



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 CAVALCANTE LEITÃO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA MENADIONA
ISOLADA E ASSOCIADA À OXACILINA FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus
aureus*: ANÁLISE EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME**

FORTALEZA

2023

AMANDA CAVALCANTE LEITÃO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA MENADIONA
ISOLADA E ASSOCIADA À OXACILINA FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus*:
ANÁLISE EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME

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

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

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C364 Leitão, Amanda Cavalcante.
Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana da menadiona isolada e associada à oxacilina frente a cepas de *Staphylococcus aureus*: análise em células planctônicas e biofilme / Amanda Cavalcante Leitão. – 2023.
106 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.

Coorientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

1. Menadiona. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Resistência bacteriana. 4. Reposicionamento de fármacos. 5. Biofilme. I. Título.

CDD 615.1

AMANDA CAVALCANTE LEITÃO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA MENADIONA
ISOLADA E ASSOCIADA À OXACILINA FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus*:
ANÁLISE EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME

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

Aprovada em: 13/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Prof. Dr. João Batista de Andrade Neto
Centro Universitário Christus (Unichristus)

A Deus.

Aos meus pais, Plínio e Marta.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me amparou e guiou a cada passo desta trajetória.

Aos meus pais, Plínio e Marta por serem o meu alicerce, minha fonte de amor e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Sem eles, não teria alcançado esta conquista.

Ao meu irmão Plínio Filho, pelos momentos compartilhados, por todo o carinho e por ser meu companheiro desde sempre.

Ao meu amigo Thiago, pela lealdade, compreensão e companheirismo em todas as fases desta jornada.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas, pela parceria e pelo companheirismo durante toda a trajetória de pesquisa, além de agradecer por suas importantes contribuições para o sucesso deste estudo.

À minha orientadora, profa. Dra. Cecília Rocha, por quem tenho profunda admiração, e que me orientou com excelência e paciência durante toda esta jornada. Sou grata pelo comprometimento e dedicação em me ajudar a alcançar esta conquista.

Ao meu coorientador, prof. Dr. Hélio Vitoriano, pela oportunidade de ingressar na pesquisa.

À profa. Dra. Livia Gurgel, pelas valiosas contribuições durante todo o processo e por estar sempre de prontidão para sanar minhas dúvidas e me guiar durante o percurso desse estudo.

Aos professores Dr. Bruno Coêlho e Dr. Emmanuel Marinho, pelas valiosas contribuições experimentais feitas neste trabalho.

À Central Analítica da UFC, pelos recursos disponibilizados para a realização dos ensaios experimentais.

Aos participantes da banca examinadora pela disponibilidade e contribuições no trabalho.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM/UFC) por contribuírem diretamente na minha formação acadêmica.

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

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.” (Albert Einstein).

RESUMO

Staphylococcus aureus é reconhecido como um dos principais causadores de infecções bacterianas, tendo sido responsável por mais de 1 milhão de mortes em 2019. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) emergiu como um dos patógenos mais comumente associados ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana, sendo considerado um patógeno prioritário para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Essa cepa apresenta uma taxa de mortalidade superior às cepas sensíveis à meticilina (SASM) e prolonga a duração do tratamento, gerando custos hospitalares significativos. Nesse contexto, o reposicionamento de fármacos surge como uma estratégia promissora para enfrentar o desafio crescente das infecções bacterianas resistentes aos tratamentos disponíveis. A menadiona, conhecida por suas propriedades anticoagulantes, é alvo de pesquisa nesse campo. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial da menadiona como agente antibacteriano frente a cepas de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina, investigar sua interação com a oxacilina, bem como os mecanismos de ação envolvidos e sua atividade em biofilmes. Foram realizados ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo e concentração bactericida mínima (CBM). A interação entre a menadiona e a oxacilina foi avaliada pela técnica *checkerboard*. As análises foram complementadas com microscopia eletrônica de varredura. Para investigar o mecanismo de ação, foram utilizadas citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e *docking* molecular. A menadiona mostrou atividade antibacteriana em células planctônicas nas concentrações de 2 a 32 µg/mL, com ação bacteriostática. Associada à oxacilina, demonstrou efeito aditivo de 45% e sinérgico de 25% nas cepas testadas. A menadiona apresentou atividade antibiofilme a partir de concentrações subinibitórias e mostrou eficácia em combinação com a oxacilina frente biofilmes com sensibilidade reduzida à oxacilina isolada. Seu mecanismo de ação envolve a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em estresse oxidativo e danos ao DNA. Sua interação com as enzimas DNA girase e *dehydroqualene synthase* complementa seu efeito. A presença de ácido ascórbico reverteu seus efeitos. Esses resultados evidenciam a atividade antibacteriana e antibiofilme da menadiona em cepas sensíveis e resistentes de *S. aureus*, enfatizando a importância das EROs como um fator determinante para sua ação. Esses resultados sugerem que a menadiona pode ser um candidato promissor como adjuvante no tratamento de infecções por *S. aureus*.

Palavras-chave: Menadiona; *Staphylococcus aureus*; Resistência bacteriana; Reposicionamento de fármacos; Biofilme.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is recognized as one of the main causative agents of bacterial infections, having been responsible for over 1 million deaths in 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has emerged as one of the pathogens most commonly associated with the development of antimicrobial resistance, being considered a priority pathogen for research and development of new drugs by the World Health Organization (WHO). This strain exhibits a higher mortality rate compared to methicillin-sensitive strains (MSSA) and extends the duration of treatment, resulting in significant hospital costs. In this context, drug repurposing emerges as a promising strategy to address the growing challenge of bacterial infections resistant to available treatments. Menadione, known for its anticoagulant properties, is a subject of research in this field. This study aimed to assess the potential of menadione as an antibacterial agent against both MSSA and MRSA strains, investigate its interaction with oxacillin, as well as the mechanisms of action involved, including its biofilm activity. Minimum inhibitory concentration (MIC) assays were conducted using the broth microdilution method, along with minimum bactericidal concentration (MBC) tests. The interaction between menadione and oxacillin was evaluated using the checkerboard technique. Analyses were complemented with scanning electron microscopy. Flow cytometry, fluorescence microscopy, and molecular docking were employed to investigate the mechanism of action. Menadione exhibited antibacterial activity against planktonic cells at concentrations ranging from 2 to 32 $\mu\text{g/mL}$, with a bacteriostatic effect. When combined with oxacillin, it demonstrated an additive effect of 45% and a synergistic effect of 25% against the tested strains. Menadione also displayed antibiofilm activity at subinhibitory concentrations and effectively combated biofilms with reduced sensitivity to oxacillin alone. Its mechanism of action involves the generation of reactive oxygen species (ROS), resulting in oxidative stress and DNA damage. Its interaction with DNA gyrase and dehydrosqualene synthase enzymes complements its effect. The presence of ascorbic acid reversed its effects. These results highlight the antibacterial and antibiofilm activity of menadione in both sensitive and resistant strains of *S. aureus*, emphasizing the significance of reactive oxygen species (ROS) as a determining factor for its action. These findings suggest that menadione may be a promising candidate as an adjunct in the treatment of *S. aureus* infections.

Keywords: Menadione; *Staphylococcus aureus*; Bacterial resistance; Drug repositioning; Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução da resistência bacteriana a antibióticos ao longo das últimas décadas	22
Figura 2 – Estágios de formação do biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> em superfícies bióticas ou abióticas	26
Figura 3 – Prevalência de SARM no mundo	30
Figura 4 – Evolução dos antibióticos aprovados pela FDA desde 1983	36
Figura 5 – Estrutura química da menadiona	41
Figura 6 – Fluxograma das etapas metodológicas adotadas no estudo	45
Figura 7 – Visão geral dos resultados obtidos	58
Figura 8 – Microscopia Eletrônica de Varredura de células planctônicas de SARM	66
Figura 9 – Interações dos complexos formados entre a MENA e os alvos <i>S. aureus gyrase complex with DNA</i> (a), <i>S. aureus gyrase</i> (b) e <i>C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase</i> (c)	83

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Perfil da MENA frente a biofilme formado de <i>Staphylococcus aureus</i>	69
Gráfico 2 – Perfil da MENA frente a biofilme em formação de <i>Staphylococcus aureus</i> ...	71
Gráfico 3 – Avaliação da redução da viabilidade celular em células de SARM por meio da marcação com PI	74
Gráfico 4 – Avaliação da produção de EROs em células de SARM	75
Gráfico 5 – Avaliação do índice de dano ao DNA em células de SARM através do ensaio cometa alcalino	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Cálculo do ICIF e classificação das interações entre as drogas	48
Tabela 2	– Parâmetros utilizados nas simulações de <i>docking</i> molecular	57
Tabela 3	– Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da MENA e da OXA isoladas e em combinação, e determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da MENA frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	60
Tabela 4	– Efeito antibacteriano da MENA frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> após adição de substância antioxidante (NAC)	62
Tabela 5	– Efeito antibacteriano da MENA frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> após adição de substância antioxidante (AC)	64
Tabela 6	– Valores de energia de afinidade, RMSD, Ki e pKi dos complexos formados	78
Tabela 7	– Interações entre a MENA e os receptores SARM	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,4-NQ	1,4-naftoquinona
AC	Ácido Ascórbico
Ade	Adenina
ADI	Aditivo
Ala	Alanina
ANT	Antagonismo
Asb	Albumina de soro bovino
Asn	Asparagina
Arg	Arginina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CA-SARM	SARM associado à comunidade
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CM-H ₂ DCFDA	5-(e-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína acetil éster
DCF	Diclorofluoresceína
DHFR	Diidrofolato Redutase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Gua	Guanosina
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
IND	Indiferente
Ile	Isoleucina

HA-SARM	SARM associado a hospitais
HMDS	Hexametildisilazano
Ki	Constante de inibição
LABIMAN	Laboratório de Bioprospeção de Moléculas Antimicrobianas
Leu	Leucina
Lys	Lisina
M1PDH	<i>Mannitol-1-phosphate dehydrogenase</i>
MDR	Multirresistente
MENA	Menadiona
MGEs	Elementos Genéticos Móveis
MMFF94	<i>Merck Molecular Force Field 94</i>
MOPS	Ácido Morfolinopropanosulfônico
MSCRAMMs	Componentes de Superfície Microbiana que Reconhecem Moléculas de Matriz Adesiva
NAC	N-acetilcisteína
NDP	Nucleosídeo difosfato
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA	Oxacilina
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PABA	Ácido para-aminobenzóico
PBP	Proteína de Ligação à Penicilina
PBP2a	Proteína de Ligação à Penicilina 2a
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
Phe	Fenilalanina
PI	Iodeto de Propídio
pKi	- log 10 da constante de inibição
Pro	Prolina
PS	Fosfatidilserina
PVL	<i>Panton-Valentine leucocidina</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina

SARV	<i>Staphylococcus aureus resistente à vancomicina</i>
Ser	Serina
SIN	Sinergismo
SCCmec	Cassete Cromossômico Estafilocócico mec
TyrRS	Tirosil-tRNA sintetase
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
TSST-1	Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico
Tyr	Tirosina
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
Val	Valina
VANCO	Vancomicina
VRE	Enterococos resistentes à vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Infecções bacterianas e a resistência aos antibióticos	20
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	23
2.3	Fatores de virulência	24
2.4	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (SARM)	27
2.5	Aspectos epidemiológicos das infecções por SARM	29
2.6	Terapia convencional para infecções por SARM	31
2.7	Alternativas terapêuticas	35
2.8	Potenciais alvos na pesquisa de antibacterianos contra o <i>Staphylococcus aureus</i>	38
2.9	Menadiona	40
3	HIPÓTESES	43
4	OBJETIVOS	44
4.1	Objetivo geral	44
4.2	Objetivos específicos	44
5	METODOLOGIA	45
5.1	Microrganismos	45
5.2	Drogas	46
5.3	Testes de sensibilidade	46
5.3.1	<i>Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	46
5.3.2	<i>Concentração Bactericida Mínima (CBM)</i>	47
5.3.2.1	<i>Nível de tolerância</i>	47
5.3.3	<i>Associação entre MENA e OXA</i>	47
5.3.4	<i>Associação da MENA com antioxidantes</i>	48
5.3.5	<i>Análise dos dados</i>	49
5.4	Microscopia eletrônica de varredura em células planctônicas	49
5.5	Atividade antibiofilme	50
5.5.1	<i>Avaliação da atividade da MENA isolada e associada à OXA sobre biofilmes de <i>S. aureus</i></i>	50
5.5.2	<i>Análise dos dados</i>	51

5.6	Avaliação do mecanismo de morte celular	52
5.6.1	<i>Preparo das suspensões e tratamento das células</i>	52
5.6.2	<i>Avaliação da viabilidade celular</i>	52
5.6.3	<i>Deteção de espécies reativas de oxigênio</i>	52
5.6.4	<i>Análise de dano ao DNA</i>	53
5.6.5	<i>Análise dos dados</i>	54
5.7	Docking molecular	54
5.7.1	<i>Design e otimização dos ligantes</i>	54
5.7.2	<i>Obtenção e preparação dos alvos</i>	54
5.7.3	<i>Procedimentos gerais de docking</i>	56
6	RESULTADOS	58
6.1	Atividade antibacteriana da MENA isolada frente a cepas planctônicas de <i>S. aureus</i>	59
6.2	Atividade antibacteriana da MENA associada à OXA frente a cepas planctônicas de <i>S. aureus</i>	59
6.3	Efeito bacteriostático da MENA	59
6.4	Interferência de antioxidantes na atividade antibacteriana da MENA	62
6.4.1	<i>Interferência da NAC na atividade antibacteriana da MENA</i>	62
6.4.2	<i>Interferência do AC na atividade antibacteriana da MENA</i>	63
6.5	Análise de imagens de SARM obtidas por MEV	65
6.6	Ação antibacteriana da MENA isolada e associada à OXA sobre biofilmes de <i>S. aureus</i>	68
6.6.1	<i>Redução da viabilidade celular em biofilme formado de <i>S. aureus</i></i>	68
6.6.2	<i>Redução da viabilidade celular em biofilme em formação de <i>S. aureus</i></i>	70
6.7	Mecanismos de morte celular envolvidos na ação antibacteriana da MENA	73
6.7.1	<i>Redução da viabilidade celular</i>	73
6.7.2	<i>Produção de EROs</i>	74
6.7.3	<i>Dano ao DNA</i>	76
6.8	Interação da MENA com alvos de SARM	78
7	DISCUSSÃO	84
8	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos revolucionaram a história da medicina, permitindo tratamentos eficazes para diversas infecções e aumentando a segurança em procedimentos médicos. (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019; MARSTON et al., 2016). Entretanto, logo após sua introdução na prática clínica, surgiu o desenvolvimento da resistência bacteriana como consequência do uso extensivo e indiscriminado de antibióticos, tornando-se um sério problema de saúde pública em todo o mundo (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019; LEWIS, 2020).

O tratamento de infecções bacterianas torna-se cada vez mais complexo pela capacidade das bactérias de adquirirem resistência a diversos agentes antimicrobianos (FORD; HURFORD; CASSAT, 2021; LEE et al., 2018). Infecções ocasionadas por bactérias multirresistentes (MDR) prolongam o tempo de hospitalização do paciente. Esse fato coincide com o aumento nas taxas de morbidade e mortalidade, levando a uma sobrecarga significativa nos sistemas de saúde bem como nos custos relacionados a assistência (HASSOUN; LINDEN; FRIEDMAN, 2017; PUSHPAKOM et al., 2019).

Staphylococcus aureus, devido a sua virulência intrínseca e enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro de infecções hospitalares e comunitárias (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021; IDREES et al., 2021; JENUL; HORSWILL, 2019). Sendo *S. aureus* resistente à meticilina (SARM) identificado como um dos principais patógenos associados ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana (HARKINS et al., 2017).

SARM é considerado um patógeno de prioridade alta para a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos medicamentos, visto que esse microrganismo é dado como a maior causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo de acordo com uma lista publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Essa lista busca incentivar os governos a implementar políticas de incentivo à ciência básica e a P&D avançada que invistam na descoberta de novas terapias antimicrobianas (WHO, 2017).

O desenvolvimento de novas terapias para microrganismos MDR não acompanhou a velocidade de aquisição de resistência por esses patógenos (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). É preciso um elevado número de recursos para o desenvolvimento de um novo antibiótico, incluindo custo econômico e o tempo envolvido. Logo, é de grande relevância a necessidade de mais estudos e a busca por novas estratégias que tenham como objetivo contornar essa situação, trazendo alternativas eficazes e com baixo potencial tóxico para o paciente (DUVAL; GRARE; DEMORÉ, 2019; XUE et al., 2018; ZHENG; SUN; SIMEONOV,

2018).

O reposicionamento de fármacos vem surgindo como uma abordagem alternativa para identificar novos tratamentos para doenças que carecem de tratamentos eficazes (PUSHPAKOM et al., 2019). Essa estratégia baseia-se em encontrar novas indicações terapêuticas para medicamentos já existentes, otimizando o tempo de desenvolvimento e reduzindo os custos envolvidos (DO AV SÁ et al., 2019; HOLANDA et al., 2021). Trata-se de uma estratégia de baixo risco, uma vez que os medicamentos reposicionados já passaram por todas as fases clínicas necessárias para a sua aprovação regulatória.

Consequentemente, medicamentos reposicionados têm maiores chances de serem lançados no mercado assim que uma nova indicação terapêutica for descoberta (XUE et al., 2018). Uma possibilidade adicional é utilizar a estratégia de combinar drogas não-antibióticas com antimicrobianos, a fim de aumentar a eficácia do tratamento e diminuir o risco de surgimento de resistência antimicrobiana (FARHA; BROWN, 2019).

Dentre vários compostos de origem natural e quimicamente sintetizados, as quinonas têm ganhado destaque na inibição de patógenos microbianos. Estudos indicam que elas têm potencial atividade antimicrobiana contra diversos grupos de microrganismos distintos, incluindo bactérias Gram-negativas, bactérias Gram-positivas, leveduras e *Mycobacterium tuberculosis* (GANJUN et al., 2014; MONE et al., 2021; SÁNCHEZ-CALVO et al., 2016). A menadiona, também conhecida como vitamina K3, é um composto naftoquinona que possivelmente tem como alvo a membrana celular bacteriana e a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ANDRADE et al., 2017; CASTRO et al., 2008; CRIDDLE et al., 2006; TINTINO et al., 2020).

Entretanto, o mecanismo de ação da menadiona em cepas de *S. aureus* não foi completamente elucidado na literatura. Até o momento, não existem estudos *in silico* sobre sua atividade contra alvos específicos de virulência desse patógeno. Além disso, há uma lacuna sobre a ação combinada da menadiona com oxacilina frente a células planctônicas e biofilmes de *S. aureus*.

O presente estudo teve como objetivo investigar a atividade antibacteriana da menadiona, tanto isoladamente quanto em combinação com oxacilina, contra células planctônicas e biofilmes de *S. aureus*, incluindo cepas sensíveis e resistentes à metilicina. Além disso, o estudo visou elucidar o possível mecanismo de ação com base na literatura existente que apoia a promissora atividade antibacteriana da menadiona.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções bacterianas e a resistência aos antibióticos

Diversas espécies bacterianas habitam o corpo humano, algumas temporariamente e outras de forma comensal, formando a microbiota. Essas bactérias também são encontradas no ambiente, mas muitas delas possuem baixa virulência, representando risco à saúde apenas quando o sistema imunológico está comprometido, sendo classificadas como oportunistas (KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017; PARLET; BROWN; HORSWILL, 2019). Os sistemas de defesa do hospedeiro geralmente eliminam bactérias transitórias, a menos que o inóculo seja muito alto, as defesas estejam prejudicadas, os tecidos traumatizados ou haja um corpo estranho (PARLET; BROWN; HORSWILL, 2019).

A ocorrência de uma infecção pode ser atribuída ao efeito tóxico dos produtos bacterianos ou quando o microrganismo invade áreas anatômicas que normalmente são estéreis. Após estabelecer-se no hospedeiro, o patógeno passa a consumir recursos para se multiplicar, escapar das defesas do sistema imunológico e sobreviver (FORD; HURFORD; CASSAT, 2021). Essas ações podem levar a diferentes níveis de infecção, que variam de leves a graves, dependendo da patogenicidade do microrganismo e da capacidade do sistema imunológico do hospedeiro em combater a infecção (LEE et al., 2018).

Pacientes internados em instituições de saúde, especialmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), apresentam maior risco de adquirir infecções devido à exposição a uma ampla variedade de microrganismos patogênicos em comparação com outras unidades de internação hospitalar. Além de serem intrinsecamente mais vulneráveis à infecção, esses pacientes são frequentemente expostos a outros fatores de risco, como procedimentos invasivos, cirurgias complexas e uso de drogas imunossupressoras (EDWARDSON; CAIRNS, 2019; YOSHIDA et al., 2019).

No início do século XX, as doenças infecciosas eram a principal causa de óbito em todo o mundo, resultando em uma baixa expectativa de vida para a população. A redução na mortalidade por doenças infecciosas e o aumento da expectativa de vida foram atribuídos a uma série de fatores, como melhorias na nutrição, habitação e saneamento básico (BAKER et al., 2022; SHAW-TAYLOR, 2020). A introdução de agentes antimicrobianos em meados do século XX acelerou ainda mais o declínio nas mortes por doenças infecciosas. Esse declínio coincidiu com o início da era dos antibióticos, na qual a imunização também teve uma influência marcante (BROWNE et al., 2020; EXCLER et al., 2021). A descoberta da penicilina por Alexander

Fleming em 1928 foi um marco significativo na medicina, proporcionando um avanço importante no tratamento de infecções (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

No entanto, mesmo com os avanços significativos na redução da mortalidade por doenças infecciosas ao longo do século XX, a emergência da resistência à penicilina na década de 1950 trouxe consigo novos desafios, colocando em risco os progressos alcançados até aquele momento (CDC, 2019). Desde então, a resistência bacteriana tem se tornado cada vez mais prevalente, dificultando o tratamento de infecções graves e acarretando consequências graves, como aumento da morbidade e mortalidade, prolongamento da hospitalização e aumento dos custos de tratamento (PULINGAM et al., 2022).

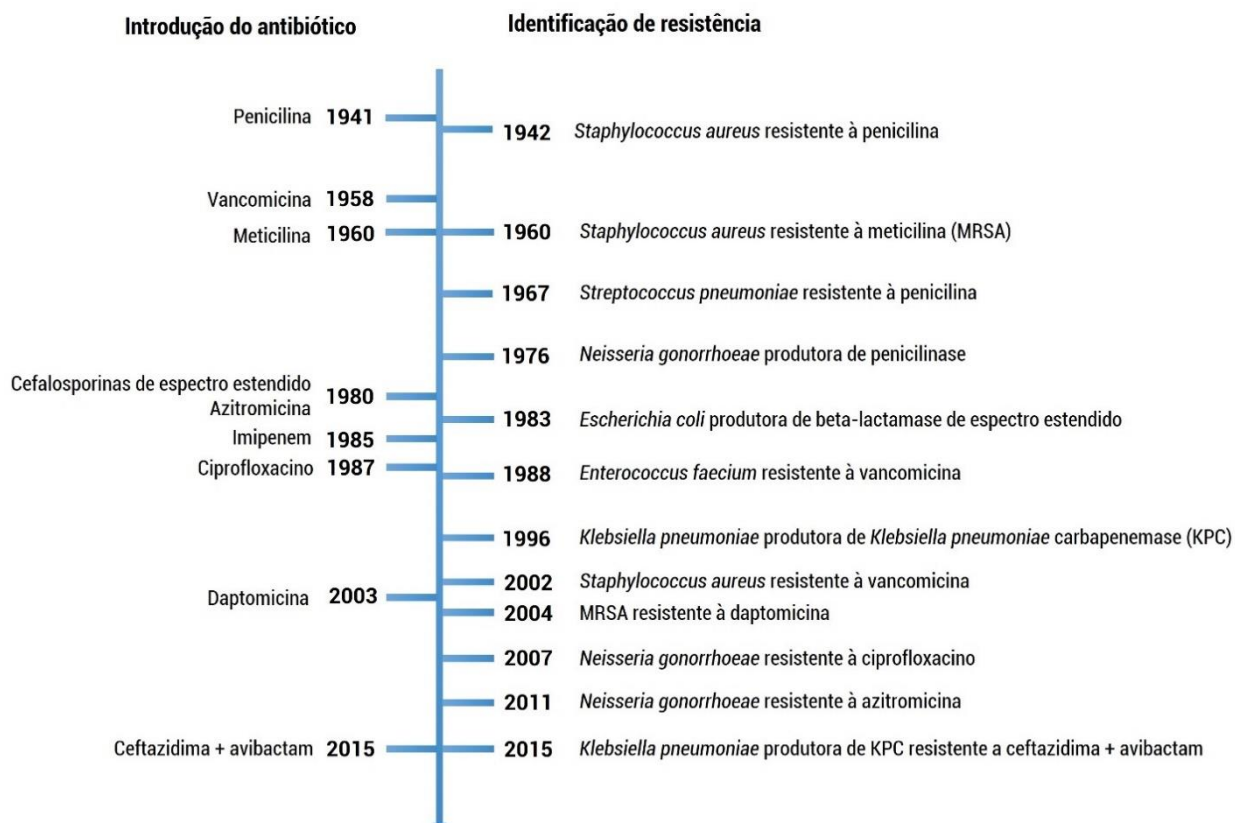
Até o presente momento, as doenças infecciosas mantêm-se como uma das principais causas de mortalidade global, com destaque para os países em desenvolvimento, apesar dos avanços obtidos (EXCLER et al., 2021). Segundo um estudo recente conduzido por Ikuta et al. (2022), as infecções bacterianas se tornaram a segunda principal causa de morte global em 2019, destacando-se cinco patógenos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Entre eles, o *S. aureus* foi associado ao maior número de mortes em todo o mundo.

O aumento de infecções bacterianas resistentes, especialmente as estafilocócicas em ambiente hospitalar, representa um desafio no tratamento de doenças infecciosas e uma ameaça significativa à saúde pública (LAKHUNDI; ZHANG, 2018; MEHRSHAD; HAGHKHAH; AGHAEI, 2017; PEREIRA-FRANCHI et al., 2017). Essas infecções resistentes geram altos custos ao sistema de saúde no Brasil e no mundo. Quando as opções de tratamento com antibióticos de primeira e segunda linha são limitadas ou indisponíveis, os profissionais de saúde precisam utilizar antibióticos mais caros e de última linha, aumentando ainda mais os custos do tratamento (PULINGAM et al., 2022).

