2022.

NGUYEN, Thanh 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**, [S. l.], v. 10, n. 4, 2019. DOI: 10.1128/mBio.02660-18.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 1, 2003. DOI: 10.1093/JAC/DKG301. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12805255/>. Acesso em: 11 set. 2022.

OK, Seong Ho; SOHN, Ju Tae. **Amlodipine toxicity and lipid emulsion**. **Korean Journal of Anesthesiology** Korean Society of Anesthesiologists, , 2018. DOI: 10.4097/kja.d.18.00126. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6283707/>. Acesso em: 18 jan. 2021.

OLARTE-LUIS, Tatiana; CÁCERES-GALÍNDEZ, Dolli; CORTÉS, Jorge Alberto. [New cephalosporins]. **Revista chilena de infectología : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología**, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 465–475, 2018. DOI: 10.4067/S0716-10182018000500465. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30724992/>. Acesso em: 25 nov. 2022.

ORTWINE, Jessica K.; BHAVAN, Kavita. **Morbidity, mortality, and management of methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia in the USA: update on antibacterial choices and understanding**. **Hospital practice (1995)** Taylor & Francis, , 2018. DOI: 10.1080/21548331.2018.1435128.

OTERO, Lisandro 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**, [S. l.], v. 110, n. 42, p. 16808–16813, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1300118110.

OTTO, Michael. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual review of medicine**, [S. l.], v. 64, p. 175–188, 2013. DOI: 10.1146/ANNUREV-MED-042711-140023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22906361/>. Acesso em: 23 nov. 2022.

OYAMA, Takuto; MIYAZAKI, Motoyasu; YOSHIMURA, Michinobu; TAKATA, Tohru; OHJIMI, Hiroyuki; JIMI, Shiro. Biofilm-Forming Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Survive in Kupffer Cells and Exhibit High Virulence in Mice. **Toxins**, [S. l.], v. 8, n. 7, 2016. DOI: 10.3390/TOXINS8070198. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4963831/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31444441/). Acesso em: 7 ago. 2022.

PALIT, Partha; ALI, Nahid. Oral Therapy with Amlodipine and Lacidipine, 1,4-Dihydropyridine Derivatives Showing Activity against Experimental Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 374–377, 2008. DOI: 10.1128/AAC.00522-07. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17954702/>. Acesso em: 12 out. 2022.

PALLEN, Mark J. Time to recognise that mitochondria are bacteria? **Trends in Microbiology**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 58–64, 2011. DOI: 10.1016/J.TIM.2010.11.001. Acesso em: 31 ago. 2022.

PATEL, Tapan; TIETZE, David; MEHTA, Ankit N. Amlodipine Overdose. **Baylor University Medical Center Proceedings**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 410–411, 2013. DOI: 10.1080/08998280.2013.11929022. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3777093/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24144441/). Acesso em: 18 jan. 2021.

PENA; G, RODRIGUES; A, KOBAYASHI; G, VIEIRA; G, SADOYAMA. PERFIL DE RESISTÊNCIA DOS *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE SANGUE E CATETER. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, [S. l.], v. 10, n. 19, 2014. Disponível em: <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/2558>. Acesso em: 18 set. 2022.

PERCIVAL, Steven L.; VUOTTO, Claudia; DONELLI, Gianfranco; LIPSKY, Benjamin A. Biofilms and wounds: An identification algorithm and potential treatment options. **Advances in Wound Care**, [S. l.], v. 4, n. 7, p. 389–397, 2015. DOI: 10.1089/wound.2014.0574.

PEREIRA-FRANCHI, Eliane Patricia Lino; BARREIRA, Maria Rachel Nogueira; DA COSTA, Natália de Sousa Lima Moreira; RIBOLI, Danilo Flávio Moraes; ABRAÃO, Ligia Maria; MARTINS, Katheryne Benini; VICTÓRIA, Cassiano; CUNHA, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza Da. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Brazilian primary health care system. **Tropical Medicine & International Health**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 339–347, 2019. DOI: 10.1111/TMI.13192. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tmi.13192>. Acesso em: 24 nov. 2022.

PÉREZ-CRESPO, Pedro María Martínez; CORTÉS, Luis Eduardo López. Ceftobiprole: a clinical view. **Revista Española de Quimioterapia**, [S. l.], v. 34, n. Suppl1, p. 32, 2021. DOI: 10.37201/REQ/S01.09.2021. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8683001/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34444441/). Acesso em: 25 nov. 2022.

PÉREZ-PÉREZ, Martín; JORGE, Paula; PÉREZ RODRÍGUEZ, Gael; PEREIRA, Maria Olívia; LOURENÇO, Anália. Quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: new insights through network mining. **Biofouling**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 128–142, 2017. DOI:

10.1080/08927014.2016.1272104. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28121162/>. Acesso em: 13 out. 2022.