Apesar dos avanços na descoberta de novas drogas para combater microrganismos MDR, o uso indevido e excessivo de antibióticos tem continuamente contribuído para o aumento da resistência bacteriana, desafiando as possibilidades de tratamentos disponíveis ao longo dos anos (Figura 1) (CDC, 2019; LEWIS, 2020). Esse problema é agravado pela escassez de desenvolvimento de novos fármacos capazes de combater microrganismos MDR, que é causada pela redução dos incentivos econômicos e pelas exigências regulatórias desafiadoras (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

Estudos apontam que, caso o aumento da resistência continue de forma contínua, poderemos ter 10 milhões de mortes anualmente devido a essas infecções resistentes até o ano de 2050 (MURRAY et al., 2022), trazendo sérios prejuízos para a saúde e a economia global.

Figura 1 – Evolução da resistência bacteriana a antibióticos ao longo das últimas décadas



Fonte: Adaptado de CDC (2019).

A preocupação atual com a resistência antimicrobiana foi ampliada devido ao uso excessivo de antibióticos durante a pandemia da COVID-19, onde muitos pacientes foram tratados com esses medicamentos. A pandemia também resultou em um aumento no número de pacientes internados em estado grave e por longos períodos, aumentando o risco de infecção hospitalar (MENEZES, 2021).

Com relação aos pacientes com COVID-19, foi relatado que até 72% dos pacientes internados em hospitais receberam tratamento com antibióticos (XU et al., 2020). O medo da COVID-19 e a falta de conhecimento sobre antibióticos aumentaram o acesso a esses medicamentos em países de baixa e média renda, com medidas deficientes de controle e acesso limitado aos serviços de saúde. Segundo relatos, 68,9% dos pacientes com COVID-19 receberam antibióticos (especialmente azitromicina e ceftriaxona), sendo que a taxa de automedicação foi de 33,0% antes da admissão hospitalar (GHOSH; BORNMAN; ZAFER, 2021; ZAVALA-FLORES; SALCEDO-MATIENZO, 2020).

O uso excessivo de antibióticos cria um ambiente propício para a disseminação da resistência, favorecendo o surgimento de bactérias resistentes e agravando um problema de saúde pública de grande impacto (KHAWAJA et al., 2017; MENEZES, 2021). De modo geral, o desenvolvimento de novas terapias é fundamental para garantir que os pacientes recebam tratamentos eficazes e seguros, enquanto também ajudará a mitigar os custos financeiros associados ao tratamento de infecções resistentes a medicamentos (HASSOUN; LINDEN; FRIEDMAN, 2017; IKUTA et al., 2022; XUE et al., 2018).

2.2 *Staphylococcus aureus*

Estafilococos são microrganismos frequentemente encontrados na microbiota humana, porém em condições apropriadas, podem se tornar patógenos oportunistas e serem responsáveis por uma grande variedade de processos infecciosos, que incluem desde infecções cutâneas relativamente leves até doenças sistêmicas potencialmente fatais (PROCOP et al., 2018). *S. aureus* é o membro mais virulento e conhecido do gênero, representando a principal espécie de interesse médico (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021; FORD; HURFORD; CASSAT, 2021).

S. aureus é uma bactéria esférica do grupo dos cocos Gram-positivos que pode ser encontrada na pele e na mucosa de seres humanos e outros animais. A maioria tem aproximadamente entre 0,5 µm e 1,5 µm de diâmetro, e cresce em um padrão que se assemelha a um cacho de uvas. São imóveis, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e catalase positivos. Comumente, forma colônias com uma coloração amarelo-dourada devido à produção de pigmentos carotenoides durante o seu crescimento. Esses pigmentos desempenham um papel fundamental na sobrevivência e patogenicidade do patógeno, o que justifica o nome da espécie (PROCOP et al., 2018; YANG et al., 2020).

O contato com esse microrganismo é mais comum do que se imagina, estima-se que o ser humano entra em contato com o *S. aureus* desde o dia do seu nascimento até o dia de sua morte (LEE et al., 2019; LISOWSKA-ŁYSIAK et al., 2021). *S. aureus* vem surgindo como um importante patógeno hospitalar e comunitário e tem sido referido como o “patógeno persistente” (CHANG; LEE; LEE, 2020). Geralmente, 20 a 30% dos indivíduos são portadores persistentes de *S. aureus* e 30% são portadores temporários ou intermitentes (ENANY; ALEXANDER, 2017).

S. aureus é capaz de colonizar o hospedeiro sem causar sintomas. No entanto, quando o sistema imunológico do indivíduo está comprometido, pode permitir que o

microrganismo se torne patogênico e cause infecção. Além disso, é possível que um indivíduo manifeste uma infecção por *S. aureus* mesmo que nunca tenha sido portador desse comensal anteriormente (ENANY; ALEXANDER, 2017). Além de infectar os tecidos do hospedeiro, *S. aureus* é capaz de contaminar superfícies abióticas, tais como equipamentos e dispositivos médicos, mantendo-se viável por semanas ou até meses através da formação de biofilmes. Esses biofilmes podem ser responsáveis por infecções bacterianas persistentes ou crônicas, especialmente em indivíduos que possuem um sistema imunológico debilitado (KARLOWSKY; STEENBERGEN; ZHANEL, 2019; MOORMEIER; BAYLES, 2017).

2.3 Fatores de virulência

S. aureus possui numerosas toxinas e fatores de virulência que explicam a sua capacidade de evitar as defesas do hospedeiro, mostrando-se um patógeno significativo, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos (FORD; HURFORD; CASSAT, 2021; JENUL; HORSWILL, 2019). Os fatores de virulência desempenham um papel relevante em sua patogenicidade, permitindo a adesão celular, a captação de nutrientes e a evasão da resposta imunológica do hospedeiro (GAJDÁCS, 2019).

Dentre os componentes da parede celular do *S. aureus* que contribuem para a indução da resposta imunológica no hospedeiro, destaca-se a proteína A. Essa proteína possui a capacidade de se ligar à porção Fc da molécula de IgG, formando complexos imunes que resultam no consumo de complemento. Essa interação contribui para a geração de efeitos quimiotáticos, antifagocitários, liberação de histamina, lesão plaquetária e reações de hipersensibilidade (MUTHUKRISHNAN et al., 2019).

Outros componentes importantes da parede celular do *S. aureus* incluem a cápsula e as adesinas. A cápsula é uma estrutura presente na maioria das cepas de *S. aureus*, envolvendo a parede celular e desempenhando um papel crucial na proteção da bactéria contra a fagocitose mediada pelo complemento. Já as adesinas são proteínas que se ligam aos receptores químicos encontrados na superfície das células epiteliais do hospedeiro, promovendo a aderência da bactéria a essas células, um passo importante para a colonização e estabelecimento da infecção (MILLES et al., 2018; VISANSIRIKUL; KOLODZIEJ; DEMCHENKO, 2020).

Entre as citotoxinas, existem: a alfa-toxina que leva a formação de poros de 1 a 2 nm, além ocasionar desequilíbrio osmótico, turgescência e consequente lise celular; a beta-toxina, também chamada de esfingomielinase C, que catalisa a hidrólise dos fosfolipídios de membrana, sendo a lise proporcional à concentração de esfingomielinase exposta na superfície

celular; a deltatoxina, que tem propriedades tensoativas, sendo responsável pelos efeitos sobre as membranas de eritrócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e plaquetas; e a gamatoxina, que apresenta atividade hemolítica e é composta por duas cadeias polipeptídicas, o componente S e o componente F (DIVYAKOLU et al., 2019).

Outro importante fator de virulência são as enterotoxinas estafilocócicas, que são superantígenos capazes de induzir ativação de células T e intensa liberação de citocinas que estimulam a liberação de mediadores inflamatórios em mastócitos, elas também aumentam o peristaltismo intestinal e a perda de fluidos, causando quadros de náusea e vômitos (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021).

Outra toxina produzida por algumas cepas de *S. aureus* é a toxina TSST-1, responsável por desencadear a síndrome do choque tóxico em seres humanos. Trata-se de um superantígeno que exerce forte ativação do sistema imunológico, estimulando a liberação de citocinas, determinando, em baixas concentrações, o escape de células endoteliais e produzindo efeito citotóxico para as células em altas concentrações, podendo resultar em fasciíte necrotizante ou síndrome do choque tóxico (SHAMS-ABADI et al., 2018).

A leucocidina Pantón-Valentine (PVL) é uma proteína com composição semelhante à gamatoxina, mas diferentemente desta, é leucotóxica e não exibe atividade hemolítica. A PVL é capaz de alterar a permeabilidade da membrana celular, permitindo a entrada de cátions, o que resulta na degranulação celular e indução da citólise (BOSWIHI; UDO, 2018) Essa toxina é particularmente preocupante porque pode causar infecções graves, como pneumonia necrosante e infecções de pele com rápida progressão (HOPPE et al., 2019). Além disso, a PVL é frequentemente associada a cepas de *S. aureus* resistentes a múltiplos antibióticos, o que pode dificultar o tratamento dessas infecções (AMIN; GULER; BADDAL, 2020; BOSWIHI; UDO, 2018).

Algumas enzimas que fazem parte do mecanismo de patogenicidade são as: lipases, com ação de hidrolisar lipídeos; a coagulase, responsável por converter o fibrinogênio em fibrina, provocando a deposição de fibrina em torno do microrganismo e dificultado a fagocitose celular; a catalase que converte o peróxido de hidrogênio, apresentando ação tóxica; a hialuronidase que hidrolisa os ácidos hialurônicos presentes na matriz acelular do tecido conjuntivo; a fibrinolisinina, também chamada de estafiloquinase, que pode dissolver os coágulos de fibrina e a nuclease que hidrolisa o DNA (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021).

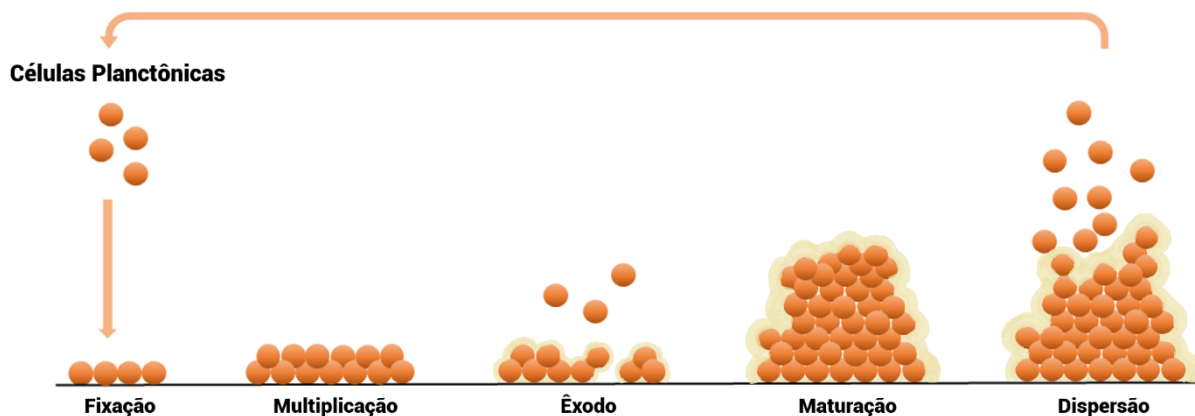
Outra importante característica do *S. aureus* é sua notável habilidade em formar biofilmes, que desempenham um papel crucial na proteção do patógeno, facilitando seu desenvolvimento e disseminação no ambiente. Os biofilmes são estruturas complexas

compostas por comunidades de microrganismos envolvidos por uma matriz extracelular. Essas estruturas podem ser encontradas tanto em superfícies bióticas quanto abióticas (JAMAL et al., 2018).

A produção de fatores extracelulares desempenha um papel fundamental na formação de biofilmes, conferindo benefícios estruturais e funcionais. Esses biofilmes apresentam propriedades como hidratação, captura de nutrientes, capacidade digestiva e resistência a antimicrobianos, além de oferecer proteção ao sistema imunológico do hospedeiro e proteção mecânica. Biofilmes são altamente resistentes a antibióticos, exigindo concentrações muito mais elevadas para sua eliminação em comparação com bactérias em estado planctônico. Essa resistência é devida à matriz extracelular do biofilme, que atua como uma barreira protetora dificultando a ação dos antibióticos (ADUSEI et al., 2019; FLEMMING et al., 2016).

O desenvolvimento do biofilme de *S. aureus* prossegue através de um processo de desenvolvimento de cinco estágios que inclui: (i) fixação, (ii) multiplicação, (iii) êxodo, (iv) maturação e (v) dispersão (Figura 2) (SAUER et al., 2022).

Figura 2 – Estágios de formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* em superfícies bióticas ou abióticas



Fonte: elaborado pela autora.

A primeira fase envolve a fixação das células à superfícies abióticas ou bióticas por meio de interações hidrofóbicas e hidrofílicas (MAIKRANZ et al., 2020). Este estágio é mediado por proteínas de superfície, conhecidas como componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva (MSCRAMMs) (FOSTER, 2019).

O segundo estágio do desenvolvimento do biofilme inclui a multiplicação celular. Depois de aderir a uma superfície e na presença de uma fonte de nutrientes suficiente, as células

aderentes de *S. aureus* começarão a se dividir e se acumular. Essas células são conhecidas por produzir uma variedade de fatores que ajudam a estabilizar as interações célula a célula e promover a formação do biofilme (MOORMEIER; BAYLES, 2017). O terceiro estágio é chamado de êxodo, onde ocorre uma dispersão inicial que coincide com a formação de microcolônias que resulta na reestruturação do biofilme. As microcolônias se formam a partir de focos distintos de células que permanecem aderidas durante a fase de êxodo (SCHILCHER; HORSWILL, 2020).

A maturação, estágio seguinte, é o momento em que ocorre uma rápida divisão celular que formam agregações robustas compostas por proteínas. Na fase de maturação ocorre a produção da matriz extracelular, que contém glicoproteínas, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e DNA extracelular. A matriz extracelular confere proteção contra o sistema imune do hospedeiro e atua como barreira física à penetração de fármacos, contribuindo assim para a manutenção da integridade do biofilme (CIANDRINI et al., 2020).

Por último a etapa de dispersão, onde ocorrerá a disseminação do microrganismo. Após o acúmulo de biofilme, as células dentro do biofilme podem ser reativadas para um estado planctônico através da dispersão. Essa dispersão ocorre em resposta a mudanças ambientais; pode ser induzida por falta de nutrientes ou disponibilidade repentina de nutrientes. Esse processo contribui para o desenvolvimento de doenças crônicas devido à disseminação do microrganismo em outros locais (PARASTAN et al., 2020).

A composição dos determinantes da virulência de diferentes cepas de *S. aureus* pode variar devido à aquisição e perda de fatores de virulência, que são codificados pelos elementos genéticos móveis (MGEs) através da transferência horizontal. Isso sugere a rápida emergência de cepas multirresistentes e altamente virulentas. Os MGEs são cruciais para a evolução e adaptação rápida do SARM (MATUSZEWSKA et al., 2020).

2.4 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM)

A primeira cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) foi relatada em 1961 no Reino Unido, apenas dois anos após a introdução da meticilina como um antibiótico amplamente utilizado no tratamento de infecções por *S. aureus* (CDC, 2019; GAJDÁCS, 2019). Desde então, cepas de SARM tornaram-se uma preocupação mundial, que acomete não só os ambientes hospitalares, mas também a comunidade (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022).

Pacientes com infecções causadas por SARM têm um risco aumentado de mortalidade em comparação com aqueles com infecções por SASM (CAVALCANTE et al., 2017). Isso ocorre devido ao SARM ser resistente a vários tipos de antibióticos β -lactâmicos comumente usados, o que torna o tratamento dessas infecções mais difícil. Isso pode levar a um atraso no início do tratamento ou a uma escolha inadequada de antibióticos, o que pode levar a um agravamento da infecção e aumentar o risco de mortalidade (SHALABY et al., 2020).

A resistência bacteriana à metilina ocorre devido a presença de uma proteína de ligação à penicilina alterada, chamada de proteína de ligação à penicilina 2a (PBP2a), que apresenta baixa afinidade por β -lactâmicos (OKWU et al., 2019). Antibióticos β -lactâmicos normalmente se ligam a PBP (proteínas de ligação à penicilina) na parede celular, resultando na interrupção da síntese da camada de peptidoglicano e na morte da bactéria. Como os antibióticos β -lactâmicos não podem se ligar a PBP2a, a síntese da camada de peptidoglicano e a síntese da parede celular não são capazes de continuar (SHALABY et al., 2020).

Essa proteína resulta da aquisição de um gene cromossômico, denominado *mecA*, que está localizado em um cassete cromossômico estafilocócico *mec*, conhecido como SCC*mec* (PROCOP et al., 2018). O SCC*mec*, um elemento genético móvel de 21 a 67 kb, foi adquirido pelas cepas de SARM durante a sua evolução e integrado ao seu genoma. Esse componente possui determinantes para resistência a diversas classes de antibióticos. Através da tipagem sequencial é possível analisar e correlacionar polimorfismos com a redução da sensibilidade aos fármacos (LAKHUNDI; ZHANG, 2018; LEE et al., 2018).

SARM pode ser categorizado em dois grandes grupos: SARM associado a hospitais (HA-SARM) e SARM associado à comunidade (CA-SARM). Estudos mostram que HA-SARM e CA-SARM diferem entre si. Enquanto o HA-SARM apresenta uma elevada resistência aos antibióticos, sua virulência é menor e sua capacidade de colonização é reduzida. Por outro lado, isolados de CA-SARM revelam menor resistência a antibióticos, porém apresentam uma maior virulência e uma capacidade de colonização mais elevada (ENANY; ALEXANDER, 2017).

A diferença do perfil de resistência das cepas HA-SARM e CA-SARM pode ser explicada pela distribuição e pelo tamanho dos cassetes cromossômicos que possuem o determinante de resistência à metilina (SCC*mec*). Entre os principais tipos de SCC*mec* (I, II, III, IV e V), somente os tipos I, II e III são encontrados em cepas de HA-SARM, enquanto os tipos IV e V são observados nas cepas CA-SARM (LIU et al., 2016; SANTOS et al., 2007). O tipo IV é menor, o que provavelmente facilita a perda dos genes de resistência a diversos antibióticos. Outra importante característica do CA-SARM é a presença dos genes *luk-PV* e

lukS-PV, que codificam a leucocidina de Panton-Valentine (PVL), uma toxina que é capaz de induzir a destruição de leucócitos e causar grande dano tecidual ao hospedeiro (ASSIS; NEDELJKOVIĆ; DESSEN, 2017; SANTOS et al., 2007).

Entretanto, é importante ressaltar que a distinção entre CA-SARM e HA-SARM tem se tornado menos clara nos últimos anos. A morbidade das infecções por CA-SARM tem apresentado um aumento significativo em todo o mundo, e investigações moleculares revelaram que o CA-SARM também pode afetar pacientes em ambientes de assistência à saúde (ALGAMMAL et al., 2020; KATEETE et al., 2019).

As taxas de infecções causadas pelo SARM têm aumentado significativamente ao longo dos anos, representando um grande desafio terapêutico (HASSOUN; LINDEN; FRIEDMAN, 2017; LAKHUNDI; ZHANG, 2018; MEHRSHAD; HAGHKHAH; AGHAELI, 2017). A redução de agentes antimicrobianos eficazes dificulta o tratamento de infecções graves, como pneumonia, bacteremia, endocardite, sepse e infecções de pele. Isso é preocupante devido à gravidade e diversidade das doenças causadas por esse patógeno, bem como sua disseminação em ambientes hospitalares (LEE et al., 2018; PARLET; BROWN; HORSWILL, 2019).

2.5 Aspectos epidemiológicos das infecções por SARM

Estudos recentes apontaram que em 2019, *S. aureus* foi responsável por mais de 1 milhão de mortes, tornando-se a principal causa de morte bacteriana em 135 países (IKUTA et al., 2022). Durante o mesmo período, a variante resistente à meticilina, SARM, causou mais de 100.000 mortes relacionadas à resistência antimicrobiana (MURRAY et al., 2022).

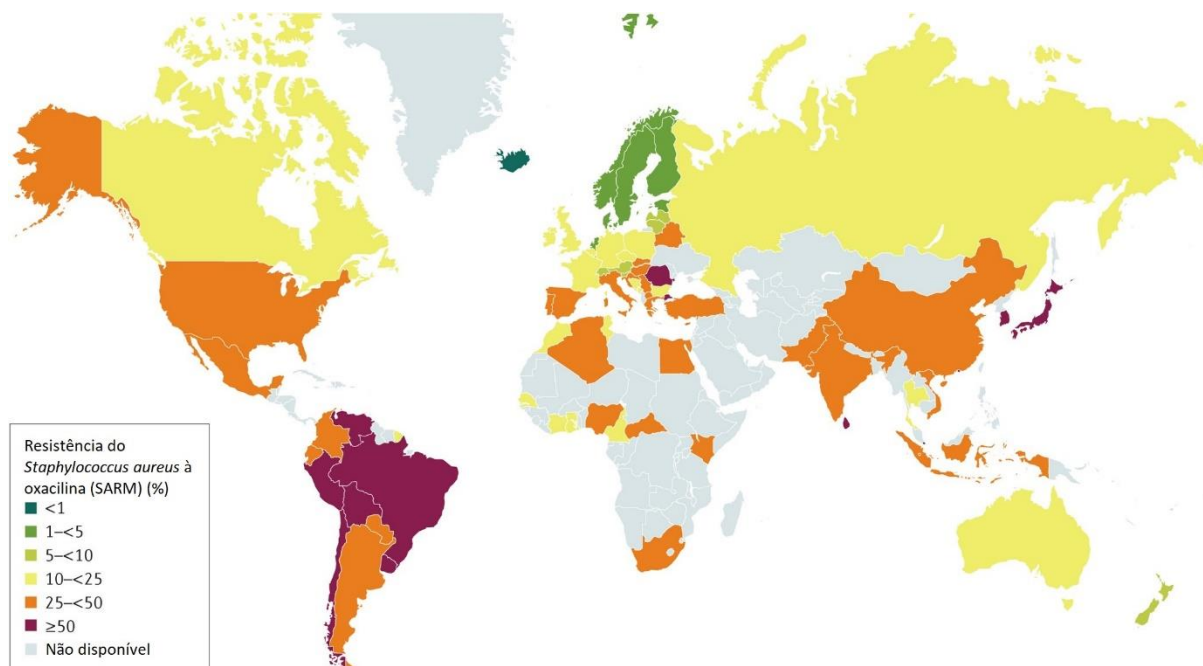
De acordo com o CDC (2019), as infecções por SARM foram responsáveis por aumentar os custos hospitalares em US\$ 1,7 bilhão em 2017, nos EUA. Esses dados preocupantes são agravados pelo fato de que a resistência antimicrobiana já é responsável por mais de 700.000 mortes anuais em todo o mundo. As previsões indicam que, se medidas efetivas de controle e prevenção não forem implementadas, esse número pode chegar a mais de 10 milhões de mortes anuais até 2050, com um custo econômico estimado em US\$ 100 trilhões (FARHA; BROWN, 2019; O'NEILL, 2016).

SARM é uma preocupação crescente em todo o mundo. Na Europa, esse patógeno é amplamente reconhecido como um dos mais importantes entre as bactérias multirresistentes e está frequentemente envolvido em infecções relacionadas à assistência à saúde. Nos Estados Unidos e na América Latina, SARM é o principal agente bacteriano envolvido em infecções

nosocomiais e está cada vez mais envolvido na prevalência de infecções na comunidade (DIEKEMA et al., 2019; LEE et al., 2018).

Foi constatado por meio de um estudo que o Brasil apresenta um dos piores índices de prevalência de SARM no mundo, uma vez que mais de 50% dos *S. aureus* isolados foram identificados como resistentes à oxacilina (LEE et al., 2018) (Figura 3).

Figura 3 – Prevalência de SARM no mundo



Fonte: Adaptado de Lee et al. (2018).

No Brasil, estudos mostram a prevalência de cepas resistentes de *S. aureus* em ambientes hospitalares. No Hospital de Clínica da Universidade Federal de Uberlândia, a maioria das infecções por *S. aureus* ocorreu em unidades de UTI, com 47% das amostras identificadas como SARM (PEREIRA; DE OLIVEIRA; SILVA, 2022). Em um hospital da região nordeste do Brasil, mais precisamente na unidade neonatal de terapia intensiva da Santa Casa de Misericórdia de Sobral, interior do Ceará, foi realizado um estudo acerca da prevalência de microrganismos e o perfil de sensibilidade antimicrobiana em hemoculturas positivas de pacientes com infecção de corrente sanguínea, na qual a resistência à oxacilina foi observada em 80% dos isolados de *S. aureus* (SOUSA et al., 2019).

Os profissionais da saúde têm um papel crucial na prevenção e controle de infecções hospitalares, mas também podem ser responsáveis pela disseminação de patógenos, incluindo as cepas resistentes de *S. aureus* (WHO, 2019). É preocupante constatar que, em um estudo

conduzido em um hospital localizado na região leste de Minas Gerais, das 91 amostras coletadas dos funcionários a partir do fluido nasal, 20 delas foram positivas para *S. aureus*. Entre essas amostras, 14 foram identificadas como SARM, o que significa que 70% das cepas de *S. aureus* apresentaram resistência (LINARDI et al., 2017). Este fato é alarmante, pois destaca a necessidade de medidas de controle e prevenção de infecções hospitalares, principalmente considerando o potencial de transmissão desses patógenos pelos próprios profissionais de saúde.

De fato, estudos indicam que o SARM é responsável por pelo menos 25 a 50% das infecções por *S. aureus* em ambientes hospitalares (LAKHUNDI; ZHANG, 2018). Essa alta taxa de infecção por SARM demonstra a urgência de investimentos em pesquisas para desenvolver novas terapias e buscar alternativas para o tratamento de infecções por SARM e outros patógenos resistentes a medicamentos.

2.6 Terapia convencional para infecções por SARM

Entre os fármacos utilizados no tratamento de infecções por cepas de SARM tem-se os glicopeptídeos, sendo os mais aplicados na clínica a vancomicina e a teicoplanina. Ambos possuem ação bactericida, inibindo a síntese da parede celular bacteriana nos cocos Gram-positivos (BLASKOVICH et al., 2018). A síntese de peptidoglicano é inibida através da ligação com a porção terminal D-alanil-D-alanina das unidades precursoras da parede celular, resultando em uma parede celular desestabilizada. Além de alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática interferindo na síntese do RNA (BLASKOVICH et al., 2018). A vancomicina ainda se demonstra eficaz cepas de SARM, sendo necessário atenção ao surgimento e disseminação de cepas de *Staphylococcus aureus resistente à vancomicina* (SARV) (CONG; YANG; RAO, 2020).

Os fármacos oritavancina, dalbavancina e telavancina foram desenvolvidos com estrutura semelhante à vancomicina, porém com a vantagem de possuírem um espectro mais amplo contra microrganismos MDR, incluindo as cepas de SARV. Todos os três são glicopeptídeos que possuem maior potência e um menor potencial para o desenvolvimento de resistência nos microrganismos (GUSKEY; TSUJI, 2010; SWEENEY et al., 2017).

A classe de antibióticos conhecida como oxazolidinonas, cujo representante mais conhecido é a linezolida, atua interferindo na síntese proteica bacteriana, ligando-se irreversivelmente ao sítio de ligação do complexo de iniciação 50S do ribossomo bacteriano, impedindo a formação do complexo de iniciação 70S e a subsequente síntese de proteínas bacterianas. Eles são indicados principalmente para o tratamento de infecções causadas por

Gram-positivos, incluindo enterococos resistentes à vancomicina (VRE), SARM e SARV (ROUARD et al., 2018).

Entretanto, o surgimento de resistência a esse fármaco já foi relatado. Os mecanismos de resistência parecem estar relacionados a mutações sobre o RNA ribossômico e, como consequência, diminuição do reconhecimento do fármaco pelo alvo macromolecular (AZHAR et al., 2017; CHEN; HUANG; SHIE, 2020).

A tedizolida, também pertencente à classe das oxazolidinonas, foi aprovada pela FDA em 2014 para o tratamento de infecções bacterianas agudas da pele e de estruturas da pele causadas por bactérias como o *S. aureus*, incluindo cepas de SARM. Comparada à linezolida, a tedizolida apresenta uma dosagem diária única, eficácia e um perfil de segurança melhorado. No entanto, seu alto custo limita seu uso para infecções bacterianas agudas da pele e de estruturas da pele (HALL et al., 2018).

A quinupristina-dalfopristina é uma combinação de dois antibióticos pertencentes à classe dos estreptograminas com ação sinérgica contra bactérias Gram-positivas, como SARM e *S. pneumoniae*. A quinupristina inibe a síntese proteica bacteriana, ligando-se à subunidade 50S do ribossomo bacteriano e inibindo a síntese de proteínas. Já a dalfopristina atua ligando-se à subunidade 50S do ribossomo bacteriano, promovendo uma alteração conformacional na estrutura do ribossomo e permitindo que a quinupristina se ligue mais efetivamente (SHARIATI et al., 2020). A presença do gene *vatA* em SARM pode limitar a eficácia do uso da quinupristina-dalfopristina (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022).

A clindamicina, pertencente à classe das lincosamidas, é uma opção comum para o tratamento inicial ou definitivo de infecções de pele e partes moles adquiridas na comunidade, devido à sua alta biodisponibilidade oral e capacidade de penetração na pele e estruturas cutâneas. Esse fármaco atua inibindo a síntese proteica, onde une-se às subunidades 50S dos ribossomos bacterianos e evita a formação das uniões peptídicas. Trata-se de um bacteriostático, porém em concentrações mais elevadas pode atuar como bactericida (LUCHIAN et al., 2021). Alguns estudos relatam cepas de SARM resistentes a esse tratamento, reforçando a importância do uso consciente e criterioso deste medicamento (JARAJREH et al., 2017; LUPINACCI et al., 2017).

A daptomicina é um antibiótico da classe dos lipopeptídeos utilizada comumente no tratamento de infecções causadas por SARM. Sua atividade se estende a patógenos Gram-positivos, incluindo cepas resistentes à oxacilina e à vancomicina (HEIDARY et al., 2018). O mecanismo de ação da daptomicina é único e envolve a interação com fosfolipídeos da membrana citoplasmática na presença de íons Ca^{2+} , causando vazamento de íons K^+ para o

meio extracelular e destruição da parede celular bacteriana (HEIDARY et al., 2018; TAYLOR; PALMER, 2016). A resistência à daptomicina já foi relatada em algumas cepas de SARM (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022; SHARIATI et al., 2020).

A doxiciclina, um antibiótico da classe das tetraciclinas, exerce seu efeito inibindo a síntese proteica bacteriana. Ela se liga reversivelmente às subunidades ribossômicas 30S das bactérias, interferindo na ligação do RNA de transferência e prejudicando a formação do complexo de síntese proteica (LATURKAR et al., 2021; WATKINS; HOLUBAR; DAVID, 2019).

A tigeciclina é um importante antibiótico derivado de glicilciclina, com amplo espectro de atividade e estruturalmente relacionado às tetraciclinas. Seu mecanismo de ação também envolve a ligação à subunidade ribossômica 30S, inibindo a síntese de proteínas (YAGHOUBI et al., 2022). Possui um esqueleto carbocíclico central de quatro anéis presente nas tetraciclinas, que é fundamental para a atividade antibacteriana, e um grupo N-alquil-glicilamido, que confere um espectro mais amplo de atividades em relação às tetraciclinas convencionais (VESTERGAARD; FREES; INGMER, 2019; YAGHOUBI et al., 2022).

Ambas são eficazes no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas altamente resistentes, incluindo o SARM. No entanto, é importante mencionar que já foram identificadas cepas de SARM resistentes à doxiciclina, conforme relatado em estudos (KAYILI; SANLIBABA, 2020). Embora a tigeciclina seja considerada uma classe de antibióticos com baixa ocorrência de resistência, alguns estudos indicam que existem casos raros e isolados de cepas de *Staphylococcus aureus* também resistentes a essa substância (YOUSEFI et al., 2017).

O sulfametoxazol é um composto que pertence ao grupo das sulfonamidas, ele é frequentemente utilizado em combinação sinérgica com a trimetoprima para o tratamento de infecções causadas por SARM, atuando como um bactericida. O sinergismo ocorre devido aos dois antimicrobianos atuarem em pontos diferentes da via de síntese do ácido tetraidrofólico. O sulfametoxazol é um análogo estrutural do ácido para-aminobenzóico (PABA) e compete com o PABA para inibir a síntese do ácido diidrofólico, uma etapa intermediária na formação do ácido tetraidrofólico. O trimetoprim atua inibindo a enzima diidrofolato redutase, impedindo assim a formação do metabólito ativo do ácido tetraidrofólico no final do processo (MINATO et al., 2018). Cepas de SARM com resistência a esse tratamento também já foram documentadas (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022).

As cefalosporinas de quinta geração, ceftarolina e ceftobiprole, demonstram atividade frente SARM. Isso ocorre por meio da ligação às proteínas de ligação às penicilinas

(PBPs), destacando a PBP2a, responsável pela resistência do SARM nas células bacterianas. Essa ligação inibe a síntese da parede celular bacteriana, levando finalmente à lise das células (COSIMI et al., 2017; GIACOBBE et al., 2019).

A ceftarolina possui atividade bactericida frente cepas resistentes a outras classes de agentes antimicrobianos, como glicopeptídeos, daptomicina, clindamicina, sulfametoxazol-trimetoprim e linezolida. Ela também tem sido utilizada em combinação com outros antibióticos em pacientes com bacteremia persistente (BHOWMICK et al., 2019; LOUNSBURY et al., 2019). Estudos *in vitro* demonstraram que o ceftobiprole apresentou um efeito bactericida potencialmente superior ao da linezolida e daptomicina, além de poder atuar sinergicamente com esta última contra SASM, SARM e cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (GIACOBBE et al., 2019). A resistência a cefalosporinas de quinta geração em cepas de *S. aureus* já foi descrita e pode ocorrer devido a mutações do sítio alostérico PBP2a (LIU et al., 2021; MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022).

Delafloxacino é uma nova fluoroquinolona disponível tanto por via oral quanto parenteral. Foi aprovado em 2017 pelo FDA para o tratamento de doenças agudas, infecções bacterianas da pele e da estrutura da pele. Possui resposta clínica favorável em infecções por SARM, distinguindo-o de outras fluoroquinolonas. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição de duas enzimas bacterianas envolvidas na replicação de material genético, DNA-girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV (DA SILVA; AQUINO, 2018; SARAVOLATZ; STEIN, 2019).

A omadaciclina é um novo antibiótico de amplo espectro pertencente ao grupo das aminometilciclínas que foi aprovado pelo FDA em 2018 para o tratamento de várias infecções bacterianas (CHAMBERS, 2019). Trata-se de um derivado semissintético da tetraciclina que apresenta o mesmo mecanismo de ação da classe, inibindo a síntese de proteínas bacterianas ao se ligar ao local de ligação da tetraciclina primária na subunidade 30S do ribossomo bacteriano. Além disso, é um fármaco de amplo espectro com atividade contra aeróbios Gram-positivos, incluindo patógenos resistentes a antimicrobianos, como SARM, e permanece ativo contra cepas bacterianas resistentes à tetraciclina (KARLOWSKY; STEENBERGEN; ZHANEL, 2019).

Entre os medicamentos tópicos utilizados no tratamento de SARM, dois exemplos comuns são a mupirocina e o ácido fusídico. Ambos têm como mecanismo de ação a inibição da síntese proteica bacteriana. A mupirocina liga-se à enzima isoleucil-tRNA sintetase, bloqueando a incorporação de isoleucina nas proteínas bacterianas em crescimento. O ácido fusídico liga-se reversivelmente à proteína EF-G, interrompendo a translocação dos ribossomos

bacterianos e a síntese proteica. Entretanto já existem evidências de cepas de SARM resistentes à esses tratamentos (DADASHI et al., 2020; HAJIKHANI et al., 2021).

No tratamento convencional, a vancomicina é frequentemente utilizada como o antibiótico de primeira escolha para tratar infecções causadas por SARM, como bacteremia, pneumonia e infecções de tecidos moles. No entanto, é importante considerar suas limitações. A vancomicina tem um tempo de ação mais lento e penetração limitada em certos tecidos. Além disso, doses mais altas podem aumentar o risco de nefrotoxicidade (SELBY; HALL, 2019).

Para superar essas limitações, existem outras opções de tratamento de primeira linha disponíveis. Medicamentos como daptomicina, teicoplanina e linezolida são recomendados como alternativas eficazes. Em casos de infecções cutâneas, o ácido fusídico e a mupirocina são frequentemente prescritos, podendo ser combinados com agentes orais, como a clindamicina, em situações mais complexas (BROWN et al., 2021; HASSOUN; LINDEN; FRIEDMAN, 2017).

A necessidade de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para tratar doenças ocasionadas por SARM é uma questão premente na saúde pública global. A resistência não se restringe a um único antibiótico, mas abrange diversos agentes farmacológicos, agravando ainda mais a situação. Apesar do surgimento de novos antibióticos direcionados para contornar a multirresistência, as opções terapêuticas são limitadas devido à aquisição contínua de resistência por cepas de *S. aureus* e problemas farmacocinéticos que comprometem a eficácia dos medicamentos existentes (LIU et al., 2021; MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022; ROUARD et al., 2018).

Esse cenário evidencia a necessidade contínua de pesquisas para o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas e alternativas eficazes no tratamento de microrganismos resistentes (HUA et al., 2022; TYERS; WRIGHT, 2019).

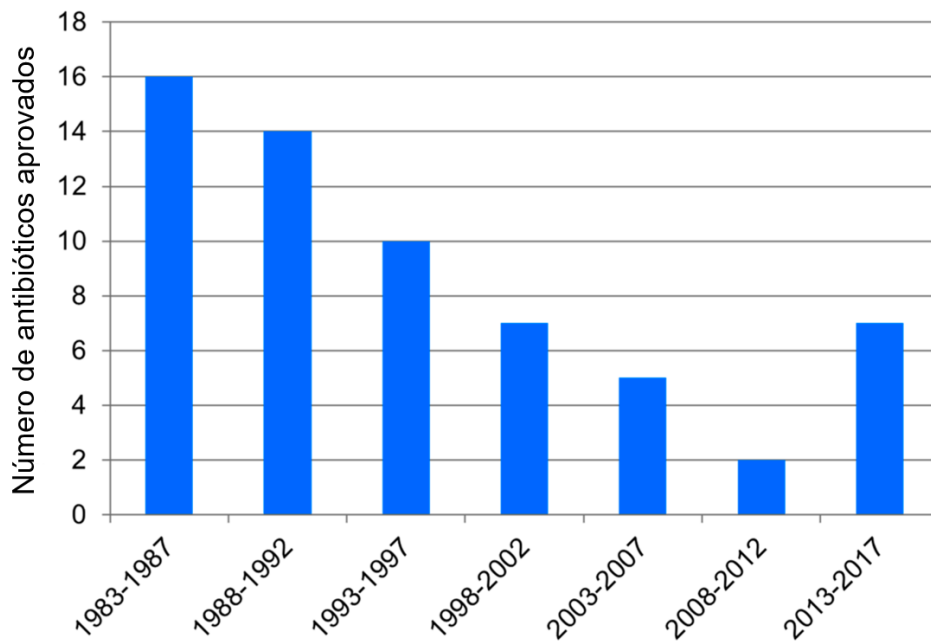
2.7 Alternativas terapêuticas

A utilização inapropriada de antibióticos tem levado a um aumento nas taxas de bactérias MDR, o que representa um grande desafio para o tratamento de doenças infecciosas. Ainda que existam antibióticos capazes de combater esses microrganismos, as opções terapêuticas eficazes estão se tornando cada vez mais limitadas. Esse problema é agravado pelo uso inadequado e excessivo de antibióticos, o que favorece a disseminação da resistência bacteriana. Como resultado, a descoberta de novos medicamentos não acompanha o ritmo de propagação da resistência, o que é preocupante e pode ter consequências graves para a saúde

pública, especialmente no ambiente hospitalar (ASSIS; NEDELJKOVIĆ; DESSEN, 2017; LIMA et al., 2020; ROUARD et al., 2018).

O número de novos antibióticos inseridos no mercado tem diminuído constantemente (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). No período entre 2008 e 2012, esse número atingiu um ponto crítico de apenas dois novos antibióticos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (Figura 4), uma quantidade relativamente baixa quando comparados com décadas passadas. Importante enfatizar que nos últimos 20 anos, apenas 10% dos 34 novos antibióticos aprovados pelo FDA envolviam novos mecanismos de ação, na grande maioria apenas foram realizadas alterações na molécula (DUVAL; GRARE; DEMORÉ, 2019).

Figura 4 - Evolução dos antibióticos aprovados pela FDA desde 1983



Fonte: Adaptado de Duval, Grare e Demoré (2019).

Muitos dos agentes antimicrobianos disponíveis atualmente serão ineficazes devido ao crescente número de resistência microbiana (DA SILVA; AQUINO, 2018). Para enfrentar esse desafio, é essencial buscar novas estratégias e abordagens terapêuticas que possam superar a resistência e ajudar a controlar a disseminação de microrganismos resistentes.

O reposicionamento de fármacos tem se mostrado uma estratégia promissora na identificação rápida de novos agentes terapêuticos para o tratamento de infecções ocasionadas por bactérias MDR (HUA et al., 2022; TYERS; WRIGHT, 2019). Esta abordagem é capaz de descobrir novas indicações para medicamentos existentes, apresentando diversas vantagens

sobre o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos. Uma das principais vantagens é que os compostos já possuem propriedades farmacológicas e toxicológicas conhecidas, ensaios clínicos já foram realizados e formulações já estão estruturadas, reduzindo drasticamente o tempo e o custo necessários para sua aprovação no mercado quando comparados ao desenvolvimento de novos antibióticos (HUA et al., 2022; PUSHPAKOM et al., 2019).

Como resultado, medicamentos reposicionados têm maiores chances de serem rapidamente disponibilizados para pacientes assim que uma nova indicação terapêutica for descoberta, tornando essa estratégia uma opção atrativa para combater a resistência bacteriana e outras doenças infecciosas (XUE et al., 2018; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018).

Uma abordagem adicional é utilizar a estratégia de combinar drogas não-antibióticas com antimicrobianos para aumentar a eficácia do tratamento e diminuir o surgimento de resistência antimicrobiana emergente (FARHA; BROWN, 2019). Dentre as vantagens das combinações de medicamentos, está a expansão do espectro dos antibióticos, isso é importante para infecções graves, nas quais o tratamento eficaz é crítico (TYERS; WRIGHT, 2019). Combinações de dois ou mais medicamentos podem levar a um efeito sinérgico ou aditivo, que é alcançado por diferentes mecanismos de ação (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018).

O reposicionamento de fármacos tem apresentado resultados promissores no campo da saúde. Um exemplo notável é o uso eficaz da anfotericina B no tratamento da leishmaniose visceral. Além disso, os antimaláricos cloroquina e pirimetamina têm demonstrado sucesso ao serem reaproveitados para combater a amebíase e a toxoplasmose, respectivamente. Outros medicamentos, como a doxiciclina, têm sido efetivamente utilizados para tratar a malária, enquanto a paromomicina e a espiramicina têm sido indicadas com êxito para leishmaniose visceral e toxoplasmose, respectivamente (FARHA; BROWN, 2019).

A atividade antimicrobiana de derivados de 1,4-NQs tem sido relatada em estudos anteriores (ADUSEI et al., 2019; PAUL et al., 2021; WANG et al., 2016), inclusive em combinação com antimicrobianos, resultando na redução das CIMs (ANDRADE et al., 2017; RONDEVALDOVA; NOVY; KOKOSKA, 2015; TINTINO et al., 2018; YAP et al., 2021). Esses achados indicam que essa classe de compostos químicos possui um potencial promissor no contexto de reposicionamento de fármacos, sugerindo que eles podem desempenhar um papel relevante como adjuvantes no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*. Dessa forma, os derivados de 1,4-NQs representam uma interessante área de pesquisa para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2.8 Potenciais alvos na pesquisa de antibacterianos contra o *Staphylococcus aureus*

Uma estratégia promissora no desenvolvimento de medicamentos antibacterianos contra o *S. aureus* é a abordagem anti-virulência, que visa interagir com alvos cruciais para o desenvolvimento e patogênese da bactéria. Alvos terapêuticos essenciais como enzimas envolvidas na síntese da parede celular bacteriana, proteínas transportadoras de membrana, enzimas envolvidas na síntese de proteínas e toxinas são altamente eficazes na inibição do crescimento e sobrevivência do *S. aureus*, tornando medicamentos que os afetam altamente eficazes (ASSIS; NEDELJKOVIĆ; DESSEN, 2017; FORD; HURFORD; CASSAT, 2021).

A proteína FtsA é um alvo importante no ciclo celular, desempenhando papel crucial na divisão celular bacteriana, ancorando a proteína FtsZ à membrana citoplasmática e sendo essencial para a viabilidade celular. Durante a divisão, a interação entre FtsA e FtsZ forma um complexo importante para a estabilidade e formação do anel Z. Além disso, FtsA recruta outras proteínas para o local da divisão celular. É fundamental que ocorra interação entre FtsA e FtsZ para a formação correta do anel Z e uma divisão celular bem-sucedida (TRIPATHY; SAHU, 2019). A inibição de sua atividade pode interromper a divisão celular bacteriana e, conseqüentemente, impedir o crescimento e a sobrevivência das bactérias, sendo um alvo atraente para o desenvolvimento de novos agentes (RAGUNATHAN et al., 2019).

Entre os alvos importantes na síntese do DNA, tem-se a enzima DHFR (diidrofolato redutase), trata-se de uma enzima que participa da redução do ácido diidrofólico a ácido tetraidrofólico, essencial na cadeia de síntese do DNA (TONELLI et al., 2017). O desenvolvimento de novos antagonistas da DHFR tem sido considerado como uma estratégia promissora para aprimorar o tratamento das doenças infecciosas, visto que esses antagonistas podem inibir a atividade da DHFR e, conseqüentemente, impedir a replicação do DNA bacteriano (RAIMONDI et al., 2019).

Outra enzima crucial no processo de replicação é a DNA girase (JAKOPIN et al., 2017). A DNA girase desempenha um papel crucial na replicação, transcrição e recombinação do DNA em diversos organismos, sendo responsável por modificar a topologia da molécula de DNA, promovendo torção e superenrolamento (DIGHE; COLLET, 2020). Esse mecanismo de ação é muito eficaz, uma vez que a replicação e transcrição do DNA são processos fundamentais para a sobrevivência e reprodução das bactérias (KHAN et al., 2018).

Outra forma de interferir na síntese do DNA bacteriano é através da ligação da droga a sequências específicas de DNA, que também pode resultar na inibição da transcrição,

resultando na redução da síntese de proteínas bacterianas vitais (THURONYI et al., 2019).

A *dehydroqualene synthase* é uma enzima importante na biossíntese do pigmento carotenoide estafiloxantina em *S. aureus*, o que lhe confere uma coloração dourada característica. Esse pigmento é conhecido por desempenhar um papel crucial na proteção da bactéria contra a morte induzida por neutrófilos do hospedeiro e danos causados por EROs. Conseqüentemente, a inibição da atividade dessa enzima pode levar a um aumento significativo da suscetibilidade da bactéria a danos celulares induzidos pelas EROs (GAO; DAVIES; KAO, 2017; HAFIDI et al., 2021).

A enzima *mannitol-1-phosphate dehydrogenase* (M1PDH), que é codificada pelo gene *mtlD*, possui um papel fundamental no metabolismo do manitol em *S. aureus*. Essa enzima é responsável por manter o pH, suportar altas concentrações de sal, regular a pressão osmótica imposta pelo manitol e reduzir o estresse oxidativo (NGUYEN et al., 2019; ZHU et al., 2019). A inibição dessa enzima pode reduzir a capacidade do microrganismo de utilizar o manitol como fonte de energia e, conseqüentemente, comprometer seu crescimento e sobrevivência (NGUYEN et al., 2019).

Dois grupos de toxinas de *S. aureus* têm sido sugeridas como alvos potenciais para terapias antivirulentas: leucotoxinas e hemolisinas (ASSIS; NEDELJKOVIĆ; DESSEN, 2017). A toxina PVL é uma leucotoxina composta por duas subunidades, LukS-PV e LukF-PV, juntas, essas subunidades formam um poro na membrana plasmática de células alvo, principalmente leucócitos, resultando em sua destruição e necrose tecidual (HOPPE et al., 2019; NAKAMINAMI et al., 2020). Em relação às hemolisinas de *S. aureus*, a mais bem caracterizada é a α -hemolisina, uma toxina formadora de poros que provocam lise nos eritrócitos e leucócitos por meio de uma interrupção da homeostase, causando um influxo de Ca^{2+} e um efluxo de íons K^+ (HOVEN et al., 2019; SUREWAARD et al., 2018).

Considerando que as toxinas podem persistir e continuar causando sintomas mesmo após a eliminação das bactérias do hospedeiro, o desenvolvimento de terapias específicas que visem a sua inibição torna-se uma estratégia altamente promissora no combate às infecções bacterianas toxigênicas. Além de reduzir a gravidade dos sintomas, essa abordagem também pode contribuir para uma recuperação mais rápida do paciente (HARMS et al., 2018).

A PBP2a é responsável pela resistência a antibióticos β -lactâmicos em *S. aureus*, sendo um importante alvo na síntese da parede celular (CONG; YANG; RAO, 2020). Essa enzima apresenta baixa afinidade por β -lactâmicos, o que impede que os antibióticos se liguem a ela e interrompam a síntese da camada de peptidoglicano e da parede celular (GAJDÁCS, 2019; OKWU et al., 2019). Considerando que a PBP2a é o principal mecanismo de resistência

do SARM à maioria dos antibióticos β -lactâmicos, ela se mostra um alvo altamente promissor para o desenvolvimento de novos antibacterianos destinados ao tratamento de infecções por SARM (SHALABY et al., 2020).

As aminoacil-tRNA sintetases são enzimas essenciais no processo de síntese proteica, responsáveis por acoplar um aminoácido específico a um tRNA correspondente. A tirosil-tRNA sintetase (TyrRS) é uma aminoacil-tRNA sintetase da classe I que tem a função de acoplar a tirosina a um tRNA específico (RUBIO GOMEZ; IBBA, 2020). A inibição da atividade da TyrRS afeta o crescimento celular, comprometendo o processo de síntese de proteínas. Por serem enzimas essenciais, as aminoacil-tRNA sintetases bacterianas, incluindo a TyrRS, têm sido alvo de estudos para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos (LADE; KIM, 2021).

Assim sendo, o desenvolvimento de moléculas capazes de interagir e inibir a ação desses alvos pode representar uma abordagem promissora para enfrentar as cepas de *S. aureus* que apresentam resistência aos tratamentos convencionais.

2.9 Menadiona

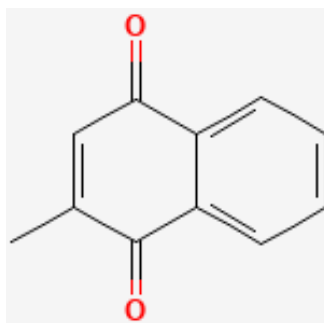
A vitamina K é uma substância lipossolúvel que desempenha um papel importante na coagulação sanguínea e na saúde óssea. Ela é encontrada em diferentes formas, incluindo filoquinona (K1), menaquinona (K2), dihidrofiloquinona (dK) e menadiona (K3) (KAŹMIERCZAK-BARAŃSKA; KARWOWSKI, 2022).

Essa vitamina é um cofator essencial na reação de carboxilação de resíduos de ácido glutâmico nos fatores II, VII, IX e X, levando à formação de ácido gama carboxiglutâmico. A carboxilação permite a ligação das proteínas de coagulação ao cálcio, permitindo assim a interação com os fosfolípidios das membranas de plaquetas e células endoteliais, o que, por sua vez, propicia o processo de coagulação sanguínea (CHATRON et al., 2019). Além disso, a vitamina K também desempenha um papel na regulação do metabolismo ósseo, estimulando a mineralização e a síntese de proteínas ósseas (RODRÍGUEZ-OLLEROS RODRÍGUEZ; DÍAZ CURIEL, 2019).

A vitamina K3, conhecida também como menadiona, é o objeto de estudo dessa pesquisa. Trata-se de um composto sintético que é convertido em vitamina K2 no organismo (KAŹMIERCZAK-BARAŃSKA; KARWOWSKI, 2022). Essa forma é mais potente biologicamente do que as formas naturais de vitaminas K1 e K2 (TINTINO et al., 2018).