PETTERSEN, Eric F.; GODDARD, Thomas D.; HUANG, Conrad C.; COUCH, Gregory S.; GREENBLATT, Daniel M.; MENG, Elaine C.; FERRIN, Thomas E. UCSF Chimera — A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *[S. l.]*, 2004. DOI: 10.1002/jcc.20084.

Preclinical drug development - PubMed. [s.d.]. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21229871/>. Acesso em: 15 set. 2022.

QIU, Xiayang et al. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* tyrosyl-tRNA synthetase in complex with a class of potent and specific inhibitors. **Protein Science**, *[S. l.]*, v. 10, n. 10, p. 2008–2016, 2001. DOI: 10.1110/ps.18001.

RABIN, Nira; ZHENG, Yue; OPOKU-TEMENG, Clement; DU, Yixuan; BONSU, Eric; SINTIM, Herman O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future medicinal chemistry**, *[S. l.]*, v. 7, n. 4, p. 493–512, 2015. DOI: 10.4155/FMC.15.6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25875875/>. Acesso em: 23 nov. 2022.

RASTEGAR-MOJARAD, Majid; YE, Zhan; KOLESAR, Jill M.; HEBBRING, Scott J.; LIN, Simon M. Opportunities for drug repositioning from phenome-wide association studies. **Nature biotechnology**, *[S. l.]*, v. 33, n. 4, p. 342–345, 2015. DOI: 10.1038/NBT.3183. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25850054/>. Acesso em: 15 set. 2022.

RATHER, Muzamil Ahmad; GUPTA, Kuldeep; MANDAL, Manabendra. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. **Brazilian Journal of Microbiology**, *[S. l.]*, v. 52, n. 4, p. 1701, 2021. DOI: 10.1007/S42770-021-00624-X. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8578483/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/368578483/). Acesso em: 6 out. 2022.

ROY, Sashwati et al. *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection Compromises Wound Healing by Causing Deficiencies in Granulation Tissue Collagen. **Annals of surgery**, *[S. l.]*, v. 271, n. 6, p. 1174–1185, 2020. DOI: 10.1097/SLA.0000000000003053. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30614873/>. Acesso em: 9 out. 2022.

ROZGONYI, F.; KOCSIS, E.; KRISTÓF, K.; NAGY, K. Is MRSA more virulent than MSSA? **Clinical Microbiology and Infection**, *[S. l.]*, v. 13, n. 9, p. 843–845, 2007. DOI: 10.1111/J.1469-0691.2007.01780.X. Disponível em:
<http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X14612994/fulltext>.
 Acesso em: 1 mar. 2022.

RUIZ-RIPA, Laura et al. Mechanisms of Linezolid Resistance Among Clinical *Staphylococcus* spp. in Spain: Spread of Methicillin- and Linezolid-Resistant *S. epidermidis* ST2. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, *[S. l.]*, v. 27, n. 2, p. 145–153, 2021. DOI: 10.1089/MDR.2020.0122. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32456543/>. Acesso em: 25 nov. 2022.

RYBAK, Michael J. et al. Therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A revised consensus guideline and review by the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America,

the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. **American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists**, [S. l.], v. 77, n. 11, p. 835–863, 2020. DOI: 10.1093/AJHP/ZXAA036. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32191793/>. Acesso em: 25 nov. 2022.

SCHILCHER, Katrin; HORSWILL, Alexander R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 84, n. 3, 2020. DOI: 10.1128/mmbr.00026-19.

Screening of antimicrobial metabolite yeast isolates derived biome Ceará against pathogenic bacteria, including MRSA : antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. [s.d.]. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/18741>. Acesso em: 1 mar. 2022.

SENGUPTA, Saswati; CHATTOPADHYAY, Madhab K.; GROSSART, Hans Peter. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 4, n. MAR, p. 47, 2013. DOI: 10.3389/FMICB.2013.00047/XML/NLM. Acesso em: 13 set. 2022.

SHI, Lei; GÜNTHER, Susanne; HÜBSCHMANN, Thomas; WICK, Lukas Y.; HARMS, Hauke; MÜLLER, Susann. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. **Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology**, [S. l.], v. 71, n. 8, p. 592–598, 2007. DOI: 10.1002/CYTO.A.20402. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17421025/>. Acesso em: 1 mar. 2022.

SHITYAKOV, Sergey; FÖRSTER, Carola. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 23–36, 2014. DOI: 10.2147/AABC.S63749.

SHORE, Anna C.; DEASY, Emily C.; SLICKERS, Peter; BRENNAN, Grainne; O'CONNELL, Brian; MONECKE, Stefan; EHRICHT, Ralf; COLEMAN, David C. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [S. l.], v. 55, n. 8, p. 3765–3773, 2011. DOI: 10.1128/AAC.00187-11. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21636525/>. Acesso em: 10 out. 2022.