A menadiona (Figura 5), 2-metil-1,4-naftoquinona, é um composto do tipo 1,4-NQ que demonstrou uma ampla atividade contra diversos tipos de patógenos. Estudos têm constatado a atividade antimicrobiana dessa substância, destacando sua eficácia no combate a diferentes microorganismos (DEY; RAY; HAZRA, 2014; MONE et al., 2021; SÁNCHEZ-CALVO et al., 2016; TANDON et al., 2005).

Figura 5 – Estrutura química da menadiona



Fonte: PubChem.

Estudos evidenciam sua atividade antibacteriana contra Gram-negativos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, como também para Gram-positivos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *S. pneumoniae* (DEY; RAY; HAZRA, 2014; GANJUN et al., 2014; MASADEH et al., 2012; MONE et al., 2022). Ademais, já foi demonstrada sua atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* (SÁNCHEZ-CALVO et al., 2016), demonstrando inclusive atividade anti-TB frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (DEY; RAY; HAZRA, 2014). Dessa forma, revela-se como uma substância multifacetada capaz de inibir o crescimento de diversos grupos de microrganismos.

Como visto, a menadiona é um composto quinona que, assim como outras quinonas, pode sofrer redução de um ou dois elétrons, resultando na formação da semiquinona. No entanto, as semiquinonas são substâncias muito instáveis e reagem rapidamente com o oxigênio, gerando EROs (KAŻMIERCZAK-BARAŃSKA; KARWOWSKI, 2022). Acredita-se que um dos principais mecanismos de citotoxicidade da menadiona seja o dano oxidativo induzido pelas EROs (MONE et al., 2022; NEGRI et al., 2023). É importante destacar que o estresse oxidativo pode causar danos às membranas, proteínas e DNA (BENZER et al., 2018).

Acredita-se que a ação antibacteriana da menadiona também esteja relacionada à sua estrutura. Estudos sugerem que alguns fenóis e quinonas contidos em grupos hidrofóbicos apresentam potencial atividade anti-SARM, modificando a permeabilidade da membrana

plasmática em bactérias (ANDRADE et al., 2017; TINTINO et al., 2018). Isso facilita a penetração do composto através da membrana lipídica das bactérias (SONG et al., 2020), além de causar distúrbios na membrana bacteriana, como redução do potencial de membrana, perda de íons, citocromo C, proteínas e radicais. Esses eventos podem levar ao colapso da bomba de prótons e à depleção de ATP, sendo responsáveis pela ação antibacteriana observada (ANDRADE et al., 2017).

Diante disso, sugere-se que os efeitos antibacterianos da menadiona possam estar relacionados principalmente à sua capacidade de gerar EROs, as quais desencadeiam uma cascata de eventos que resultam em danos ao DNA e, conseqüentemente, na morte das células bacterianas (KAŹMIERCZAK-BARAŃSKA; KARWOWSKI, 2022; MONE et al., 2022). A estrutura lipofílica da menadiona, adicionalmente, pode perturbar a integridade da membrana celular bacteriana, o que potencializa sua atividade antibacteriana (ANDRADE et al., 2017; TINTINO et al., 2018).

Este estudo teve como objetivo investigar a atividade antimicrobiana da menadiona, tanto isoladamente quanto em combinação com oxacilina, frente a células planctônicas e biofilmes de *Staphylococcus aureus*, incluindo cepas sensíveis e resistentes à metilicina. Além disso, buscou-se elucidar o mecanismo de ação responsável por essa atividade, com base nos estudos existentes na literatura que evidenciam a promissora atividade anti-SARM da menadiona.

3 HIPÓTESES

3.1 Menadiona apresenta atividade antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

3.2 Menadiona, quando associada à oxacilina, apresenta redução na Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

3.3 Menadiona apresenta atividade antibacteriana isolada e associada à oxacilina frente biofilme formado e em formação de *Staphylococcus aureus*.

3.4 Menadiona promove a formação de EROs em cepas de *Staphylococcus aureus*.

3.5 A adição de antioxidantes reverte o efeito antibacteriano da menadiona frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

3.6 Menadiona não apresenta atividade antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* na forma planctônica e de biofilme.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da menadiona frente cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à meticilina, tanto em sua forma planctônica quanto em biofilme, e elucidar o possível mecanismo de ação envolvido.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da menadiona, oxacilina, ácido ascórbico e N-acetilcisteína frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

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

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

4.2.4 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da menadiona e antioxidantes associados, o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) e a interação farmacológica frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

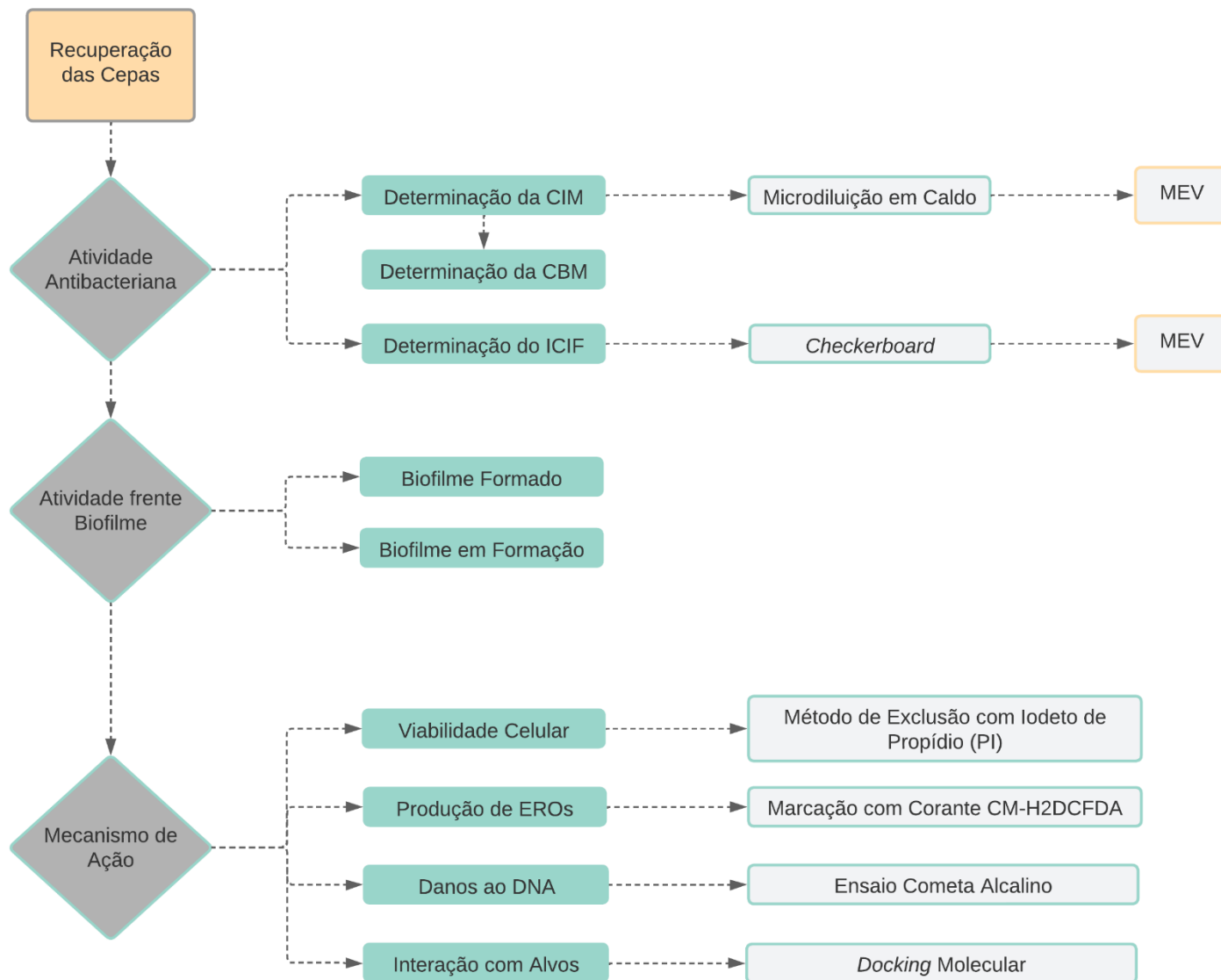
4.2.5 Analisar possíveis alterações morfológicas causadas pela menadiona isolada e associada à oxacilina e antioxidantes frente a cepas de *Staphylococcus aureus* em sua forma planctônica, através de microscopia eletrônica de varredura.

4.2.6 Avaliar a ação antibacteriana da menadiona isolada e associada à oxacilina frente biofilme formado e em formação de *Staphylococcus aureus*.

4.2.7 Avaliar o possível mecanismo de ação da menadiona frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, utilizando técnicas de citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e *docking* molecular.

5 METODOLOGIA

Figura 6 – Fluxograma das etapas metodológicas adotadas no estudo



Fonte: elaborado pela autora.

5.1 Microrganismos

Neste estudo foram utilizadas 18 cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, sendo estas, 14 resistentes à meticilina (SARM) e 4 sensíveis à meticilina (SASM). Duas cepas padrões provenientes da *American Type Culture Collection ATCC®* (SARM 65398™ e *S. aureus* 6538™) foram utilizadas como controle. Todos os isolados pertencem à bacterioteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

As cepas estavam armazenadas em solução contendo caldo Mueller Hinton com alto teor de glicose (Proquimios, Rio de Janeiro, Brasil) e glicerol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e ficaram estocadas em baixas temperaturas (- 20°C). Com a finalidade de reativar as cepas, elas foram descongeladas, ressuspensas em meio caldo Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas em estufa bacteriológica durante 24 horas a 35 ± 2 °C. Posteriormente, o repique foi realizado em ágar Mueller Hinton, sendo as cepas novamente incubadas por 24 horas a 35 ± 2 °C. Todo o procedimento foi realizado seguindo as normas de biossegurança nível 2.

O projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código AF3BA05.

5.2 Drogas

As drogas utilizadas foram a menadiona (MENA), a oxacilina (OXA), a vancomicina (VANCO), o ácido ascórbico (AC) e a N-acetilcisteína (NAC) obtidas comercialmente da Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA). A MENA foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO), obtido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), a 2,5%. A OXA, a VANCO, o AC e a NAC foram diluídos em água destilada estéril.

5.3 Testes de sensibilidade

5.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com a metodologia descrita pelo protocolo M07-A10 (CLSI, 2015) para bactérias aeróbicas, com adaptações. Para a realização do ensaio, foi utilizado o meio de cultura caldo Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia) cátion ajustado (CaMHB) para o teste com a MENA e para o teste com a OXA foi utilizado o meio de cultura CaMHB + 2% de NaCl (Sigma, USA).

Os ensaios foram executados em microplacas para cultura de células de 96 poços. Na coluna 2 foram adicionados 190 µL da droga e, em seguida, foi realizada a diluição seriada até a coluna 11 para o alcance das concentrações desejadas. A MENA foi avaliada na faixa de concentração de 1 – 512 µg/mL e a OXA na faixa de 0,0625 – 1024 µg/mL. Para o preparo do inóculo, as cepas foram semeadas em ágar Mueller Hinton e incubadas em estufa bacteriológica

durante 24 h a 35 ± 2 °C no dia anterior ao teste. A partir desse cultivo foi preparada uma suspensão de inóculo inicial em salina estéril na concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de acordo com a turvação referente à escala 0,5 de McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Em seguida, 100 µL dessas suspensões foram adicionadas em 900 µL de caldo CaMHB para os testes com a MENA, e para os testes com a OXA em 900 µL de caldo CaMHB + 2% de NaCl para obtenção de inóculos com concentração equivalente a 5×10^5 UFC/ mL. Após a diluição, foram adicionados 5 µL do inóculo final em todos os poços, exceto nos poços da coluna 1. Na coluna 1 foi adicionado apenas 95µL do meio de cultura, sendo esta coluna o controle de esterilidade do teste. A coluna 12 foi utilizada como controle positivo do teste, sendo adicionados 95µL do meio de cultura e 5 µL do inóculo. As placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 35 ± 2 °C e em seguida foi realizada a leitura visual.

A CIM foi determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir visualmente 99% do crescimento bacteriano em comparação com o controle positivo (meio de cultura + inóculo). Os pontos de corte foram determinados de acordo com o documento M100-Ed31. Sendo considerada a ocorrência de resistência para a oxacilina a $CIM \geq 4$ µg/mL (CLSI, 2021).

5.3.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após a determinação das CIMs obtidas no teste de sensibilidade, uma alíquota de 10 µL das suspensões \geq CIMs foram semeadas em placas de ágar Mueller Hinton e incubadas em estufa bacteriológica durante 24 h a 35 ± 2 °C. As células viáveis foram contabilizadas e a CBM determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano na superfície do ágar (PARVEKAR et al., 2020).

5.3.2.1 Nível de tolerância

O nível de tolerância foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Das et al. (2016) o qual preconiza o uso da fórmula: Nível de Tolerância = CBM/CIM. $CBM/CIM \geq 16$ a droga é considerada bacteriostática, e quando esta proporção é ≤ 4 , a droga é considerada bactericida.

5.3.3 Associação entre MENA e OXA

A combinação da MENA e OXA foi determinada através do ensaio *checkerboard*. Por meio dessa técnica, é possível avaliar qual o tipo de interação consequente da combinação entre as drogas testadas. Foram utilizadas microplacas para cultura de células de 96 poços, no qual cada poço continha uma combinação única de diferentes concentrações das drogas (MENA + OXA) tendo como referência as CIMs de cada uma das drogas. A interação entre as drogas foi avaliada a partir da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), o qual é obtido pela soma da Concentração Inibitória Fracionada (CIF) de cada droga, que se trata da relação entre a CIM de cada droga utilizada em combinação e a CIM da mesma droga utilizada isoladamente (CHAN et al., 2011; JORGE et al., 2017).

O resultado das combinações seguiu a equação: ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionada) = $CIF_A + CIF_B = \frac{CIM_{A \text{ COMBINADA}}}{CIM_{A \text{ ISOLADA}}} + \frac{CIM_{B \text{ COMBINADA}}}{CIM_{B \text{ ISOLADA}}}$, onde $CIM_{A \text{ ISOLADA}}$ e $CIM_{B \text{ ISOLADA}}$ são as concentrações inibitórias mínimas das drogas isoladas e $CIM_{A \text{ COMBINADA}}$ e $CIM_{B \text{ COMBINADA}}$ são as concentrações inibitórias mínimas das drogas combinadas. A interpretação do resultado foi de acordo com Jorge et al. (2017), na qual a interação entre as drogas foi classificada como sinérgica ($ICIF \leq 0,5$), aditiva ($0,5 < ICIF \leq 1$), indiferente ($1 < ICIF \leq 4$) ou antagônica ($ICIF > 4,0$).

Tabela 1 – Cálculo do ICIF e classificação das interações entre as drogas

Cálculo do ICIF	Parâmetros	Interpretação
$ICIF = CIF_A + CIF_B$	$ICIF \leq 0,5$	Sinergismo
$CIF_A = \frac{CIM_{A \text{ COMBINADA}}}{CIM_{A \text{ ISOLADA}}}$	$0,5 < ICIF \leq 1$	Adição
$CIF_B = \frac{CIM_{B \text{ COMBINADA}}}{CIM_{B \text{ ISOLADA}}}$	$1 < ICIF \leq 4$	Indiferente
	$ICIF > 4,0$	Antagonismo

Fonte: elaborada pela autora.

5.3.4 Associação da MENA com antioxidantes

Para avaliar a participação do efeito antioxidante da N-acetilcisteína (NAC) e do ácido ascórbico (AC) em cepas de *S. aureus* e sua possível interferência no efeito antibacteriano da MENA, foram realizados os ensaios de microdiluição em caldo, seguido de *checkerboard* utilizando microplacas para cultura de células de 96 poços.

Primeiramente, foi realizada a determinação das CIMs da NAC e do AC por meio da técnica de microdiluição em caldo de acordo com a metodologia descrita pelo protocolo

M07-A10 (CLSI, 2015) para bactérias aeróbicas, com adaptações. A NAC foi avaliada na faixa de concentração de 8000 – 7,8125 µg/mL e o AC na faixa de concentração de 20000 – 19,53 µg/mL. A CIM foi determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir visualmente 99% do crescimento bacteriano. A interação entre as drogas foi avaliada a partir da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) obtida através da técnica *checkerboard* (CHAN et al., 2011; JORGE et al., 2017).

5.3.5 Análise dos dados

Os ensaios foram realizados em triplicata, em dias diferentes. Após a obtenção dos resultados, foram realizadas as médias aritméticas da CIM, da CBM e do ICIF.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura em células planctônicas

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada com a finalidade de avaliar as alterações morfológicas das células planctônicas de SARM após o tratamento com as drogas testadas. Para o ensaio, foi utilizada uma cepa clínica representativa de SARM. Esse ensaio foi realizado de acordo com o protocolo de Queiroz et al. (2021) com algumas modificações. Considerando a alta CIM do composto AC, foi estabelecida uma concentração subtóxica de 0,5 mM (88,06 µg/mL) para prosseguir com o experimento. Essa concentração foi selecionada por não apresentar efeitos tóxicos significativos, permitindo assim a continuidade das investigações.

Inicialmente, a cepa foi semeada em ágar Mueller Hinton e incubada em estufa bacteriológica durante 24 h a 35 ± 2 °C. A partir desse cultivo foi preparada uma suspensão de inóculo em solução salina estéril 0,85% na concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de acordo com a turvação referente à escala 0,5 de McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil) e, em seguida, diluído até a concentração equivalente a 5×10^5 UFC/ mL em meio caldo BHI. As suspensões celulares foram tratadas com MENA (CIM), OXA (CIM), MENA + OXA (CIM), MENA + NAC (CIM) e MENA + AC (CIM + 0,5 mM) e incubadas durante 24 h a 35 ± 2 °C. Foi utilizado como controle de crescimento suspensão de células no meio de cultura.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e lavadas 3 vezes com solução salina estéril 0,85%. Em seguida, as células foram ressuspensas em caldo BHI. As Thermanox® Lamínulas (Thermo Fisher Scientific, Nova Iorque, Estados Unidos da América) foram adicionadas nos poços de uma microplaca de 12 poços de poliestireno

e tratadas com 100 µL de silano a 2,5%, sendo deixadas secar por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, 150 µL das suspensões anteriormente preparadas foram adicionadas sobre as lamínulas. Logo após, adicionou-se 250 µL da solução de fixação de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15 M. As placas foram incubadas *overnight* a 4 °C.

Posteriormente, as lamínulas foram lavadas duas vezes com 300 µL da solução tampão cacodilato 0,15 M. Em seguida, foi realizada a etapa de desidratação alcoólica, que consiste em adicionar 500 µL de etanol em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, e 100%), sendo que cada concentração ficou em contato com a lamínula por 10 minutos antes de adicionar a próxima. Esse procedimento foi realizado duas vezes para cada concentração. Após a secagem à temperatura ambiente, adicionou-se 150 µL de hexametildisilazano (HMDS) (Polysciences Europe, Alemanha) em cada lamínula e foram deixadas a temperatura ambiente para secar novamente. Por fim, as lamínulas foram transferidas para uma nova microplaca de 12 poços de poliestireno e armazenadas em dessecador para posterior leitura. As amostras foram analisadas no equipamento Quanta 450 FEG – FEI, em alto vácuo a 15kV. As imagens obtidas foram processadas com o software Photoshop (Adobe Systems, EUA).

5.5 Atividade antibiofilme

5.5.1 Avaliação da atividade da MENA isolada e associada à OXA sobre biofilmes de *S. aureus*

Após a conclusão dos ensaios de sensibilidade em células planctônicas e constatação do potencial efeito antibacteriano da MENA isolada e associada à OXA nessas células, ensaios para avaliar o potencial efeito dessa substância sobre biofilmes de *Staphylococcus aureus* também foram realizados.

Os ensaios foram executados em microplacas para cultura de células de 96 poços de acordo com a metodologia descrita por Blando et al. (2019) e Brambilla et al. (2017) com algumas modificações. Foram selecionadas 4 cepas de *S. aureus* provenientes da bacterioteca do LABIMAN, das quais 3 eram de SARM (1 com efeito sinérgico quando associada à OXA e 2 com efeito aditivo quando associada à OXA) e 1 de SASM (com efeito sinérgico quando associada à OXA). A MENA foi testada nas concentrações referentes à CIM/2, CIM, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM isoladas. A OXA foi empregada na concentração referente à CIM isolada. Enquanto para a associação de MENA + OXA, as concentrações utilizadas foram: CIM das

drogas isoladas (CIM_{ISOLADA} da MENA + CIM_{ISOLADA} da OXA) e CIM das drogas combinadas (CIM_{COMBINADA} da MENA + CIM_{COMBINADA} da OXA).

As cepas de SARM e SASM foram previamente semeadas em ágar Mueller Hinton e incubadas em estufa bacteriológica durante 24 h a 35 ± 2 °C. Posteriormente, as cepas foram inoculadas em 3 mL de caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Kasvi, Paraná, Brazil) suplementado com 2% de glicose (Isifar, Rio de Janeiro, Brazil) e incubadas em estufa bacteriológica durante 24 h sob as mesmas condições. As células foram então centrifugadas a 2500 rpm por 5 min e lavadas 3 vezes com solução salina estéril 0,85%. Após as lavagens das células, foi preparada uma suspensão de inóculo em caldo TSB na concentração aproximada de 3×10^8 UFC/mL de acordo com a turvação referente à escala 1 de McFarland. Para o ensaio de biofilme formado, foram adicionados 200 µL do inóculo na microplaca para cultura de células de 96 poços. As placas foram então incubadas a 35 °C por 48 h. Após a incubação, o sobrenadante foi aspirado e a placa foi lavada delicadamente com solução salina para remoção das células não aderentes. Após a formação de biofilme na microplaca, foram adicionados 200 µL das soluções de MENA e OXA em suas respectivas concentrações preconizadas e incubado a 35 °C por mais 24 horas. Para avaliar o efeito das substâncias em biofilme em formação, junto ao inóculo foram adicionadas simultaneamente as soluções de drogas em suas respectivas concentrações preconizadas, na razão de 1:1 (100 µL de inóculo + 100 µL de droga). As placas foram então incubadas a 35 °C por 48 h. Após esse período, tanto para biofilmes formados quanto em formação, foram adicionados 100 µL do corante brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT) (1 mg/mL) (Sigma, USA) e levado novamente para a estufa bacteriológica por mais 2 h a 35 °C, no escuro. Após esse período, o MTT foi removido dos poços e adicionados 150 µL de DMSO. Após 15 minutos, retirou-se uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada poço e foi feita a transferência para uma nova microplaca. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 492 nm. A redução de crescimento foi comparada ao controle do teste.

5.5.2 Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados a partir da média \pm EPM (Erro Padrão da Média) de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguidos pelos testes de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.6 Avaliação do mecanismo de morte celular

5.6.1 Preparo das suspensões e tratamento das células

Com o propósito de compreender os mecanismos de ação da MENA, foram realizadas análises por meio da citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. Para os ensaios, foi utilizada uma cepa clínica representativa de SARM. Esta cepa foi semeada em ágar Mueller Hinton a 35 °C por 24 h e, em seguida, suspensa em 5 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e reincubada sob as mesmas condições anteriores. As células foram então centrifugadas a 2500 rpm por 5 min e lavadas 3 vezes com *Phosphate-Buffered Saline* (PBS). Após a lavagem das células, foi preparada uma suspensão de inóculo em caldo BHI de 5×10^5 UFC/mL. Para a determinação da viabilidade celular, detecção de espécies reativas de oxigênio, externalização de fosfatidilserina e danos no DNA. As suspensões celulares foram tratadas com MENA (CIM), MENA (2xCIM), OXA (CIM) e MENA + OXA (CIM). Com base nos resultados da interação entre a MENA e os antioxidantes, a análise do mecanismo de ação foi conduzida apenas com o antioxidante AC. Uma concentração subtóxica de 0,5 mM foi estabelecida e utilizada para prosseguir com o experimento. Concentrações de AC (0,5 mM) e MENA + AC (CIM + 0,5 mM) foram utilizadas. A VANCO (4 µg/mL) foi utilizada como controle de morte e o meio de cultura BHI foi utilizado como controle negativo do teste. As células tratadas foram incubadas a 35 °C por 24 h (DA SILVA et al., 2013; DE ANDRADE NETO et al., 2020; DO AV SÁ et al., 2019).

5.6.2 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com iodeto de propídio (PI). Após exposição aos tratamentos citados no item 5.6.1, as células de SARM foram marcadas com o marcador PI (2µg/mL) e analisadas por citometria de fluxo. A fluorescência celular foi determinada no citômetro *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS) e analisada usando o software CytoSoft 4.1. Um total de 10.000 eventos foram avaliados por análise (n = 2) e os detritos celulares foram omitidos (BATISTA DE ANDRADE NETO et al., 2019; SHI et al., 2007; SILVA et al., 2022).

5.6.3 Detecção de espécies reativas de oxigênio

Para a detecção da produção de EROs, as células de SARM foram previamente tratadas de acordo com o item 5.6.1 e incubadas com 20 μ M de CM-H₂DCFDA [5-(e-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína acetil éster] (Sigma, USA) por 30 min, no escuro, a 35 °C. Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS e avaliadas através do citômêtro de fluxo *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS) e analisada usando o software CytoSoft 4.1. (DA SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014).

5.6.4 Análise de dano ao DNA

O ensaio cometa alcalino foi empregado para avaliar o índice de dano ao DNA ocasionado após exposição das células ao tratamento realizado de acordo com o item 5.6.1. O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Miloshev; Mihayloy; Anachkova (2002). Em cada lâmina de vidro foram espalhados até 200 μ L de agarose 0,5% (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) e, em seguida, as lâminas foram colocadas para secar a temperatura ambiente para posterior aplicação das suspensões de células sobre sua superfície. As células de SARM foram centrifugadas em microcentrífuga de eppendorf durante 5 min, lavadas com água destilada, e ressuspensas em tampão S (Sorbitol 1 M, KH₂PO₄ 25 mM; pH 6,5). Alíquotas de aproximadamente 5×10^4 células foram dissolvidas em agarose 0,7% de baixo ponto de fusão (37 °C) contendo Zymolyase 20T (2 mg/ mL) e imediatamente espalhadas sobre lâminas de vidro, cobertas com lamínulas e incubadas durante 20 min a 30 °C. A fim de minimizar a atividade de enzimas celulares endógenas, todos os procedimentos posteriores foram realizados em sala fria a 8 a 10 °C.

As lamínulas foram removidas e as lâminas incubadas em uma solução de NaOH 30 mM, NaCl 1 M, laurilsarcosina a 0,1% e EDTA 50 mM (pH 12,3) durante 1 hora. As lâminas foram lavadas três vezes durante 20 minutos cada em uma solução de NaOH 30 mM e EDTA 10 mM (pH 12,4) para o desenrolamento do DNA e, em seguida, foram submetidas a eletroforese no mesmo tampão. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 0,5 V/cm e 24 mA. Após a eletroforese, os géis foram neutralizados, submergindo as lâminas em Tris HCl 10 mM (pH 7,5) durante 10 minutos, seguido de incubações consecutivas por 10 minutos em etanol 76% e 96%. Por fim, as lâminas foram secas à temperatura ambiente, coradas com brometo de etídio (1 mg/mL) e visualizadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Tokio, Japão).

Para cada grupo experimental, 100 células foram selecionadas, codificadas e analisadas cegamente quanto à migração de DNA. A leitura foi feita através de escores de acordo com o tamanho da cauda (de não danificado: 0 a dano máximo: 4), e o valor de índice

de dano foi calculado para cada amostra de células. Assim, o índice de dano variou de zero (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (BURLINSON et al., 2007; COLLINS, 2004).

5.6.5 Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados a partir da média \pm EPM (Erro Padrão da Média) de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguidos pelos testes de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.7 Docking molecular

A técnica de *docking* molecular foi utilizada com o propósito de entender a afinidade e os tipos de ligações envolvidos na interação entre a MENA e alguns alvos importantes de SARM. Essa ferramenta computacional trata-se de uma sequência de algoritmos que realizam uma simulação de encaixe molecular, tendo como base a teoria de campo de força clássico (PINZI; RASTELLI, 2019).

5.7.1 Design e otimização dos ligantes

A estrutura química da MENA (CID4055) foi obtida no repositório Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4055>). O design dos ligantes foi realizado usando o código *MarvinSketch*TM (CHEMAXON, 2019; CSIZMADIA, 2019). Sua conformação mais estável, isto é, de menor energia foi salva e otimizada utilizando o campo de força *Merck Molecular Force Field 94* (MMFF94), usando ciclos de 50 interações e algoritmo *steepest* descende a partir do código Avogadro TM (<http://avogadro.cc/>) (HANWELL et al., 2012).

5.7.2 Obtenção e preparação dos alvos

Foram obtidas onze estruturas de alvos proteicos relevantes para a patogênese do SARM, que desempenham um papel crucial nas interações hospedeiro-patógeno e na virulência

da bactéria, disponíveis no repositório *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). Essas estruturas foram utilizadas para avaliar o mecanismo de ação da MENA contra os receptores do SARM por meio de simulações de *docking* molecular.

Os seguintes alvos foram utilizados: o alvo “*Staphylococcus aureus FtsA complexed with ATP*” (PDB 3WQU), resolução de 2.80 Å, no qual foram mantidos os íons Mg^{+2} (RAGUNATHAN et al., 2019); o alvo *Wild-type S. aureus DHFR* (PDB 2W9G), resolução de 1.95 Å, no qual o inibidor cocrystalizado e as moléculas de água foram removidos e o NADPH foi mantido na enzima por ser um cofator necessário para a catálise (RAIMONDI et al., 2019; TONELLI et al., 2017); o alvo “*The twinned 3.35Å structure of S. aureus Gyrase complex with Ciprofloxacin and DNA*” (PDB 2XCT) com resolução de 3.35 Å, que teve o seu inibidor cocrystalizado removido e os íons de Mn foram mantidos na enzima DNA girase. De maneira similar ao DNA complexado a girase, a enzima não complexada; “*Crystal Structure of S.A. gyrase in complex with Compound 7*” (PDB 5BS3), resolução de 2.65 Å, também teve removidos o seu inibidor cocrystalizado, os íons sulfato e as moléculas de água, os íons de Mn foram mantidos na DNA girase (BATISTA DE ANDRADE NETO et al., 2021; DIGHE; COLLET, 2020; KHAN et al., 2018); o alvo “*5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3'-Benzimidazole Complex*” (PDB 453D) com resolução de 1.80 Å também foi utilizado, no qual todos os resíduos foram removidos da enzima (BATISTA DE ANDRADE NETO et al., 2021); o alvo “*Crystal structure of the C(30) carotenoid dehydrosqualene synthase from Staphylococcus aureus complexed with bisphosphonate BPH-652*” (PDB 2ZCQ), resolução de 2.3 Å, que teve os seus íons Mg^{+2} mantidos durante a sua preparação (GAO; DAVIES; KAO, 2017; RIBEIRO et al., 2020); o alvo “*Crystal structure of MtlD from Staphylococcus aureus at 1.7-Angstrom resolution*” (PDB 5JNM) com resolução de 1.70 Å (NGUYEN et al., 2019); o alvo “*Structure of the Pantone-Valentine Leucocidin S Component from Staphylococcus aureus*” (PDB 1T5R) com resolução de 2.00 Å (HOPPE et al., 2019); o alvo “*S. aureus α-hemolysin monomer in complex with Fab*” (PDB 4IDJ), resolução de 3.36 Å, no qual foi mantido o Fab LTM14 no alvo *S. aureus α-hemolysin* sendo este, um fragmento de anticorpo monoclonal humano de alta afinidade para a toxina alfa de *Staphylococcus aureus* (HOVEN et al., 2019; SUREWAARD et al., 2018); o alvo “*Crystal structure of ceftaroline acyl-PBP2a from MRSA with non-covalently bound ceftaroline and muramic acid at allosteric site obtained by soaking*” (PDB 3ZfZ) de resolução 2.25 Å, onde foram removidas as moléculas de água e o inibidor cocrystalizado (AI8) da enzima e os íons de Cl, de Cd e o ácido murâmico foram mantidos, o antibacteriano anti-SARM β-lactâmico (1W8) também foi mantido na enzima por sua capacidade de estimular a abertura alostérica do

sítio ativo (BATISTA DE ANDRADE NETO et al., 2021; OKWU et al., 2019); por fim, o alvo “*Crystal structure of S. aureus TyrRS in complex with SB-239629*” (PDB 1JIJ), resolução de 3.20 Å (LADE; KIM, 2021; RUBIO GOMEZ; IBBA, 2020).

A etapa de preparação de todos os alvos foi finalizada pela remoção das moléculas de água e inibidores cocrystalizados e adição dos hidrogênios polares e cargas *Gasteiger* (YAN et al., 2014), utilizando o código Autodocktools™ (HUEY; MORRIS; FORLI, 2012).

5.7.3 Procedimentos gerais de *docking*

A partir do código AutodockVina (TROTT; OLSON, 2010), foi realizado o estudo de *docking* molecular, 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), sendo realizadas 50 simulações independentes. Os resultados de *docking* foram analisados utilizando os códigos *Discovery studio visualizer™ viewer* (BIOVIA, 2016), *Pymol* (DELANO, 2020) e UCSF Chimera™ (PETTERSEN et al., 2004).

São geradas a partir de cada simulação de *docking* molecular 20 poses do ligante com relação ao alvo proteico, em que a *Best Pose* é selecionada por meio do critério de validação das simulações RMSD (*Root Mean Square Deviation*) com valores de até 2 Å (YUSUF et al., 2008) e da energia de afinidade (*G*, com valores iguais ou inferiores a -6.0 kcal/mol (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014). Os valores das constantes de inibição (K_i) (equação 1) de cada complexo formado, foram determinados a partir da energia de afinidade (KADELA-TOMANEK et al., 2021), sendo K_i a constante de inibição, ΔG a energia de afinidade ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), R a constante do gás ($8.32 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) e T a temperatura absoluta (298K).

$$K_i = e^{(\Delta G/RT)} \quad (1)$$

A força das ligações de hidrogênio foi avaliada a partir dos valores das distâncias entre os átomos doadores e receptores, em que as interações que ficaram entre 2.5-3.1 Å são consideradas ligações fortes (*Strong*), entre 3.1-3.55 Å são classificadas como moderadas (*Average*) e superiores a 3.55 Å são consideradas ligações fracas (*Weak*) (IMBERTY et al., 1991).

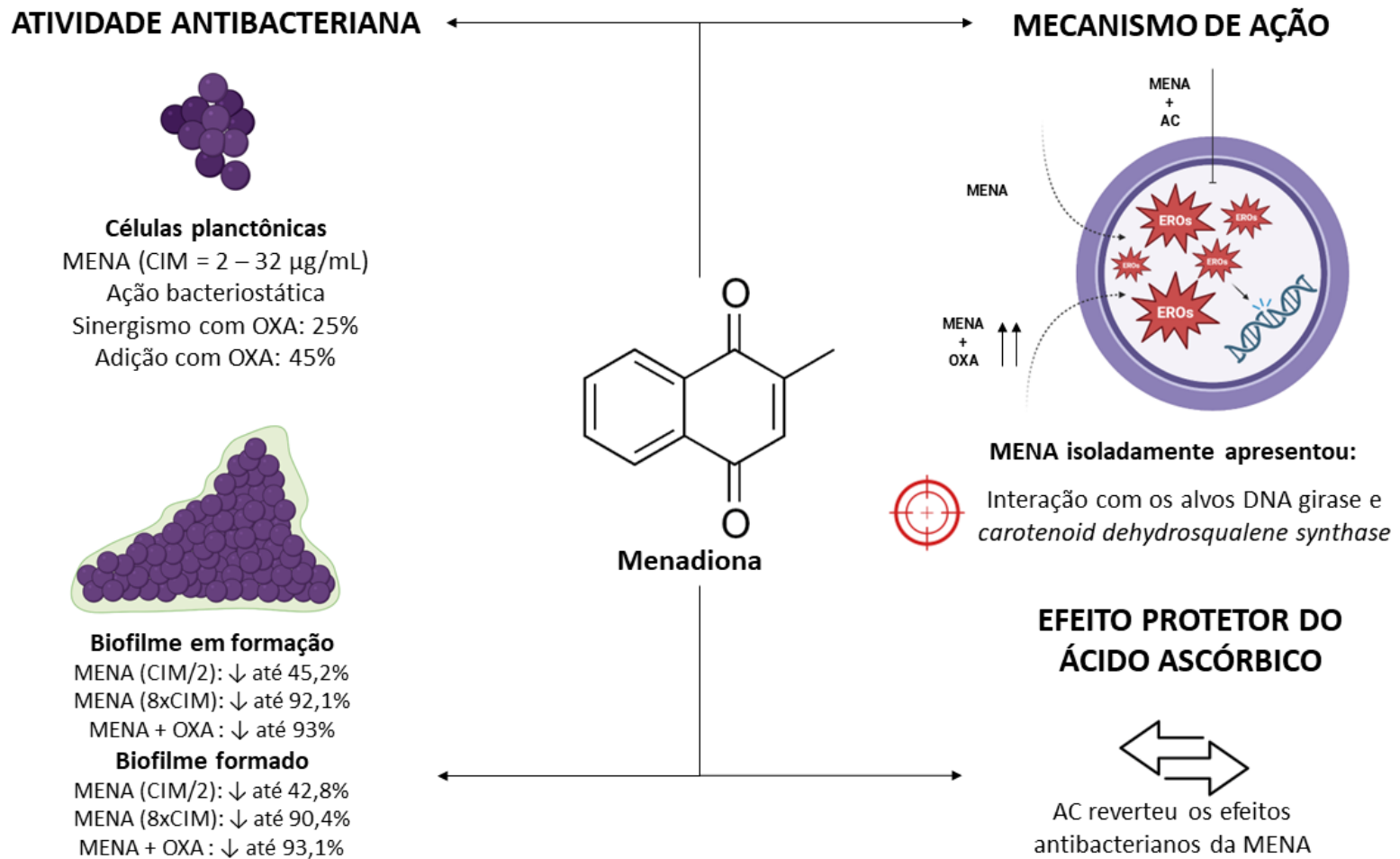
Tabela 2 – Parâmetros utilizados nas simulações de *docking* molecular

Parâmetros <i>grid box</i>	Ciclo Celular	DNA				EROs		Fatores de Virulência		Parede Celular	RNA
	<i>S. aureus</i> FtsA ^a	<i>Wild-type 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) <i>carotenoid dehydrosqualene synthase</i> ^f	MtID ^g	<i>Panton-Valentine Leucocidin S Component</i> ^h	<i>S. aureus alpha hemolysin</i> ⁱ	Acyl-PBP2a ^j	<i>S. aureus</i> TyrRS ^k
<i>center_x</i>	14.648	-4.854	17.747	-2.314	14.674	18.375	37.829	23.360	-46.689	1.716	-9.592
<i>center_y</i>	13.801	-27.055	37.969	-28.737	21.536	54.992	35.140	71.056	13.249	38.268	18.099
<i>center_z</i>	-12.706	4.446	24.799	-27.418	9.84	38.404	18.453	23.875	40.756	44.556	93.967
<i>size_x</i>	106	90	126	126	52	108	92	126	76	116	74
<i>size_y</i>	82	90	126	126	52	100	102	126	62	84	114
<i>size_z</i>	126	86	126	126	86	116	126	126	126	126	92

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

6 RESULTADOS

Figura 7 – Visão geral dos resultados obtidos



Fonte: elaborada pela autora.

6.1 Atividade antibacteriana da MENA isolada frente a cepas planctônicas de *S. aureus*

A MENA apresentou atividade antibacteriana frente todas as cepas de *S. aureus* testadas, com valores de CIM variando entre 2 e 32 µg/mL. A maioria das cepas (95%) apresentaram valor de CIM entre 2 e 8 µg/mL, enquanto uma única cepa (SARM ATCC 65398™) apresentou CIM de 32 µg/mL. Em relação à OXA, as cepas apresentaram CIMs entre 0,125 e 1024 µg/mL, permitindo distinguir entre cepas resistentes e cepas sensíveis (resistência à oxacilina: CIM ≥ 4 µg/mL) (Tabela 3).

6.2 Atividade antibacteriana da MENA associada à OXA frente a cepas planctônicas de *S. aureus*

A associação de MENA + OXA apresentou interação farmacológica em 70% das cepas de *S. aureus* testadas. De acordo com a Tabela 3, a associação apresentou efeito aditivo em 45% das cepas e efeito sinérgico em 25%, resultando na redução das CIMs da MENA e da OXA em até 87,5%. Para as demais cepas, essa associação foi considerada indiferente (30%). Não foi observada interação antagônica.

6.3 Efeito bacteriostático da MENA

A concentração bactericida mínima (CBM) da MENA foi ≥ 512 µg/mL para todas as cepas testadas. O nível de tolerância ultrapassou o valor de 16 (Tabela 3), caracterizando a droga como bacteriostática (CIM/CBM ≥ 16).

Tabela 3 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da MENA e da OXA isoladas e em combinação, e determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da MENA frente a cepas de *Staphylococcus aureus*

Cepas ^a	CIM ^b (µg/mL)					Interpretação	CBM ^d	Nível de Tolerância ^e	Interpretação
	MENA _{ISOLADA}	OXA _{ISOLADA}	MENA _{COMBINADA}	OXA _{COMBINADA}	ΣICIF ^c				
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 TM	8	0,125	4	0,0625	1	ADI	>1024	>128	Bacteriostática
<i>S. aureus</i> 1*	8	2	1	0,25	0,25	SIN	>1024	>128	Bacteriostática
<i>S. aureus</i> 2	4	2	1	0,5	0,5	SIN	>1024	>256	Bacteriostática
<i>S. aureus</i> 3	4	0,25	1	0,0625	0,5	SIN	1024	256	Bacteriostática
<i>S. aureus</i> 4	4	0,5	2	0,25	1	ADI	1024	256	Bacteriostática
SARM ATCC 65398 TM	32	8	32	8	2	IND	>1024	>32	Bacteriostática
SARM 1*/**/**	8	256	1	32	0,25	SIN	1024	256	Bacteriostática
SARM 2*	4	64	2	32	1	ADI	1024	256	Bacteriostática
SARM 3*	8	256	4	128	1	ADI	512	64	Bacteriostática
SARM 4	4	256	4	256	2	IND	512	128	Bacteriostática
SARM 5	8	128	2	32	0,5	SIN	1024	128	Bacteriostática
SARM 6	4	64	4	64	2	IND	1024	256	Bacteriostática
SARM 7	4	32	4	32	2	IND	1024	256	Bacteriostática
SARM 8	4	16	4	16	2	IND	512	128	Bacteriostática
SARM 9	2	128	1	64	1	ADI	512	256	Bacteriostática
SARM 10	4	1024	2	512	1	ADI	512	128	Bacteriostática
SARM 11	8	64	4	32	1	ADI	1024	128	Bacteriostática
SARM 12	2	64	2	64	1	ADI	512	256	Bacteriostática
SARM 13	8	512	4	256	1	ADI	1024	128	Bacteriostática
SARM 14	2	256	2	256	2	IND	1024	512	Bacteriostática

Fonte: elaborada pela autora.

- a. Cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de coleção.
 - b. CIM – Concentração Inibitória Mínima necessária para inibir 99% do crescimento bacteriano após 24h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ de incubação. MENA: Menadiona; OXA: Oxacilina. A técnica de microdiluição em caldo foi realizada de acordo com o protocolo M07-A10 do CLSI (2015). A resistência do *S. aureus* foi estabelecida de acordo com o documento M07-A10, sendo consideradas resistentes as cepas que apresentaram $\text{CIM} \geq 4 \mu\text{g/ml}$. A CIM foi representada pela média aritmética dos três experimentos realizados em dias diferentes.
 - c. O efeito da interação entre MENA e OXA foram calculados com base na fórmula da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). A interpretação do resultado foi de acordo com Jorge (2017), onde sinergismo ($\text{ICIF} \leq 0,5$), adição ($0,5 < \text{ICIF} \leq 1$), indiferente ($1 < \text{ICIF} \leq 4$) e antagonismo ($\text{ICIF} > 4,0$).
 - d. CBM: Concentração Bactericida Mínima. Menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano na superfície do ágar.
 - e. Nível de Tolerância = CBM/CIM . Quando a razão CBM/MIC é ≥ 16 para cepas bacterianas, a droga é considerada bacteriostática, e quando esta proporção é ≤ 4 , a droga é considerada bactericida.
- * Cepas selecionadas para os ensaios de biofilme.
- ** Cepa selecionada para os ensaios de mecanismo de ação.
- ***Cepa selecionada para os ensaios de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

6.4 Interferência de antioxidantes na atividade antibacteriana da MENA

6.4.1 Interferência da NAC na atividade antibacteriana da MENA

Com o propósito de avaliar o efeito antioxidante da NAC na possível formação de EROs promovidas pela MENA, que pode estar associada ao seu efeito antibacteriano, foi realizada a associação entre essas duas substâncias (MENA + NAC).

Primeiramente, foi determinada a CIM da NAC para as cepas de *S. aureus* testadas. Para todas as cepas, o valor da CIM foi de 4000 µg/mL (Tabela 4). A associação entre MENA + NAC mostrou-se indiferente em 100% das cepas testadas, evidenciando que o antioxidante NAC não interfere na atividade antibacteriana da MENA.

Tabela 4 – Efeito antibacteriano da MENA frente a cepas de *Staphylococcus aureus* após adição de substância antioxidante (NAC)

Cepas ^a	CIM ^b (µg/ml)				ΣICIF ^c	Interpretação
	MENA _{ISOLADA}	NAC _{ISOLADA}	MENA _{COMBINADA}	NAC _{COMBINADA}		
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 TM	8	4000	8	4000	2	IND
<i>S. aureus</i> 1	8	4000	8	4000	2	IND
<i>S. aureus</i> 2	4	4000	4	4000	2	IND
<i>S. aureus</i> 3	4	4000	4	4000	2	IND
<i>S. aureus</i> 4	4	4000	4	4000	2	IND
SARM ATCC 65398 TM	32	4000	32	4000	2	IND
SARM 1	8	4000	8	4000	2	IND
SARM 2	4	4000	4	4000	2	IND
SARM 3	8	4000	8	4000	2	IND
SARM 4	4	4000	4	4000	2	IND
SARM 5	8	4000	8	4000	2	IND
SARM 6	4	4000	4	4000	2	IND
SARM 7	4	4000	4	4000	2	IND
SARM 8	4	4000	4	4000	2	IND
SARM 9	2	4000	2	4000	2	IND
SARM 10	4	4000	4	4000	2	IND
SARM 11	8	4000	8	4000	2	IND
SARM 12	2	4000	2	4000	2	IND
SARM 13	8	4000	8	4000	2	IND
SARM 14	2	4000	2	4000	2	IND

Fonte: elaborada pela autora.

- a. Cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de coleção.
- b. CIM – Concentração Inibitória Mínima necessária para inibir 99% do crescimento bacteriano após 24h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ de incubação. MENA: Menadiona; NAC: N-acetilcisteína. A técnica de microdiluição em caldo foi realizada de acordo com o protocolo M07-A10 do CLSI (2015).
- c. O efeito da interação entre MENA e NAC foram calculados com base na fórmula da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). A interpretação do resultado foi de acordo com Jorge (2017), onde sinergismo ($\text{ICIF} \leq 0,5$), adição ($0,5 < \text{ICIF} \leq 1$), indiferente ($1 < \text{ICIF} \leq 4$) e antagonismo ($\text{ICIF} > 4,0$).

6.4.2 Interferência do AC na atividade antibacteriana da MENA

Foi utilizado também o AC como substância antioxidante e analisado seu efeito sobre a CIM da MENA a partir da associação entre essas duas substâncias (MENA + AC).

O valor da CIM encontrada para o AC em cepas de *S. aureus* foi $> 20.000 \mu\text{g/mL}$ para todas as cepas (Tabela 5). Como não foi possível determinar a CIM específica para cada cepa, foi utilizada uma concentração subtóxica de AC na concentração de 0,5 mM para dar continuidade aos ensaios. Apenas a cepa *S. aureus* ATCC 6538TM apresentou-se indiferente para a combinação com AC. Para todas as demais cepas (95%), a combinação com o AC aumentou a CIM da MENA (16 – 256 $\mu\text{g/mL}$), apresentando efeito antagônico entre as substâncias, como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Efeito antibacteriano da MENA frente a cepas de *Staphylococcus aureus* após adição de substância antioxidante (AC)

Cepas ^a	CIM ^b (µg/ml)			ΣICIF ^c	Interpretação
	MENA _{ISOLADA}	AC _{ISOLADA}	MENA _{COMBINADA} *		
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 TM	8	>20000	16	4	IND
<i>S. aureus</i> 1	8	>20000	32	8	ANT
<i>S. aureus</i> 2	4	>20000	16	8	ANT
<i>S. aureus</i> 3	4	>20000	16	8	ANT
<i>S. aureus</i> 4	4	>20000	32	16	ANT
SARM ATCC 65398 TM	32	>20000	128	8	ANT
SARM 1	8	>20000	32	8	ANT
SARM 2	4	>20000	32	16	ANT
SARM 3	8	>20000	32	8	ANT
SARM 4	4	>20000	64	32	ANT
SARM 5	8	>20000	256	64	ANT
SARM 6	4	>20000	128	64	ANT
SARM 7	4	>20000	128	64	ANT
SARM 8	4	>20000	64	32	ANT
SARM 9	2	>20000	16	16	ANT
SARM 10	4	>20000	16	8	ANT
SARM 11	8	>20000	64	16	ANT
SARM 12	2	>20000	64	64	ANT
SARM 13	8	>20000	32	8	ANT
SARM 14	2	>20000	32	32	ANT

Fonte: elaborada pela autora.

- Cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de coleção.
- CIM – Concentração Inibitória Mínima necessária para inibir 99% do crescimento bacteriano após 24h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ de incubação. MENA: Menadiona; AC: Ácido Ascórbico. A técnica de microdiluição em caldo foi realizada de acordo com o protocolo M07-A10 do CLSI (2015).
- O efeito da interação entre MENA e AC foram calculados com base na fórmula da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). A interpretação do resultado foi de acordo com Jorge (2017), onde sinergismo ($\text{ICIF} \leq 0,5$), adição ($0,5 < \text{ICIF} \leq 1$), indiferente ($1 < \text{ICIF} \leq 4$) e antagonismo ($\text{ICIF} > 4,0$).