SILVA, Filomena; FERREIRA, Susana; QUEIROZ, João A.; DOMINGUES, Fernanda C. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Journal of medical microbiology**, [S. l.], v. 60, n. Pt 10, p. 1479–1486, 2011. DOI: 10.1099/JMM.0.034157-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21862758/>. Acesso em: 1 mar. 2022.

SILVEIRA COELHO, Silvana; SERAFIN, Marissa Bolson; BOTTEGA, Angelita; FAGUNDES DA ROSA, Tacieli; FOLETTO, Vitória Segabinazzi; HÖRNER, Rosmari. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA IN VITRO DO FÁRMACO NÃO-ANTIBIÓTICO ANLODIPINO.** [s.l.: s.n.]. Disponível em:

https://guri.unipampa.edu.br/uploads/evt/arq_trabalhos/16847/seer_16847.pdf. Acesso em: 27 fev. 2021.

SIMARRO, P. P.; FRANCO, J.; DIARRA, A.; POSTIGO, J. A. Ruiz; JANNIN, J. Update on field use of the available drugs for the chemotherapy of human African trypanosomiasis. **Parasitology**, [S. l.], v. 139, n. 7, p. 842–846, 2012. DOI: 10.1017/S0031182012000169. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22309684/>. Acesso em: 12 out. 2022.

SINGH, Sheo 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**, [S. l.], v. 25, n. 9, p. 1831–1835, 2015. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.03.044.

SOLANO, Cristina; ECHEVERZ, Maite; LASA, Iñigo. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current opinion in microbiology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 96–104, 2014. DOI: 10.1016/J.MIB.2014.02.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24657330/>. Acesso em: 23 nov. 2022.

SORIANO, Alex. Ceftaroline. **Revista Española de Quimioterapia**, [S. l.], v. 34, n. Suppl1, p. 29, 2021. DOI: 10.37201/REQ/S01.08.2021. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8683014/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31899563/). Acesso em: 25 nov. 2022.

SRISUKNIMIT, Veerasak; QIAO, Yuan; SCHAEFER, Kaitlin; KAHNE, Daniel; WALKER, Suzanne. Peptidoglycan Cross-Linking Preferences of *Staphylococcus aureus* Penicillin-Binding Proteins Have Implications for Treating MRSA Infections. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 139, n. 29, p. 9791–9794, 2017. DOI: 10.1021/JACS.7B04881/SUPPL_FILE/JA7B04881_SI_001.PDF. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jacs.7b04881>. Acesso em: 10 out. 2022.

STOGIOS, Peter J.; SAVCHENKO, Alexei. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. **Protein science : a publication of the Protein Society**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 654–669, 2020. DOI: 10.1002/PRO.3819. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31899563/>. Acesso em: 25 nov. 2022.

SURESH, Maneesha K.; BISWAS, Raja; BISWAS, Lalitha. **An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms**. **International Journal of Medical Microbiology** Elsevier GmbH, , 2019. DOI: 10.1016/j.ijmm.2018.11.002.

TABUR, Suzan; OLUZ, Elif; SABUNCU, Tevfik; KORKMAZ, Hakan; ÇELIK, Hakim. The effects of calcium channel blockers on nephropathy and pigment epithelium-derived factor in the treatment of hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. **Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 177–183, 2015. DOI: 10.3109/10641963.2014.933964. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25050869/>. Acesso em: 12 out. 2022.

TACCONELLI, Evelina et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet. Infectious diseases**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29276051/>. Acesso em: 11 set. 2022.

TAYLOR, Scott D.; PALMER, Michael. The action mechanism of daptomycin. **Bioorganic & medicinal chemistry**, [S. l.], v. 24, n. 24, p. 6253–6268, 2016. DOI: 10.1016/J.BMC.2016.05.052. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27288182/>. Acesso em: 25 nov. 2022.

TONG, Steven Y. C.; DAVIS, Joshua S.; EICHENBERGER, Emily; HOLLAND, Thomas L.; FOWLER, Vance G. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 603, 2015. DOI: 10.1128/CMR.00134-14. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4451395/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26103134/). Acesso em: 9 out. 2022.

TOYOFUKU, Masanori; INABA, Tomohiro; KIYOKAWA, Tatsunori; OBANA, Nozomu; YAWATA, Yutaka; NOMURA, Nobuhiko. Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 7–12, 2016. DOI: 10.1080/09168451.2015.1058701. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26103134/>. Acesso em: 23 nov. 2022.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], 2010. DOI: 10.1002/jcc.21334.

TUCALIUC, Alexandra; BLAGA, Alexandra Cristina; GALACTION, Anca Irina; CASCAVAL, Dan. Mupirocin: applications and production. **Biotechnology letters**, [S. l.], v. 41, n. 4–5, 2019. DOI: 10.1007/S10529-019-02670-W. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30927135/>. Acesso em: 25 nov. 2022.

TURNIDGE, John. Fusidic acid pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. **International journal of antimicrobial agents**, [S. l.], v. 12 Suppl 2, n. SUPPL. 2, 1999. DOI: 10.1016/S0924-8579(98)00071-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10528784/>. Acesso em: 25 nov. 2022.

TYERS, Mike; WRIGHT, Gerard D. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. **Nature Reviews Microbiology** 2018 17:3, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 141–155, 2019. DOI: 10.1038/s41579-018-0141-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-018-0141-x>. Acesso em: 10 out. 2022.

VAN ZWIETEN, P. A. Amlodipine: an overview of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. **Clinical cardiology**, [S. l.], v. 17, n. 9 Suppl 3, p. III3-6, 1994. Disponível em: <http://europepmc.org/article/med/9156957>. Acesso em: 18 jan. 2021.

VAUGHN, Valerie M. et al. Empiric Antibacterial Therapy and Community-onset Bacterial Coinfection in Patients Hospitalized With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Multi-hospital Cohort Study. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, [S. l.], v. 72, n. 10, p. E533–E541, 2021. DOI: 10.1093/CID/CIAA1239. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32820807/>. Acesso em: 13 set. 2022.

W GODTFREDSSEN; K ROHOLT; L TYBRING. Fucidin: a new orally active antibiotic . **The Lancet**, [S. l.], 1962. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13899434/>. Acesso em: 25 nov. 2022.

WAGNER, Linda; KENREIGH, Charlotte. Amlodipine. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, [S. l.], p. 1–5, 2022. DOI: 10.1016/B978-008055232-3.61217-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519508/>. Acesso em: 12 out. 2022.

WANG, Y.; LI, X.; WANG, D.; SUN, S.; LU, C. *In vitro* interactions of ambroxol hydrochloride or amlodipine in combination with antibacterial agents against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Letters in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 70, n. 3, p. 189–195, 2020. DOI: 10.1111/lam.13259. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/lam.13259>. Acesso em: 21 jan. 2021.

WANG, Yingsong; BIAN, Zeran; WANG, Yan. Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing. **Applied microbiology and biotechnology**, [S. l.], v. 106, n. 19–20, 2022. DOI: 10.1007/S00253-022-12150-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36089638/>. Acesso em: 6 out. 2022.

WEIGELT, Maximillian A.; MCNAMARA, Stephanie A.; SANCHEZ, Daniela; HIRT, Penelope A.; KIRSNER, Robert S. Evidence-Based Review of Antibiofilm Agents for Wound Care. **Advances in wound care**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 13–23, 2021. DOI: 10.1089/WOUND.2020.1193. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32496980/>. Acesso em: 4 out. 2022.

WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. [s.d.]. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em: 1 mar. 2022.

WRIGHT, Gerard D. **Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance.** **Trends in Microbiology** Elsevier Ltd, , 2016. DOI: 10.1016/j.tim.2016.06.009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X16300725>. Acesso em: 17 jan. 2021.

XUE, Hanqing; LI, Jie; XIE, Haozhe; WANG, Yadong. Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. **International Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 1232, 2018. DOI: 10.7150/IJBS.24612. Disponível em: </pmc/articles/PMC6097480/>. Acesso em: 15 set. 2022.

YAN, Jiakai; ZHANG, Guowen; PAN, Junhui; WANG, Yajie. α -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 64, 2014. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.12.007.

YARCHOAN, Robert et al. Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex. **Lancet (London, England)**, [S. l.], v. 1, n. 8481, p. 575–580, 1986. DOI: 10.1016/S0140-6736(86)92808-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2869302/>. Acesso em: 12 out. 2022.

YI, Ziyue. Evaluation of Amlodipine Inhibition and Antimicrobial Effects. **International Journal of Pharmacy and Chemistry**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 12, 2019. DOI: 10.11648/j.ijpc.20190501.12. Disponível em: <http://www.sciencepublishinggroup.com/journal/paperinfo?journalid=330&doi=10.11648/j.ijpc.20190501.12>. Acesso em: 21 jan. 2021.

YUSUF, Dilmurat; DAVIS, Andrew M.; KLEYWEGT, Gerard J.; SCHMITT, Stefan. An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance : RSR vs RMSD. *[S. l.]*, p. 1411–1422, 2008.

ZHENG, Wei; SUN, Wei; SIMEONOV, Anton. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. **British Journal of Pharmacology**, *[S. l.]*, v. 175, n. 2, p. 181, 2018. DOI: 10.1111/BPH.13895. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5758396/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35758396/). Acesso em: 10 out. 2022.