6.5 Análise de imagens de SARM obtidas por MEV

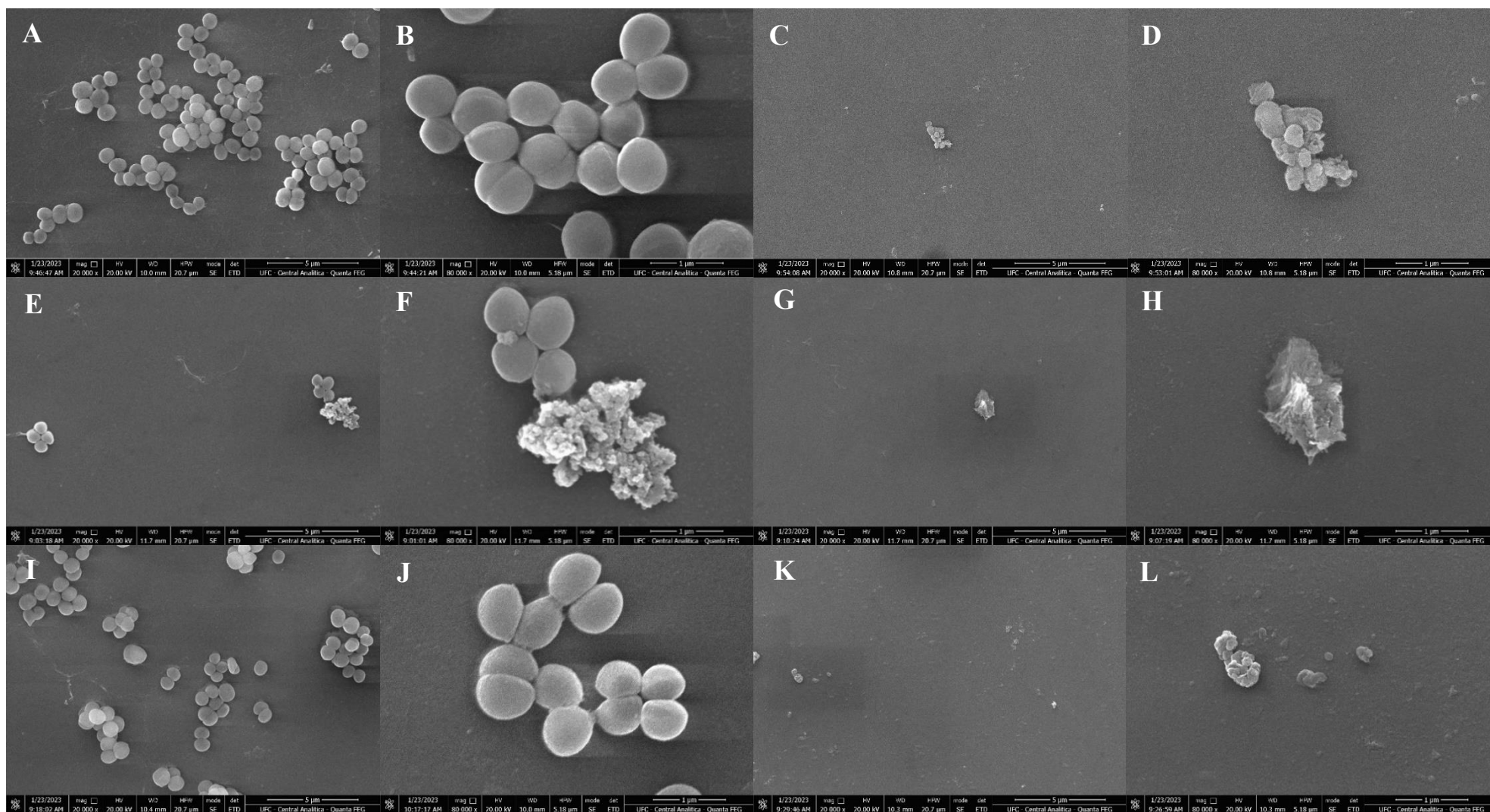
Foram obtidas imagens de MEV para evidenciar as alterações estruturais nas células de SARM após tratamento com diferentes combinações. No controle (Figura 8A e 8B), as células mostraram-se íntegras, com morfologia preservada e bem definida. Foi possível observar a organização estrutural característica das células de cocos agrupados, que é típica do *S. aureus*.

Após o tratamento com MENA (Figura 8C e 8D), ocorreu perda da estrutura celular e danos visíveis na parede celular, resultando em uma forma celular irregular e desfigurada.

Nas células tratadas com OXA isoladamente (Figura 8E e 8F) e em combinação com MENA (Figura 8G e 8H), foram observadas células com o padrão semelhante ao destacado anteriormente. No entanto, a associação de MENA + OXA resultou em danos mais acentuados, levando à perda total da estrutura celular.

A associação de MENA com AC (Figura 8I e 8J) não apresentou efeitos significativos na morfologia celular em comparação com o grupo controle. As células mantiveram-se íntegras, exibindo a típica estrutura de cocos agrupados. No entanto, na associação MENA + NAC (Figura 8K e 8L), houveram alterações na estrutura celular semelhantes às observadas com o tratamento isolado de MENA. Essas observações indicam que NAC não interferiu na atividade da MENA.

Figura 8 – Microscopia Eletrônica de Varredura de células planctônicas de SARM



Fonte: elaborada pela autora.

A e B: Controle. C e D: Células tratadas com 8 $\mu\text{g/mL}$ de MENA. E e F: Células tratadas com 256 $\mu\text{g/mL}$ de OXA. G e H: Células tratadas com associação de MENA + OXA (8 $\mu\text{g/mL}$ + 256 $\mu\text{g/mL}$). I e J: Células tratadas com associação de MENA + AC (8 $\mu\text{g/mL}$ + 0,5mM). K e L: Células tratadas com associação de MENA + NAC (8 $\mu\text{g/mL}$ + 4000 $\mu\text{g/mL}$). Foram utilizadas ampliações de 20000x e 80000x.

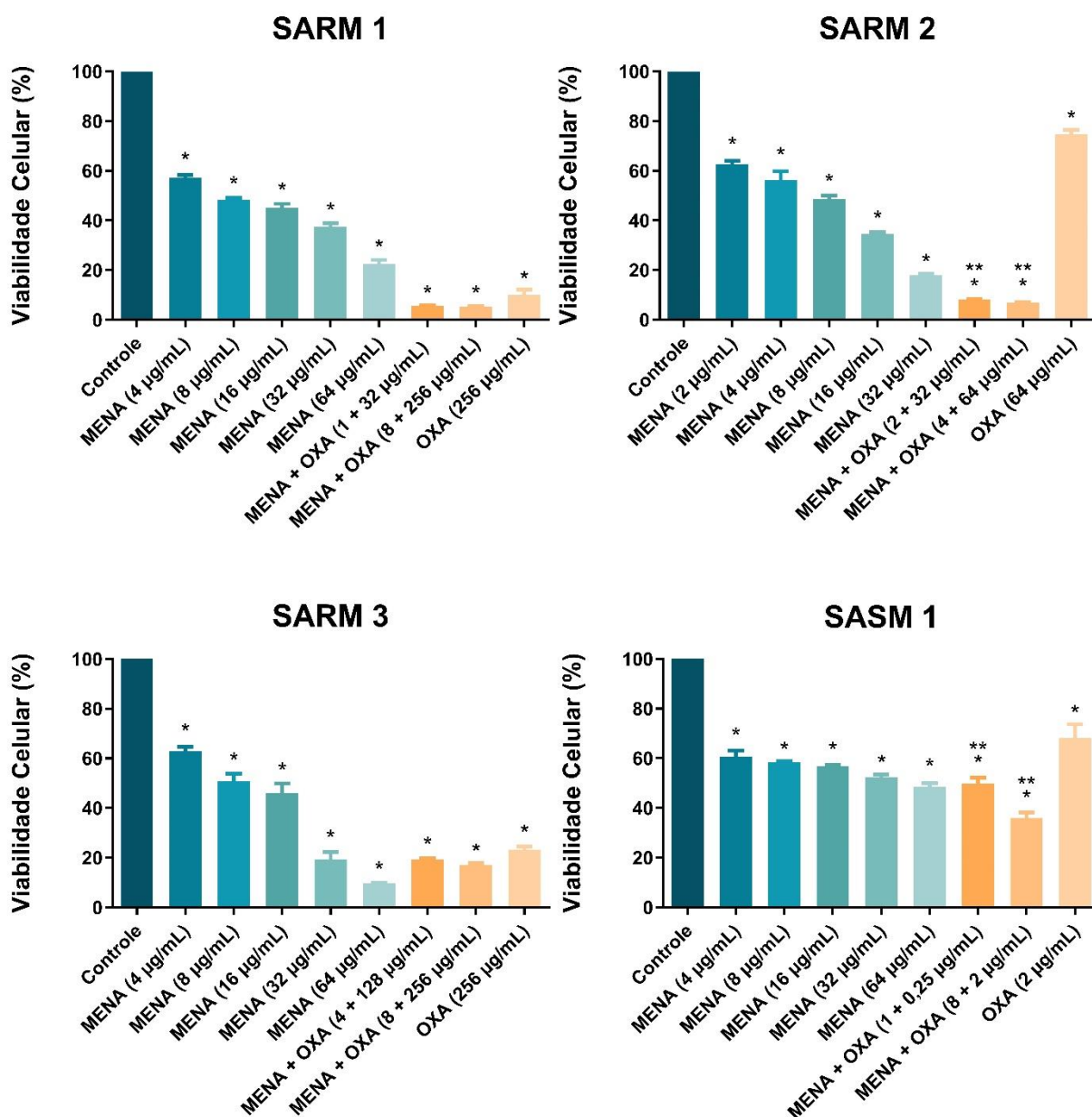
6.6 Ação antibacteriana da MENA isolada e associada à OXA sobre biofilmes de *S. aureus*

Devido à relevância de avaliar a atividade antibacteriana da MENA frente cepas dispostas na forma de biofilme, foram realizados ensaios para determinar essa possível atividade em cepas de SASM e SARM.

6.6.1 Redução da viabilidade celular em biofilme formado de *S. aureus*

De acordo com o Gráfico 1, foi possível constatar que a MENA, isoladamente e em combinação com a OXA, provocou redução da viabilidade celular em biofilme formado, tanto para a cepa sensível quanto para as cepas resistentes. A partir da concentração subinibitória da MENA (CIM/2), foi possível observar uma redução de até 42,8% da viabilidade celular em relação ao controle de crescimento para todas as cepas testadas. Na maior concentração de MENA utilizada (8xCIM), essa redução observada foi de até 90,4% da viabilidade celular.

No que se refere às combinações de MENA + OXA, apenas SARM 2 e SASM 1 demonstraram uma redução significativa quando comparadas à OXA isolada ($p < 0,05$). Houve redução de 91,2% na cepa SARM 2 e de 50,1% na SASM 1 para a combinação MENA + OXA em suas respectivas CIMs combinadas. Para a combinação MENA + OXA nas CIMs isoladas, a redução na cepa de SARM 2 foi de 93,1% e a cepa SASM 1 foi reduzida em 64,1%.

Gráfico 1 – Perfil da MENA frente a biofilme formado de *Staphylococcus aureus*

Fonte: elaborado pela autora.

* $p < 0,05$ – todos os resultados foram comparados com o controle de crescimento e determinados por ANOVA seguido pelo teste de teste de Tukey.

** $p < 0,05$ – os resultados obtidos da associação MENA + OXA foram comparados com a OXA isolada e determinados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

ANOVA: Análise da variância; MENA: Menadiona; OXA: Oxacilina; Controle: meio de cultura + inóculo.

SARM 1 – MENA: 4 µg/mL (CIM/2), 8 µg/mL (CIM), 16 µg/mL (2xCIM), 32 µg/mL (4xCIM), 64 µg/mL (8xCIM); OXA: 256 µg/mL (CIM); MENA + OXA: 1 + 32 µg/mL (CIM_{COMBINADA} da MENA + CIM_{COMBINADA} da OXA), MENA + OXA: 8 + 256 µg/mL (CIM_{ISOLADA} da MENA + CIM_{ISOLADA} da OXA).

SARM 2 – MENA: 2 µg/mL (CIM/2), 4 µg/mL (CIM), 8 µg/mL (2xCIM), 16 µg/mL (4xCIM), 32 µg/mL (8xCIM); OXA: 64 µg/mL (CIM); MENA + OXA: 2 + 32 µg/mL (CIM_{COMBINADA} da MENA + CIM_{COMBINADA} da OXA), MENA + OXA: 4 + 64 µg/mL (CIM_{ISOLADA} da MENA + CIM_{ISOLADA} da OXA).

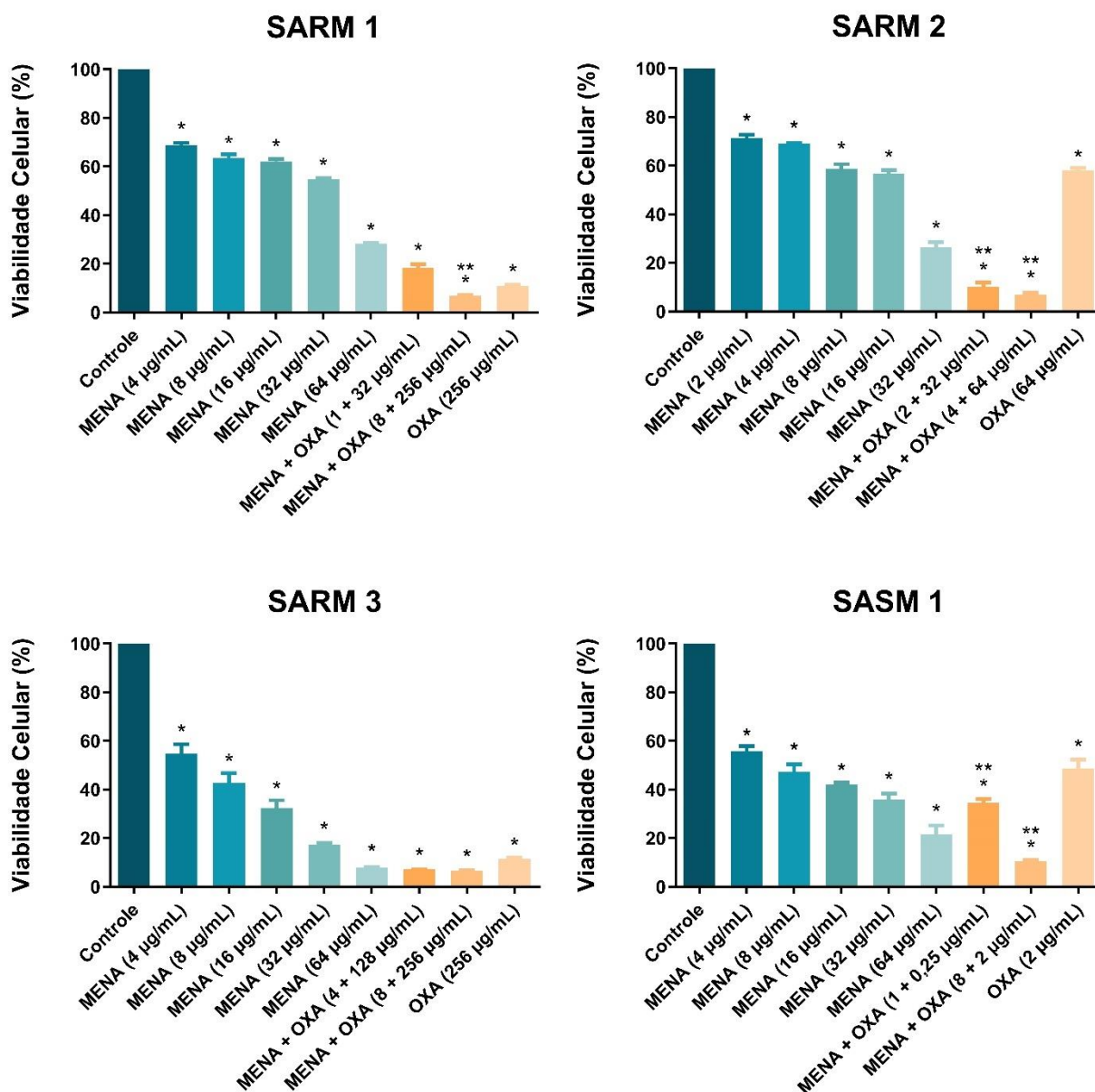
SARM 3 – MENA: 4 µg/mL (CIM/2), 8 µg/mL (CIM), 16 µg/mL (2xCIM), 32 µg/mL (4xCIM), 64 µg/mL (8xCIM); OXA: 256 µg/mL (CIM); MENA + OXA: 4 + 128 µg/mL (CIM_{COMBINADA} da MENA + CIM_{COMBINADA} da OXA), MENA + OXA: 8 + 256 µg/mL (CIM_{ISOLADA} da MENA + CIM_{ISOLADA} da OXA).

SASM 1 – MENA: 4 µg/mL (CIM/2), 8 µg/mL (CIM), 16 µg/mL (2xCIM), 32 µg/mL (4xCIM), 64 µg/mL (8xCIM); OXA: 2 µg/mL (CIM); MENA + OXA: 1 + 0,25 µg/mL (CIM_{COMBINADA} da MENA + CIM_{COMBINADA} da OXA), MENA + OXA: 8 + 2 µg/mL (CIM_{ISOLADA} da MENA + CIM_{ISOLADA} da OXA).

6.6.2 Redução da viabilidade celular em biofilme em formação de *S. aureus*

Tratando-se de biofilme em formação, foi observado que a MENA, isolada e em combinação com a OXA, também provocou redução da viabilidade celular, tanto para a cepa sensível como para as cepas resistentes. A partir da concentração subinibitória da MENA (CIM/2), foi possível observar uma redução de até 45,2% da viabilidade celular em relação ao controle de crescimento para todas as cepas testadas. Enquanto na maior concentração de MENA utilizada (8xCIM), essa redução observada foi de até 92,1% da viabilidade celular (Gráfico 2).

No que se refere às combinações de MENA + OXA, as cepas SARM 1, SARM 2 e SASM 1 demonstraram uma redução significativa no número de células viáveis quando comparadas à OXA isolada ($p < 0,05$) (Gráfico 2). Para a cepa SARM 1, apenas a combinação MENA + OXA em suas CIMs isoladas apresentaram redução significativa, com uma redução de 93,2% da viabilidade celular. Houve redução de 89,8% na cepa SARM 2 e de 65,6% na SASM 1 para a combinação MENA + OXA, em suas respectivas CIMs combinadas. Para a combinação MENA + OXA nas CIMs isoladas, a redução na cepa de SARM 2 foi de 93% e a cepa SASM 1 foi reduzida em 89,3%.

Gráfico 2 – Perfil da MENA frente a biofilme em formação de *Staphylococcus aureus*

Fonte: elaborado pela autora.

* $p < 0,05$ – todos os resultados foram comparados com o controle de crescimento e determinados por ANOVA seguido pelo teste de teste de Tukey.

** $p < 0,05$ – os resultados obtidos da associação MENA + OXA foram comparados com a OXA isolada e determinados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

ANOVA: Análise da variância; MENA: Menadiona; OXA: Oxacilina; Controle: meio de cultura + inóculo.

SARM 1 – MENA: 4 µg/mL (CIM/2), 8 µg/mL (CIM), 16 µg/mL (2xCIM), 32 µg/mL (4xCIM), 64 µg/mL (8xCIM); OXA: 256 µg/mL (CIM); MENA + OXA: 1 + 32 µg/mL (CIM_{COMBINADA} da MENA + CIM_{COMBINADA} da OXA), MENA + OXA: 8 + 256 µg/mL (CIM_{ISOLADA} da MENA + CIM_{ISOLADA} da OXA).

SARM 2 – MENA: 2 µg/mL (CIM/2), 4 µg/mL (CIM), 8 µg/mL (2xCIM), 16 µg/mL (4xCIM), 32 µg/mL (8xCIM); OXA: 64 µg/mL (CIM); MENA + OXA: 2 + 32 µg/mL (CIM_{COMBINADA} da MENA + CIM_{COMBINADA} da OXA), MENA + OXA: 4 + 64 µg/mL (CIM_{ISOLADA} da MENA + CIM_{ISOLADA} da OXA).

SARM 3 – MENA: 4 µg/mL (CIM/2), 8 µg/mL (CIM), 16 µg/mL (2xCIM), 32 µg/mL (4xCIM), 64 µg/mL (8xCIM); OXA: 256 µg/mL (CIM); MENA + OXA: 4 + 128 µg/mL (CIM_{COMBINADA} da MENA + CIM_{COMBINADA} da OXA), MENA + OXA: 8 + 256 µg/mL (CIM_{ISOLADA} da MENA + CIM_{ISOLADA} da OXA).

SASM 1 – MENA: 4 µg/mL (CIM/2), 8 µg/mL (CIM), 16 µg/mL (2xCIM), 32 µg/mL (4xCIM), 64 µg/mL (8xCIM); OXA: 2 µg/mL (CIM); MENA + OXA: 1 + 0,25 µg/mL (CIM_{COMBINADA} da MENA + CIM_{COMBINADA} da OXA), MENA + OXA: 8 + 2 µg/mL (CIM_{ISOLADA} da MENA + CIM_{ISOLADA} da OXA).

6.7 Mecanismos de morte celular envolvidos na ação antibacteriana da MENA

Uma vez evidenciada a ação antibacteriana da MENA frente a cepas de *S. aureus*, foi investigado o seu possível mecanismo de morte celular envolvido a partir de uma cepa clínica representativa de SARM.

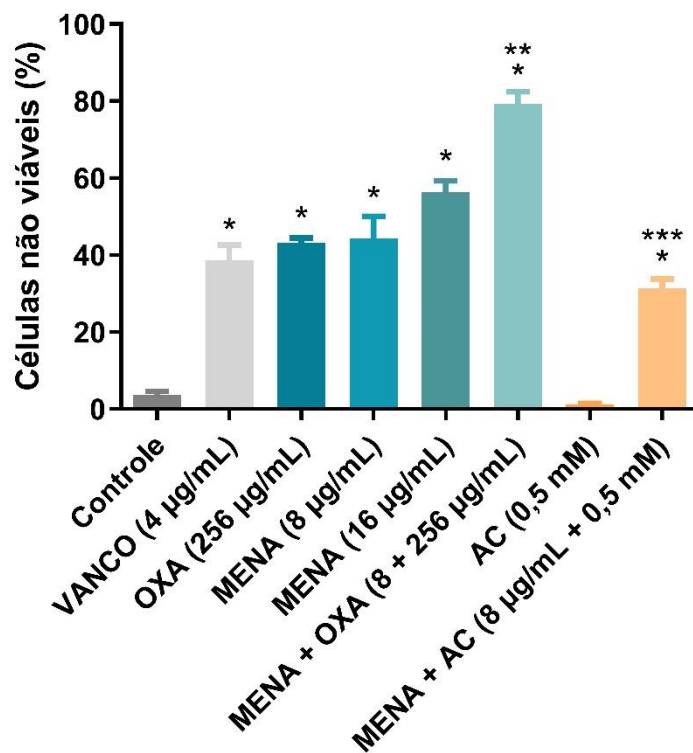
6.7.1 Redução da viabilidade celular

A avaliação da redução da viabilidade celular foi realizada utilizando o método de exclusão por iodeto de propídio, o qual se baseia na premissa de que células viáveis possuem membranas celulares íntegras, impedindo a entrada do iodeto de propídio, enquanto células mortas possuem membranas danificadas, permitindo a penetração do corante no núcleo e, conseqüentemente, a marcação do DNA.

De acordo com o Gráfico 3, as seguintes concentrações apresentaram valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle: a MENA isoladamente apresentou redução das células viáveis nos valores de 44,3% e 56,3% para as concentrações de CIM e 2xCIM, respectivamente. Já em associação, a MENA + OXA apresentou acentuada redução, com o valor de 79,3%. A OXA apresentou redução de 43,2% e a VANCO foi capaz de reduzir a viabilidade celular em cerca de 38,7%. A associação de MENA + OXA apresentou um aumento significativo de células não viáveis ($p < 0,05$) em comparação com o uso isolado da OXA.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre o grupo tratado com AC e o grupo controle. No entanto, quando o AC foi combinado com a MENA, houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de 31,2% em comparação ao grupo controle. Além disso, a combinação com AC resultou em uma redução significativa ($p < 0,05$) das células não viáveis em comparação com o uso isolado de MENA (CIM), indicando que o AC diminuiu os efeitos antibacterianos da MENA.

Gráfico 3 – Avaliação da redução da viabilidade celular em células de SARM por meio da marcação com PI



Fonte: elaborado pela autora.

* $p < 0,05$ – todos os resultados foram comparados com o controle negativo e determinados por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

** $p < 0,05$ – os resultados obtidos da associação MENA + OXA foram comparados com a OXA (CIM) e determinados por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

*** $p < 0,05$ – os resultados obtidos da associação MENA + AC foram comparados com a MENA (CIM) e determinados por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

ANOVA: Análise da variância; VANCO: Vancomicina; OXA: Oxacilina; MENA: Menadiona; AC: Ácido Ascórbico. Controle: meio de cultura (BHI).

VANCO: 4 µg/mL (CIM) – controle de morte; OXA: 256 µg/mL (CIM); MENA: 8 µg/mL (CIM); MENA: 16 µg/mL (2xCIM); MENA + OXA: 8 + 256 µg/mL (CIM_{ISOLADA} da MENA + CIM_{ISOLADA} da OXA); AC: 0,5 mM, equivalente a 88,06 µg/mL (concentração fixada); MENA + AC: 8 µg/mL + 0,5mM (CIM_{ISOLADA} da MENA + concentração fixada de AC).

6.7.2 Produção de EROs

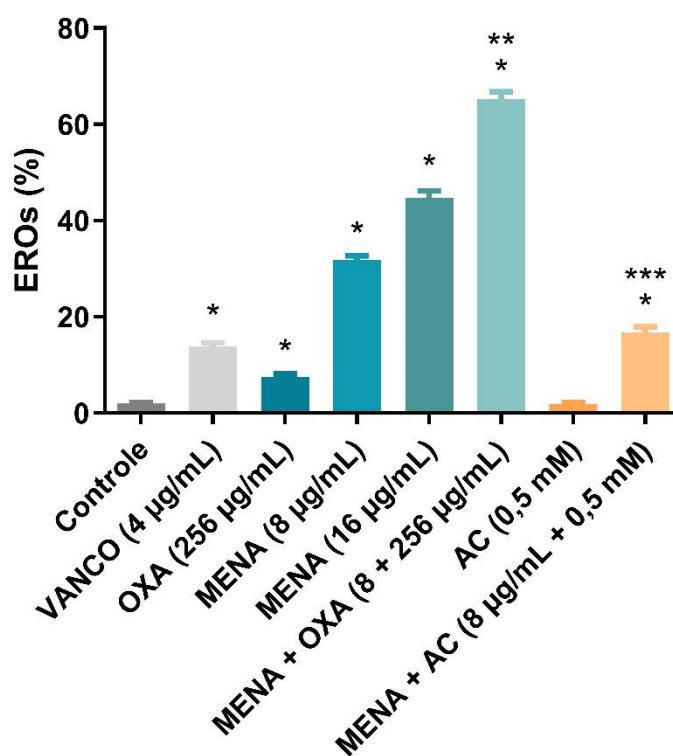
Foi empregado o corante CM-H₂DCFDA para avaliar a produção de EROs. Este corante é oxidado na presença de espécies reativas, produzindo o composto altamente fluorescente DCF (diclorofluoresceína), o qual possibilita a quantificação das mesmas.

Com base nos resultados do Gráfico 4, as células tratadas com MENA na concentração de CIM e de 2xCIM apresentaram valores de 31,8% e 44,8% para a produção de

EROs, respectivamente. A associação de MENA + OXA foi capaz de aumentar a produção de EROs para 65,23%. A VANCO apresentou valor de 13,8% para a produção de EROs e a OXA de 7,6%. Todos os resultados mencionados acima apresentaram significância estatística ($p < 0,05$) quando comparados ao controle. A associação de MENA + OXA apresentou um aumento significativo na produção de EROs ($p < 0,05$) em comparação com o uso isolado da OXA.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre o grupo tratado com AC e o grupo controle. No entanto, quando o AC foi combinado com MENA, foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) de 16,7% em relação ao controle. Além disso, a combinação com AC resultou em uma redução significativa ($p < 0,05$) na produção de EROs em comparação com o uso isolado de MENA (CIM), indicando que o AC reduziu os efeitos oxidativos da MENA.

Gráfico 4 – Avaliação da produção de EROs em células de SARM



Fonte: elaborado pela autora.

* $p < 0,05$ – todos os resultados foram comparados com o controle negativo e determinados por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

** $p < 0,05$ – os resultados obtidos da associação MENA + OXA foram comparados com a OXA (CIM) e determinados por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

*** $p < 0,05$ – os resultados obtidos da associação MENA + AC foram comparados com a MENA (CIM) e determinados por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

ANOVA: Análise da variância; VANCO: Vancomicina; OXA: Oxacilina; MENA: Menadiona; AC: Ácido Ascórbico. Controle: meio de cultura (BHI).

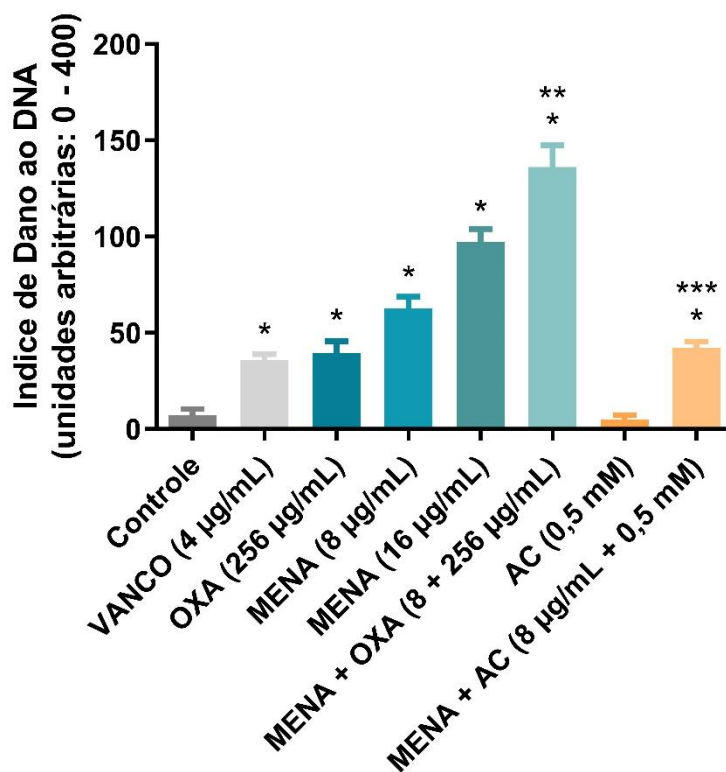
VANCO: 4 µg/mL (CIM) – controle de morte; OXA: 256 µg/mL (CIM); MENA: 8 µg/mL (CIM); MENA: 16 µg/mL (2xCIM); MENA + OXA: 8 + 256 µg/mL (CIM_{ISOLADA} da MENA + CIM_{ISOLADA} da OXA); AC: 0,5 mM, equivalente a 88,06 µg/mL (concentração fixada); MENA + AC: 8 µg/mL + 0,5mM (CIM_{ISOLADA} da MENA + concentração fixada de AC).

6.7.3 Dano ao DNA

O ensaio cometa alcalino mede rupturas dos filamentos de DNA no nível de uma única célula. Conforme o Gráfico 5, ocorreram lesões no DNA induzidas pelo tratamento com VANCO, OXA, MENA (CIM), MENA (2xCIM) e MENA + OXA de forma significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. A combinação de MENA + OXA foi a mais eficaz na promoção de danos no DNA. A associação de MENA + OXA também apresentou um aumento significativo de danos ao DNA ($p < 0,05$) em comparação com o uso isolado da OXA.

O tratamento com AC não causou danos significativos em comparação ao controle ($p > 0,05$), mas, em combinação com a MENA, mostrou significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle. Além disso, a combinação de MENA + AC resultou em uma redução significativa ($p < 0,05$) de danos ao DNA em comparação com o uso isolado de MENA (CIM), indicando que o AC reduziu o dano ao DNA promovido pela MENA.

Gráfico 5 – Avaliação do índice de dano ao DNA em células de SARM através do ensaio cometa alcalino



Fonte: elaborado pela autora.

* $p < 0,05$ – todos os resultados foram comparados com o controle negativo e determinados por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

** $p < 0,05$ – os resultados obtidos da associação MENA + OXA foram comparados com a OXA (CIM) e determinados por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

*** $p < 0,05$ – os resultados obtidos da associação MENA + AC foram comparados com a MENA (CIM) e determinados por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

ANOVA: Análise da variância; VANCO: Vancomicina; OXA: Oxacilina; MENA: Menadiona; AC: Ácido Ascórbico. Controle: meio de cultura (BHI).

VANCO: 4 µg/mL (CIM) – controle de morte; OXA: 256 µg/mL (CIM); MENA: 8 µg/mL (CIM); MENA: 16 µg/mL (2xCIM); MENA + OXA: 8 + 256 µg/mL (CIM_{ISOLADA} da MENA + CIM_{ISOLADA} da OXA); AC: 0,5 mM, equivalente a 88,06 µg/mL (concentração fixada); MENA + AC: 8 µg/mL + 0,5mM (CIM_{ISOLADA} da MENA + concentração fixada de AC).

Para cada grupo experimental 100 células foram analisadas. A leitura foi feita através de escores de acordo com o tamanho da cauda (de não danificado: 0 a dano máximo: 4). O valor de índice de dano foi calculado para cada amostra de células. Assim, o índice de dano variou de zero (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4).

6.8 Interação da MENA com alvos de SARM

O mecanismo de ação da MENA contra receptores SARM foi avaliado por meio de simulações de *docking* molecular com onze alvos. Destacam-se três complexos receptor-ligante que apresentaram maiores valores para energia de afinidade, formados entre a MENA e os receptores *S. aureus gyrase complex with DNA*^c (-7.8 kcal/mol), *S. aureus gyrase*^d (-7.5 kcal/mol) e C (30) *carotenoid dehydrosqualene synthase*^f (-7.6 kcal/mol) (Tabela 6). Foi possível observar que todos os complexos apresentaram valores para RMSD, menores que 2.0 Å, estando assim dentro do padrão de idealidade (de até 2.0 Å). A Tabela 6 também apresenta as constantes de inibição dos complexos formados, sendo observada a variação de valores *Ki* de 1.92×10^{-6} a 4.74×10^{-5} . Usando o *Ki* calculado foi determinado o *pKi* dos complexos, em que obtivemos valores *pKi* de 4.32 a 5.72.

Tabela 6 – Valores de energia de afinidade, RMSD, *Ki* e *pKi* dos complexos formados

Receptor	Energia (kcal/mol)	<i>Ki</i>	<i>pKi</i>	RMSD (Å)
<i>S. aureus</i> FtsA ^a	-7.1	6.26×10^{-6}	5.20	0.945
Wild-type <i>S. aureus</i> DHFR ^b	-7.1	6.26×10^{-6}	5.20	0.559
<i>S. aureus gyrase complex with DNA</i> ^c	-7.8	1.92×10^{-6}	5.72	0.450
<i>S. aureus gyrase</i> ^d	-7.5	3.19×10^{-6}	5.49	0.470
DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') ^e	-6.0	4.00×10^{-5}	4.40	0.459
C (30) <i>carotenoid dehydrosqualene synthase</i> ^f	-7.6	2.69×10^{-6}	5.57	1.656
MtlD ^g	-6.1	3.38×10^{-5}	4.47	1.096
<i>Panton-Valentine Leucocidin S Component</i> ^h	-5.9	4.74×10^{-5}	4.32	0.436
<i>S. aureus alpha hemolysin</i> ⁱ	-6.5	1.72×10^{-5}	4.76	1.274
Acyl-PBP2a ^j	-6.8	1.04×10^{-5}	4.98	1.280
<i>S. aureus</i> TyrRS ^k	-7.3	4.47×10^{-6}	5.35	0.582

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

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

c. Estrutura cristalina de *S. aureus gyrase complex with DNA* - PDB ID: 2XCT

d. Estrutura cristalina de *S. aureus gyrase* - PDB ID: 5BS3

e. Estrutura cristalina de DNA (5'- D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') - PDB ID: 453D

f. Estrutura cristalina de C(30) *carotenoid dehydrosqualene synthase* - PDB ID: 2ZCQ

g. Estrutura cristalina de MtlD - PDB ID: 5JNM

h. Estrutura cristalina de *Panton-Valentine Leucocidin S Component* - PDB ID: 1T5R

- i. Estrutura cristalina de *S. aureus alpha hemolysin* - PDB ID: 4IDJ
- j. Estrutura cristalina de *Acyl-PBP2a* - PDB ID: 3ZFZ
- k. Estrutura cristalina de *S. aureus TyrRS* - PDB ID: 1JJ

Em relação às interações envolvidas na formação dos complexos receptor-ligante (Tabela 7), foram identificadas sete interações com o complexo MENA - *S. aureus FtsA*, sendo três hidrofóbicas com os resíduos Leu109B (4.92 Å), Tyr183B (4.76 Å), Phe372B (3.62 Å), uma ligação de hidrogênio (1.92 Å) envolvendo o resíduo Val126B, um empilhamento π - π (4.67 Å) com Phe372B e duas cátion- π com o resíduo Arg113B (4.03 e 4.36 Å). O complexo MENA - *Wild-type S. aureus* DHFR é formado predominantemente por interações hidrofóbicas com Leu20A (3.71 e 4.51 Å), Ile50A (3.73 e 5.00 Å), NDP1160A (4.90 Å); o complexo também apresentou duas ligações de hidrogênio com Ser49A (2.14 Å) e NDP1160A (2.54 Å). O complexo MENA - *S. aureus gyrase* complex with DNA é formado por dez interações, sendo duas hidrofóbicas com os resíduos Ala1180B (5.15 Å), Phe1331B (4.73 Å), quatro ligações de hidrogênio com Ser1173B (3.05 Å), Gln1267B (2.39 Å), Gua4E (3.55 Å), Ade18H (2.32 Å), duas do tipo ligação de hidrogênio doador π com Gua4E (2.97 e 3.27 Å) e duas π - π em forma de T com Gua4E (4.96 e 5.48 Å). O complexo MENA - *S. aureus gyrase* é formado por cinco interações, sendo uma hidrofóbica com Met1113D (5.30 Å), duas ligações de hidrogênio com Arg1092D (2.83 Å), Gly1115D (2.63 Å) e duas π - π em forma de T com Phe1097D (4.70 e 5.03 Å). O complexo MENA - DNA (5'-D (*CP*GP*CP*GP*AP* AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') é formado por três ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos Gua10A (1.87 e 3.07 Å), Gua16B (2.48 Å), uma interação ânion- π com Gua12A (4.83 Å) e uma de empilhamento π - π com Gua16B (5.80 Å). O complexo MENA - C (30) *carotenoid dehydrosqualene synthase* é formado predominantemente por interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Met15A (5.12Å), Phe22A (4.38 Å), Phe26A (4.72 Å), Tyr41A (5.04 Å), Ala134A (4.71 Å), Val137A (4.73 e 5.33 Å), Leu164A (5.19 Å) e duas interações de empilhamento π - π com Phe22A (3.84 e 4.92 Å). O complexo MENA - MtlD é formado por quatro interações hidrofóbicas com Pro168A (3.91, 4.81 e 4.82 Å), Arg268A (4.99 Å), uma ligação de hidrogênio com Asn271A (2.14 Å) e duas ânion- π com Asp267A (3.40 e 4.13 Å). O complexo MENA - *Panton-Valentine Leucocidin S Component* é formado por quatro interações, sendo duas ligações de hidrogênio com Lys43C (1.98 Å), Ser128D (3.50 Å), uma hidrofóbica com Ile92C (5.11 Å) e uma de empilhamento π - π com Tyr41C (5.38 Å). O complexo MENA - *S. aureus alpha hemolysin* é formado predominantemente por interações hidrofóbicas com Ile43A (5.00 Å), Val54A (4.39, 4.73 e 4.92 Å), Leu116A (4.52 Å), Val124A (5.45 Å) e uma ligação de hidrogênio com Ser41A (3.15 Å). O complexo MENA - *Acyl-PBP2a* é formado por dez interações, sendo oito

hidrofóbicas com Leu147A (4.60 e 5.43 Å), Leu147B (3.95 Å), Lys148A (5.26 Å), Lys148B (3.49 e 5.37 Å), Lys318A (5.18 Å), Lys318B (4.81 Å); e duas ligações de hidrogênio com Lys318B (1.81 Å) e 1W8A (3.58 Å). O complexo MENA - *S. aureus TyrRS* é formado por uma interação hidrofóbica com Leu70A (4.82 Å) e uma ligação de hidrogênio com Gly38A (2.66 Å).

Tabela 7 – Interações entre a MENA e os receptores SARM

Receptor	Resíduo	Interação	Distância (Å)
<i>S. aureus</i> FtsA ^a	Leu109B	Hidrofóbica	4.92
	Tyr183B	Hidrofóbica	4.76
	Phe372B	Hidrofóbica	3.62
	Val126B	Ligação de hidrogênio	1.92
	Phe372B	Empilhamento π - π	4.67
	Arg113B	Cátion- π	4.03
	Arg113B	Cátion- π	4.36
<i>Wild-type S. aureus</i> DHFR ^b	Leu20A	Hidrofóbica	3.71
	Leu20A	Hidrofóbica	4.51
	Ile50A	Hidrofóbica	3.73
	Ile50A	Hidrofóbica	5.00
	NDP1160A	Hidrofóbica	4.90
	NDP1160A	Ligação de hidrogênio	2.54
	Ser49A	Ligação de hidrogênio	2.14
<i>S. aureus gyrase complex with DNA</i> ^c	Ala1180B	Hidrofóbica	5.15
	Phe1331B	Hidrofóbica	4.73
	Ser1173B	Ligação de hidrogênio	3.05
	Gln1267B	Ligação de hidrogênio	2.39
	Gua4E	Ligação de hidrogênio	3.55
	Gua4E	Ligação de hidrogênio doador π	2.97
	Gua4E	Ligação de hidrogênio doador π	3.27
	Ade18H	Ligação de hidrogênio	2.32
	Gua4E	π - π em forma de T	4.96
	Gua4E	π - π em forma de T	5.48
<i>S. aureus gyrase</i> ^d	Met1113D	Hidrofóbica	5.30
	Arg1092D	Ligação de hidrogênio	2.83
	Gly1115D	Ligação de hidrogênio	2.63
	Phe1097D	π - π em forma de T	4.70
	Phe1097D	π - π em forma de T	5.03

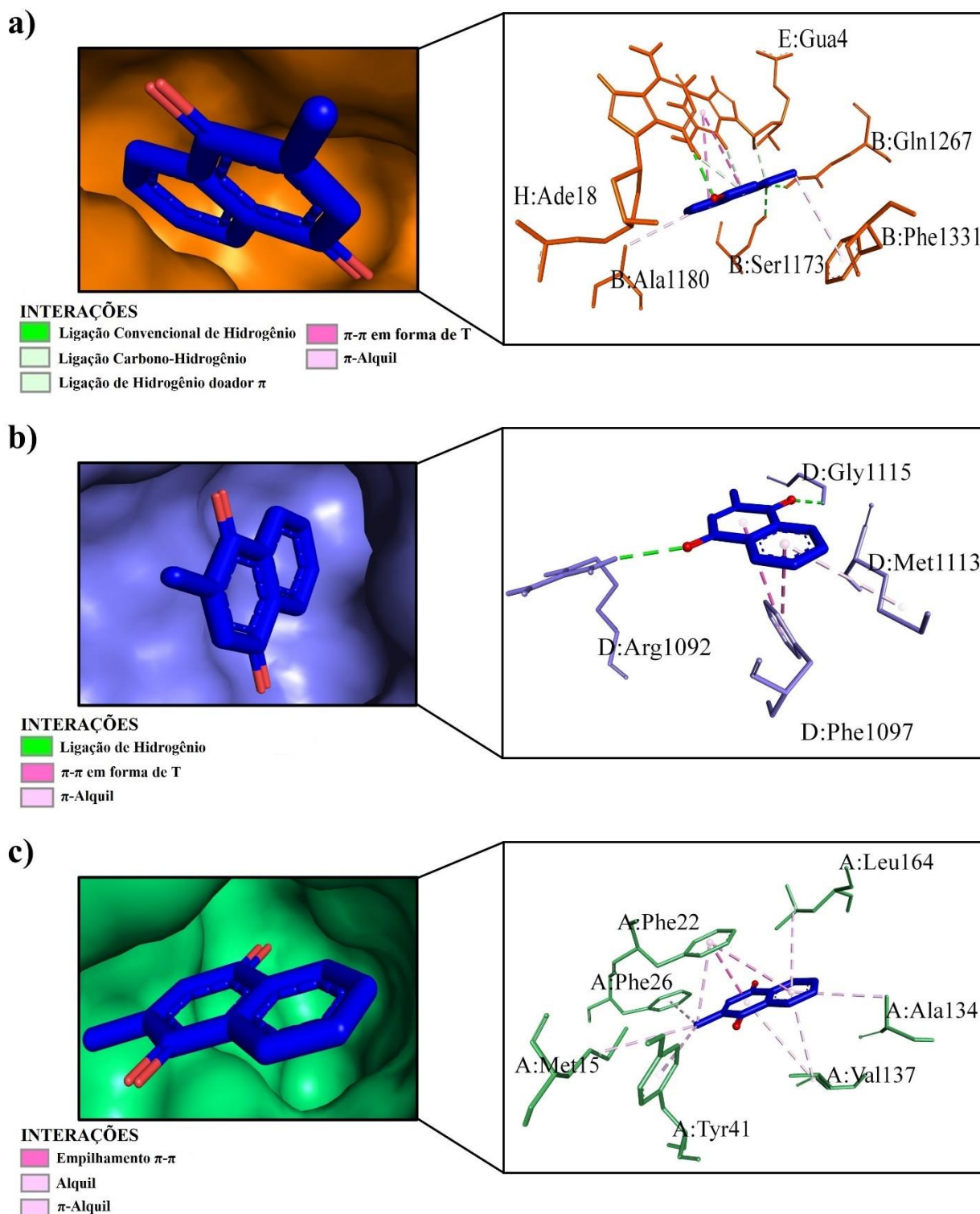
DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') ^e	Gua10A	Ligação de hidrogênio	1.87
	Gua10A	Ligação de hidrogênio	3.07
	Gua16B	Ligação de hidrogênio	2.48
	Gua12A	Ânion- π	4.83
	Gua16B	Empilhamento π - π	5.80
C (30) <i>carotenoid dehydrosqualene synthase</i> ^f	Met15A	Hidrofóbica	5.12
	Phe22A	Hidrofóbica	4.38
	Phe26A	Hidrofóbica	4.72
	Tyr41A	Hidrofóbica	5.04
	Ala134A	Hidrofóbica	4.71
	Val137A	Hidrofóbica	4.73
	Val137A	Hidrofóbica	5.33
	Leu164A	Hidrofóbica	5.19
	Phe22A	Empilhamento π - π	3.84
	Phe22A	Empilhamento π - π	4.92
MtlD ^g	Pro168A	Hidrofóbica	3.91
	Pro168A	Hidrofóbica	4.81
	Pro168A	Hidrofóbica	4.82
	Arg268A	Hidrofóbica	4.99
	Asn271A	Ligação de hidrogênio	2.14
	Asp267A	Ânion- π	3.40
	Asp267A	Ânion- π	4.13
<i>Panton-Valentine Leucocidin S Component</i> ^h	Ile92C	Hidrofóbica	5.11
	Lys43C	Ligação de hidrogênio	1.98
	Ser128D	Ligação de hidrogênio	3.50
	Tyr41C	π - π em forma de T	5.38
<i>S. aureus alpha hemolysin</i> ⁱ	Ile43A	Hidrofóbica	5.00
	Val54A	Hidrofóbica	4.39
	Val54A	Hidrofóbica	4.73
	Val54A	Hidrofóbica	4.92
	Leu116A	Hidrofóbica	4.52
	Val124A	Hidrofóbica	5.45
	Ser41A	Ligação de hidrogênio	3.15
Acyl-PBP2a ^j	Leu147A	Hidrofóbica	4.60
	Leu147A	Hidrofóbica	5.43
	Leu147B	Hidrofóbica	3.95
	Lys148A	Hidrofóbica	5.26
	Lys148B	Hidrofóbica	3.49
	Lys148B	Hidrofóbica	5.37

	Lys318A	Hidrofóbica	5.18
	Lys318B	Hidrofóbica	4.81
	Lys318B	Ligação de hidrogênio	1.81
	1W8A	Ligação de hidrogênio	3.58
<i>S. aureus</i> TyrRS ^k	Leu70A	Hidrofóbica	4.82
	Gly38A	Ligação de hidrogênio	2.66

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

Na figura 9, é possível visualizar as interações envolvidas na formação dos três principais complexos receptor-ligante formados entre a MENA e SARM.

Figura 9 – Interações dos complexos formados entre a MENA e os alvos *S. aureus gyrase complex with DNA* (a), *S. aureus gyrase* (b) e *C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase* (c)



7 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de terapias para microrganismos MDR não acompanha a rápida taxa de aquisição de resistência por esses patógenos, evidenciando a necessidade premente de novas abordagens terapêuticas (LEWIS, 2020; PUSHPAKOM et al., 2019; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). O reposicionamento de fármacos é uma alternativa para superar a escassez de novos antibióticos, buscando descobrir novas indicações terapêuticas para medicamentos já existentes, minimizando o tempo e os custos necessários para desenvolver novos tratamentos eficazes (FARHA; BROWN, 2019; HUA et al., 2022).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que a MENA apresentou atividade antibacteriana frente a cepas planctônicas de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina, com concentrações inibitórias mínimas variando entre 2 µg/mL e 32 µg/mL. Esse resultado reforça a ação antibacteriana da MENA já mencionada em alguns estudos anteriores. Ganjun et al. (2014) observaram em seus estudos efeito anti-SARM da MENA em que as CIMs variaram entre 8 e 16 µg/mL. Dey, Ray e Hazra (2014) constaram que há inibição do crescimento de isolados sensíveis e resistentes à meticilina a partir de 32 µg/mL. Enquanto que para Schlievert et al. (2013) essa concentração foi de 3,1 µg/mL. Esses estudos corroboram com os nossos resultados, ratificando a presença do efeito antibacteriano frente às cepas sensíveis e resistentes de *S. aureus* mediante baixas concentrações de MENA.

A literatura disponível discute em poucos estudos a associação da MENA com antimicrobianos e não há análises que mostrem sua atividade em combinação com OXA frente a cepas de *S. aureus* até o momento. Contudo, estudos conduzidos por Andrade et al. (2017) mostraram que a MENA, quando em associação com aminoglicosídeos, apresentou uma redução das CIMs, indicando uma relação sinérgica. Outros estudos evidenciaram a redução da CIM de antibióticos, como norfloxacino e eritromicina, após a associação com uma concentração subinibitória de MENA (CIM/8; 8 µg/mL) (TINTINO et al., 2018). Em relação às quinonas, a plumbagina; 5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona, um composto 1,4-NQ, já foi descrita como uma substância que apresenta efeito aditivo e sinérgico quando associada à OXA frente a cepas de SARM e SASM (RONDEVALDOVA; NOVY; KOKOSKA, 2015). Outro estudo mostra a ação do composto 1,4-NQ, que mostrou funcionar sinergicamente em combinação com antibióticos β-lactâmicos usados contra SASM e SARM (YAP et al., 2021).

O presente estudo evidenciou que a associação de MENA e OXA apresentou efeito sinérgico e aditivo na maioria dos isolados de *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina. Foi

possível observar esse efeito através da MEV, no qual as células bacterianas apresentaram um dano mais significativo quando a OXA foi usada em associação com a MENA.

Uma explicação para isso é que as quinonas são compostos bioativos capazes de interagir com proteínas, levando à inativação e perda de função. Em células microbianas, eles podem ter como alvo adesinas, polipeptídios da parede celular e enzimas ligadas à membrana. Por exemplo, a MENA pode funcionar como um inibidor não seletivo de várias proteínas de ligação à penicilina, incluindo aquelas relacionadas à resistência estafilocócica (RONDEVALDOVA; NOVY; KOKOSKA, 2015; SCHIEBER, 2018).

Nos ensaios *in silico*, a MENA mostrou afinidade pelo alvo Acil-PBP2a, com uma energia de ligação de -6,8 kcal/mol. Apesar de não ter sido a interação mais favorável em termos energéticos em comparação com outros alvos, isso sugere o potencial da MENA para se ligar à PBP2a, uma proteína modificada encontrada em cepas resistentes de *S. aureus*. A inibição dessa proteína pode restaurar a sensibilidade da cepa bacteriana à oxacilina, aumentando a eficácia desse antibiótico no combate às infecções. A interação com esse alvo pode servir como um mecanismo complementar, contribuindo para o aumento da atividade observada quando a OXA é combinada com a MENA.

Um importante mecanismo de virulência do *S. aureus* é a sua capacidade de formar biofilmes. O biofilme pode conferir aos microrganismos resistência aos antibióticos disponíveis, pois sua estrutura confere grande proteção contra agentes antimicrobianos (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021; SAUER et al., 2022). Como evidenciado em nossa pesquisa, a MENA demonstrou atividade eficaz tanto em biofilmes já formados quanto em estágios iniciais de formação, sendo capaz de reduzi-los de forma significativa mesmo quando aplicada em concentrações subinibitórias. Isso destaca a potência da MENA no combate aos biofilmes.

Um estudo conduzido por Mone et al. (2022) evidenciou o efeito antibiofilme da MENA em cepas resistentes de *S. aureus* já em concentrações subinibitórias de MENA, na CIM/4 (64 µg/mL) houve uma redução de até 90% na inibição tanto de biofilmes formados quanto em formação. Os resultados obtidos no presente estudo estão em consonância com os achados anteriores mencionados. A produção de EROs pela MENA pode estar relacionada à sua atividade antibiofilme, uma vez que esses compostos podem induzir a variabilidade genética, promover a morte celular em regiões específicas do biofilme e, possivelmente, regular o desenvolvimento do biofilme bacteriano (ČÁP; VÁCHOVÁ; PALKOVÁ, 2012; PAUL et al., 2021).

Ao analisar a combinação de MENA e OXA na atuação em biofilmes, é possível observar que em isolados que responderam menos ao tratamento com OXA isoladamente, a associação com MENA tornou esses isolados mais susceptíveis aos efeitos da OXA. Isso significa que, em biofilmes onde a OXA teve uma menor atuação, a associação com MENA amplificou seus efeitos. No entanto, em isolados que já demonstraram eficácia na inibição do biofilme com a OXA isoladamente, a associação com MENA tornou-se dispensável devido à falta de significância estatística na redução da viabilidade celular dos biofilmes.

Para elucidar os potenciais mecanismos de ação envolvidos na atividade antibacteriana da MENA, foi realizada uma investigação abrangente empregando diversas técnicas, como citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e abordagens *in silico*, incluindo o *docking* molecular.

A geração de EROs é um mecanismo essencial na atividade antimicrobiana, abrangendo patógenos diversos, inclusive os MDR, que representam um desafio significativo no tratamento e controle de infecções (MEMAR et al., 2018; MONE et al., 2022). As quinonas, por sua vez, são moléculas altamente oxidantes, capazes de estabelecer ciclos redox com seus radicais semiquinonas, os quais são extremamente instáveis e reagem rapidamente com o oxigênio, resultando na formação de EROs, como superóxido, peróxido de hidrogênio e, finalmente, o radical hidroxila. A produção excessiva de EROs pode induzir estresse oxidativo dentro das células, causando danos às macromoléculas celulares, incluindo lipídios, proteínas e DNA (JUAN et al., 2021; SIES, 2020).

Neste estudo, foi constatado que a produção de EROs pela MENA apresenta uma relação dose-dependente. Quando associada à OXA, apresentou um aumento considerável na formação de EROs, indicando uma possível correlação com o aumento da atividade antibacteriana da MENA quando em associação com a OXA em cepas de *S. aureus*. Estudos sugerem que a alta atividade redox ocasionada pelas 1,4-NQs é um dos fatores responsáveis da morte bacteriana em células de *S. aureus* (DE ANDRADE NETO et al., 2018; LINZNER et al., 2020; RAVICHANDIRAN et al., 2019; WANG et al., 2016). Adicionalmente, outros estudos sustentam que a produção de EROs em células de *S. aureus* aumenta de maneira exponencial com o aumento da concentração de MENA (DEY; RAY; HAZRA, 2014).

Nos estudos *in silico*, observou-se a interação da MENA com alvos-chave na virulência de SARM. Um dos principais alvos identificados foi a enzima *C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase* (-7.6 kcal/mol). Sua inibição pode tornar o microrganismo mais suscetível a danos causados pelas EROs. Estudos anteriores já evidenciam a atividade de 1,4-

NQs sobre a inibição da síntese de estafilocantina, indicando uma abordagem promissora para lidar com a virulência de cepas de *S. aureus* (ELMESSERI et al., 2022; PAUL et al., 2021; RIBEIRO et al., 2020).

A interação da MENA com essa enzima é interessante, uma vez que a MENA não apenas induz estresse oxidativo nas células, mas também atua de forma complementar, inibindo esse alvo relacionado à proteção contra o estresse oxidativo em cepas de *S. aureus*, otimizando, dessa forma, os danos causados pelas EROs (GAO; DAVIES; KAO, 2017).

Outro resultado significativo a ser destacado em relação ao mecanismo de ação da MENA é a indução de danos no DNA. Foi constatado que a MENA apresenta efeito dose-dependente nos danos causados no DNA de *S. aureus* e, quando combinada com a OXA, seus efeitos no DNA são ainda mais evidentes. Estudos sugerem que esses danos no DNA também podem estar relacionados com o aumento do estresse oxidativo (KAŹMIERCZAK-BARAŃSKA; KARWOWSKI, 2022; SOULIOTIS et al., 2020).

A interação da MENA com os receptores *S. aureus gyrase complex with DNA* (-7.8 kcal/mol) e *S. aureus gyrase* (-7.5 kcal/mol) obtidas através do *docking* molecular complementam os resultados de dano ao DNA provocado pela MENA. No qual a MENA também atua no DNA bacteriano através da ligação com a enzima DNA girase. 1,4-NQs têm sido estudadas por sua atividade em relação a essa enzima. Karkare et al. (2013) demonstrou que a diospirina e a 7-metiljuglona inibem a reação de superenrolamento catalisada pela enzima girase em cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *M. tuberculosis*.

Levando em consideração que um dos principais mecanismos de ação da MENA é a produção de EROs, que desencadeia grande parte de sua ação antibacteriana (CRIDDLE et al., 2006; KAŹMIERCZAK-BARAŃSKA; KARWOWSKI, 2022), foi investigada a associação da MENA com antioxidantes para avaliar essa relação. A NAC é um derivado da cisteína com atividade antioxidante, agindo tanto indiretamente aumentando a síntese de glutatona como diretamente doando elétrons para neutralizar radicais livres através do grupo tiol (-SH) (ALDINI et al., 2018). O AC, por sua vez, age diretamente na neutralização de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, reduzindo o estresse celular oxidativo (NJUS et al., 2020).

Foi constatado que a associação da MENA com antioxidantes resultou em diferentes efeitos. Enquanto a NAC não influenciou a atividade antibacteriana da MENA, o AC antagonizou seus efeitos. No MEV, foi possível observar a reversão do efeito antibacteriano da

MENA pela associação com AC. Esses achados indicam que os antioxidantes possuem diferentes capacidades modulatórias quando combinados com a MENA em cepas de *S. aureus*.

A ausência de glutathione em bactérias Gram-positivas, incluindo *S. aureus*, pode ser a explicação para esse resultado. Nem todas as cepas de *S. aureus* possuem a capacidade de sintetizar essa molécula e sua presença ou ausência pode variar entre diferentes isolados da bactéria (LENSMIRE et al., 2021; MASIP; VEERAVALLI; GEORGIU, 2006; SMIRNOVA; OKTYABRSKY, 2005). Uma vez que a ação antioxidante da NAC é em grande parte mediada pelo aumento da síntese de glutathione, isso pode justificar sua aparente falta de efeito em associação com a MENA em cepas de *S. aureus*.

Analisando os resultados adicionais da associação de AC e MENA obtidos por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, observamos seu efeito protetor. Foi observado que o AC reduziu significativamente a produção de EROs, preveniu danos ao DNA e aumentou a viabilidade celular, revertendo, assim, os efeitos antibacterianos da MENA. Essas descobertas sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel crucial na atividade antibacteriana da MENA.

Além disso, a MENA apresentou efeito bacteriostático consistente em todos os isolados testados, corroborando os achados de Yap et al. (2023) em cepas de SARM e SASM. É relevante ressaltar que outros derivados de 1,4-NQs também manifestaram essa atividade (ADUSEI et al., 2019; RIFFEL et al., 2002), fortalecendo a importância desses compostos como possíveis agentes antibacterianos.

O efeito bacteriostático da MENA está correlacionado com a redução na viabilidade celular das bactérias. Essa redução pode ser atribuída às alterações no DNA bacteriano causadas pelos danos ao material genético induzidos pelo estresse oxidativo gerado pelas EROs (DWYER et al., 2012; IMLAY, 2013). Além disso, a MENA também pode interferir em enzimas essenciais envolvidas na replicação do DNA bacteriano, como a DNA girase, como demonstrado neste estudo. Essa interferência combinada contribui para a diminuição na viabilidade celular e para o efeito bacteriostático observado.

Os resultados indicam uma possível relação entre os níveis elevados de EROs e os efeitos antibacterianos da MENA, que podem ser amplificados devido às suas propriedades lipofílicas. Nossas observações destacam a correlação entre a redução na produção de EROs e a diminuição dos danos ao DNA, enfatizando o papel crucial desse mecanismo nos efeitos subsequentes observados. Além disso, a MENA interage com a DNA girase, levando à inibição da replicação bacteriana. Adicionalmente, interfere na síntese de estafíloxantina, um fator de

proteção contra o estresse oxidativo em células bacterianas. Acredita-se que essas interações com alvos específicos contribuam para os efeitos antibacterianos observados da MENA em cepas de *S. aureus*.

A utilização de formulações tópicas contendo agentes antibacterianos eficazes tem se mostrado uma ferramenta valiosa no controle de infecções causadas por *S. aureus* (CHIRAYATH et al., 2019; RUKAVINA et al., 2018). Essa estratégia eficaz visa reduzir a citotoxicidade e aprimorar a eficácia no tratamento de infecções, enquanto direciona o agente diretamente ao local da infecção, minimizando a exposição sistêmica e os efeitos colaterais, além de contribuir para reduzir o desenvolvimento de resistência bacteriana (LAM et al., 2018).

Formulações à base de baixas concentrações de MENA, em combinação com a OXA, apresentam-se como uma alternativa atraente no tratamento de biofilmes. Outra aplicação promissora seria a utilização desse composto em superfícies abióticas, contribuindo para a redução de infecções associadas a procedimentos médicos e trazendo uma empolgante perspectiva para sua aplicação na prevenção de infecções hospitalares.

Os dados obtidos confirmam que a MENA atua efetivamente como um composto antibacteriano através de diferentes vias de ação em cepas de SARM, mostrando ser um ótimo candidato na terapia de combinação com antibióticos, especialmente aplicado em biofilmes.

8 CONCLUSÃO

A MENA demonstrou um efeito antibacteriano significativo contra cepas de *S. aureus*, tanto em forma planctônica quanto em biofilme, inclusive contra cepas resistentes à meticilina. A combinação da MENA com a OXA mostrou um efeito sinérgico e aditivo, especialmente na redução de biofilmes com baixa suscetibilidade à OXA. Os mecanismos envolvidos nessa atividade incluem a geração de EROs e danos ao DNA, que foram revertidos pela adição de ácido ascórbico. O estresse oxidativo induzido pela MENA parece ser o principal responsável pelos seus efeitos antibacterianos. Além disso, a MENA também se ligou a alvos relacionados a importantes fatores de virulência de SARM. Assim, a MENA pode ser considerada um adjuvante no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*. No entanto, são necessários mais estudos para compreender melhor os mecanismos de ação da MENA contra *S. aureus*, especialmente em relação à sua aplicabilidade *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ADUSEI, E. B. A. et al. Resistance Modulation Action, Time-Kill Kinetics Assay, and Inhibition of Biofilm Formation Effects of Plumbagin from *Plumbago zeylanica* Linn. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2019, 2019.
- ALDINI, G. et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. **Free Radical Research**, v. 52, n. 7, p. 751–762, 2018.
- ALGAMMAL, A. M. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 13, p. 3255–3265, set. 2020.
- AMIN, D. H. M.; GULER, E.; BADDAL, B. Prevalence of Panton-Valentine leukocidin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates at a university hospital in Northern Cyprus: a pilot study. **BMC Research Notes**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2020.
- ANDRADE, J. C. et al. Menadione (vitamin K) enhances the antibiotic activity of drugs by cell membrane permeabilization mechanism. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 1, p. 59–64, 2017.
- ASSIS, L. M.; NEDELJKOVIĆ, M.; DESSEN, A. New strategies for targeting and treatment of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. **Drug Resistance Updates**, v. 31, p. 1–14, mar. 2017.
- AZHAR, A. et al. Detection of high levels of resistance to linezolid and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 1328–1331, 2017.
- BAKER, R. E. et al. Infectious disease in an era of global change. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 193–205, 2022.
- BATISTA DE ANDRADE NETO, J. et al. A mechanistic approach to the in-vitro resistance modulating effects of fluoxetine against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, n. November 2018, p. 335–340, fev. 2019.
- BATISTA DE ANDRADE NETO, J. et al. Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, n. March, 2021.
- BENZER, F. et al. Chemoprotective effects of curcumin on doxorubicin-induced nephrotoxicity in wistar rats: by modulating inflammatory cytokines, apoptosis, oxidative stress and oxidative DNA damage. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 124, n. 5, p. 448–457, 2018.
- BHOWMICK, T. et al. Ceftaroline as salvage therapy for complicated MRSA bacteremia: case series and analysis. **Infection**, v. 47, n. 4, p. 629–635, 2019.
- BIOVIA, D. S. **Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego.**

Dassault Systèmes, 2016.

BLANDO, F. et al. Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Staphylococcus aureus* of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Cladode Polyphenolic Extracts. **Antioxidants**, v. 8, n. 5, p. 117, 2 maio 2019.

BLASKOVICH, M. A. T. et al. Developments in Glycopeptide Antibiotics. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 5, p. 715–735, 2018.

BOSWIHI, S. S.; UDO, E. E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : An update on the epidemiology, treatment options and infection control. **Current Medicine Research and Practice**, v. 8, n. 1, p. 18–24, 2018.

BRAMBILLA, L. Z. S. et al. Anti-biofilm activity against *staphylococcus aureus* mrsa and mssa of neolignans and extract of *piper regnellii*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 112–117, 2017.

BROWN, N. M. et al. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Updated guidelines from the UK. **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 1, 2021.

BROWNE, K. et al. A new era of antibiotics: The clinical potential of antimicrobial peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 1–23, 2020.

BURLINSON, B. et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 627, n. 1, p. 31–35, 2007.

ČÁP, M.; VÁCHOVÁ, L.; PALKOVÁ, Z. Reactive Oxygen Species in the Signaling and Adaptation of Multicellular Microbial Communities. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1–13, 2012.

CASTRO, F. A. V. et al. Cytotoxicity mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, 2008.

CAVALCANTE, F. S. et al. Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients on admission to a teaching hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **American Journal of Infection Control**, v. 45, n. 11, p. 1190–1193, 2017.

CDC. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019** **Antimicrobial Resistance & Infection Control**. Atlanta, Georgia: CDC, 6 nov. 2019. Disponível em: <<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>>.

CHAMBERS, H. F. Omadacycline — The Newest Tetracycline. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 6, p. 588–589, 2019.

CHAN, B. C. L. et al. Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 767–773, 2011.

CHANG, J. O.; LEE, R. E.; LEE, W. A pursuit of *Staphylococcus aureus* continues: a role of

persister cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 43, n. 6, p. 630–638, 2020.

CHATRON, N. et al. Structural insights into phylloquinone (Vitamin K1), menaquinone (MK4, MK7), and menadione (vitamin K3) binding to VKORC1. **Nutrients**, v. 11, n. 1, 2019.

CHEMAXON. **Marvin A full featured chemical editor for making science accessible on all platforms**. Disponível em: <<https://chemaxon.com/products/marvin>>. Acesso em: 9 jan. 2023.

CHEN, C. J.; HUANG, Y. C.; SHIE, S. SEN. Evolution of Multi-Resistance to Vancomycin, Daptomycin, and Linezolid in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Causing Persistent Bacteremia. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. July, p. 1–18, 2020.

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

CHIRAYATH, R. B. et al. Development of Mangifera indica leaf extract incorporated carbopol hydrogel and its antibacterial efficacy against Staphylococcus aureus. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, n. March, p. 377–384, 2019.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, n. 1, p. 26–40, 2020.

CIANDRINI, E. et al. Synergistic combinations of antimicrobial peptides against biofilms of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) on polystyrene and medical devices. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 21, n. October, p. 203–210, jun. 2020.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2015.

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

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

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

COSIMI, R. A. et al. Ceftaroline for severe methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections: A systematic review. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 1–7, 2017.

CRIDDLE, D. N. et al. Menadione-induced Reactive Oxygen Species Generation via Redox Cycling Promotes Apoptosis of Murine Pancreatic Acinar Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40485–40492, dez. 2006.

CSIZMADIA, P. **MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web**. Disponível em: <<https://chemaxon.com/presentation/marvinsketch-and-marvinview-molecule-applets-for-the-world-wide-web>>.

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

DA SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 8, n. 4, p. 472–482, 2018.

DADASHI, M. et al. Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 20, p. 238–247, 2020.

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

DE ANDRADE NETO, J. B. et al. Action mechanism of naphthofuranquinones against fluconazole-resistant *Candida tropicalis* strains evidenced by proteomic analysis: The role of increased endogenous ROS. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, n. 2018, p. 32–42, 2018.

DE ANDRADE NETO, J. B. et al. Synergistic effects of ketamine and azole derivatives on *Candida* spp. resistance to fluconazole. **Future microbiology**, v. 15, p. 177–188, 2020.

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

DEY, D.; RAY, R.; HAZRA, B. Antitubercular and antibacterial activity of quinonoid natural products against multi-drug resistant clinical isolates. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 7, p. 1014–1021, 2014.

DIEKEMA, D. J. et al. Twenty-Year Trends in Antimicrobial Susceptibilities Among *Staphylococcus aureus* From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Supplement_1, p. S47–S53, 15 mar. 2019.

DIGHE, S. N.; COLLET, T. A. Recent advances in DNA gyrase-targeted antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 199, p. 112326, 2020.

DIVYAKOLU, S. et al. Hemolysins of *Staphylococcus aureus*—An Update on Their Biology, Role in Pathogenesis and as Targets for Anti-Virulence Therapy. **Advances in Infectious Diseases**, v. 09, n. 02, p. 80–104, 2019.

DO AV SÁ, L. G. et al. Synergistic anticandidal activity of etomidate and azoles against clinical fluconazole-resistant isolates. **Future Microbiology**, v. 14, n. 17, p. 1477–1488, 2019.

DURAND, G. A.; RAOULT, D.; DUBOURG, G. Antibiotic discovery: history, methods and

- perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 4, p. 371–382, 2019.
- DUVAL, R. E.; GRARE, M.; DEMORÉ, B. Fight Against Antimicrobial Resistance: We Always Need New Antibacterials but for Right Bacteria. **Molecules**, v. 24, n. 17, p. 3152, 29 ago. 2019.
- DWYER, D. J. et al. Antibiotic-Induced Bacterial Cell Death Exhibits Physiological and Biochemical Hallmarks of Apoptosis. **Molecular Cell**, v. 46, n. 5, p. 561–572, 2012.
- EDWARDSON, S.; CAIRNS, C. Nosocomial infections in the ICU. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 20, n. 1, p. 14–18, jan. 2019.
- ELMESSERI, R. A. et al. Staphyloxanthin as a Potential Novel Target for Deciphering Promising Anti-Staphylococcus aureus Agents. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, p. 298, 23 fev. 2022.
- ENANY, S.; ALEXANDER, L. C. **The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus**. [s.l.] InTech, 2017.
- EXCLER, J. L. et al. Vaccine development for emerging infectious diseases. **Nature Medicine**, v. 27, n. 4, p. 591–600, 2021.
- FARHA, M. A.; BROWN, E. D. Drug repurposing for antimicrobial discovery. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 565–577, 2019.
- FLEMMING, H. C. et al. Biofilms: An emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.
- FORD, C. A.; HURFORD, I. M.; CASSAT, J. E. Antivirulence Strategies for the Treatment of Staphylococcus aureus Infections: A Mini Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. January, p. 1–10, 2021.
- FOSTER, T. J. The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 11, p. 927–941, 2019.
- GAJDÁCS, M. The continuing threat of methicillin-resistant Staphylococcus Aureus. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, 2019.
- GANJUN, Y. et al. New activity for old drug: In vitro activities of vitamin K3 and menadione sodium bisulfite against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 17, p. 451–454, 2014.
- GAO, P.; DAVIES, J.; KAO, R. Y. T. Dehydrosqualene desaturase as a novel target for anti-virulence therapy against Staphylococcus aureus. **mBio**, v. 8, n. 5, p. 1–12, 2017.
- GHOSH, S.; BORNMAN, C.; ZAFER, M. M. Antimicrobial Resistance Threats in the emerging COVID-19 pandemic: Where do we stand? **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 5, p. 555–560, maio 2021.
- GIACOBBE, D. R. et al. Ceftobiprole: drug evaluation and place in therapy. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 17, n. 9, p. 689–698, 2019.

- GUSKEY, M. T.; TSUJI, B. T. A Comparative Review of the Lipoglycopeptides: Oritavancin, Dalbavancin, and Telavancin. **Pharmacotherapy**, v. 30, n. 1, p. 80–94, jan. 2010.
- HAFIDI, Z. et al. Aminoalcohol-based surfactants (N-(hydroxyalkyl)-N, N- dimethyl N-alkylammonium bromide): evaluation of antibacterial activity and molecular docking studies against dehydrosqualene synthase enzyme (CrtM). **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 42, n. 4, p. 514–525, 2021.
- HAIKHXANI, B. et al. The global prevalence of fusidic acid resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus: a systematic review and meta-analysis. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2021.
- HALL, R. G. et al. An evaluation of tedizolid for the treatment of MRSA infections. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 19, n. 13, p. 1489–1494, 2 set. 2018.
- HANWELL, M. D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 8, 2012.
- HARKINS, C. P. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2017.
- HARMS, A. et al. Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. **Molecular Cell**, v. 70, n. 5, p. 768–784, 2018.
- HASSOUN, A.; LINDEN, P. K.; FRIEDMAN, B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. **Critical Care**, v. 21, n. 1, p. 211, 14 dez. 2017.
- HEIDARY, M. et al. Daptomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 1, p. 1–11, 1 jan. 2018.
- HOLANDA, M. A. V. et al. **Evaluation of the antifungal activity in vitro of midazolam against fluconazole-resistant Candida spp. isolates. Future Microbiology**, 2021.
- HOPPE, P.-A. et al. Severe infections of Panton-Valentine leukocidin positive Staphylococcus aureus in children. **Medicine**, v. 98, n. 38, p. e17185, set. 2019.
- HOVEN, G. VON et al. S. aureus α -toxin: Small pore, large consequences. **Biological Chemistry**, 2019.
- HUA, Y. et al. Drug repositioning: Progress and challenges in drug discovery for various diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 234, p. 114239, 2022.
- HUEY, R.; MORRIS, G. M.; FORLI, S. Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A Tutorial. **The Scripps Research Institute Molecular**, p. 32, 2012.
- HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, n. Figure 1, p. 72–80, out. 2019.

IDREES, M. et al. Staphylococcus aureus Biofilm : Morphology , Genetics , Pathogenesis and Treatment Strategies. 2021.

IKUTA, K. S. et al. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 400, n. 10369, p. 2221–2248, 2022.

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

IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 443–454, 2013.

JAKOPIN, Ž. et al. Discovery of substituted oxadiazoles as a novel scaffold for DNA gyrase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 130, p. 171–184, 2017.

JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018.

JARAJREH, D. et al. Prevalence of inducible clindamycin resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus: The first study in Jordan. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n. 4, p. 350–354, 2017.

JENUL, C.; HORSWILL, A. R. Regulation of Staphylococcus aureus Virulence. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, 2019.

JORGE, P. et al. Searching for new strategies against biofilm infections: Colistin-AMP combinations against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus single- and double-species biofilms. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0174654, 29 mar. 2017.

JUAN, C. A. et al. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4642, 28 abr. 2021.

KADELA-TOMANEK, M. et al. Lipophilicity, pharmacokinetic properties, and molecular docking study on sars-cov-2 target for betulin triazole derivatives with attached 1,4-quinone. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, 2021.

KARKARE, S. et al. The Naphthoquinone Diospyrin Is an Inhibitor of DNA Gyrase with a Novel Mechanism of Action. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 7, p. 5149–5156, fev. 2013.

KARLOWSKY, J. A.; STEENBERGEN, J.; ZHANEL, G. G. Microbiology and Preclinical Review of Omadacycline. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. Supplement_1, p. S6–S15, 1 ago. 2019.

KATEETE, D. P. et al. CA-MRSA and HA-MRSA coexist in community and hospital

settings in Uganda. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2019.

KAYILI, E.; SANLIBABA, P. Prevalence, characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional cheeses in Turkey. **International Journal of Food Properties**, v. 23, n. 1, p. 1441–1451, 2020.

KAŹMIERCZAK-BARAŃSKA, J.; KARWOWSKI, B. T. Vitamin K Contribution to DNA Damage—Advantage or Disadvantage? A Human Health Response. **Nutrients**, v. 14, n. 20, 2022.

KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478–482, 2017.

KHAN, T. et al. DNA gyrase inhibitors: Progress and synthesis of potent compounds as antibacterial agents. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 103, n. April, p. 923–938, 2018.

KHAWAJA, T. et al. Patients hospitalized abroad as importers of multiresistant bacteria—a cross-sectional study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 9, p. 673.e1-673.e8, set. 2017.

LADE, H.; KIM, J. S. Bacterial targets of antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, 2021.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–103, out. 2018.

LAM, P. L. et al. Recent advances on topical antimicrobials for skin and soft tissue infections and their safety concerns. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 40–78, 2018.

LATURKAR, K. et al. Overview on Doxycycline- And its Adverse Reactions. **International Journal of Advances in Pharmacy and Biotechnology**, v. 7, p. 8–11, 2021.

LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. May, p. 1–23, 2018.

LEE, D. C. et al. Bacterial Colonization of the Hospitalized Newborn: Competition Between *Staphylococcus Aureus* and *Staphylococcus Epidermidis*. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 38, n. 7, p. 682–686, 2019.

LENSMIRE, J. M. et al. The glutathione import system satisfies the *Staphylococcus aureus* nutrient sulfur requirement and promotes interspecies competition. **bioRxiv**, p. 2021.10.26.465763, 2021.

LEWIS, K. The Science of Antibiotic Discovery. **Cell**, v. 181, n. 1, p. 29–45, 2020.

LIMA, L. M. et al. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 208, p. 112829, 2020.

LINARDI, V. R. et al. Isolamento De Staphylococcus Aureus Mrsa Entre Os Funcionários De Um Hospital Geral de Região Leste de Minas Gerais. **Revista de Saúde Pública do Sus/Mg**, v. 2, n. 2, p. 59–64, 2017.

LINZNER, N. et al. The plant-derived naphthoquinone lapachol causes an oxidative stress response in Staphylococcus aureus. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 158, n. June, p. 126–136, 2020.

LISOWSKA-ŁYSIAK, K. et al. Epidemiology and pathogenesis of staphylococcus bloodstream infections in humans: A review. **Polish Journal of Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 13–23, 2021.

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

LIU, W. T. et al. Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in Staphylococcus aureus: A comprehensive review. **Microbial Pathogenesis**, v. 156, n. April, p. 104915, 2021.

LOUNSBURY, N. et al. A mini-review on ceftaroline in bacteremia patients with methicillin-resistant staphylococcus aureus (Mrsa) infections. **Antibiotics**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2019.

LUCHIAN, I. et al. Clindamycin as an alternative option in optimizing periodontal therapy. **Antibiotics**, v. 10, n. 7, p. 1–12, 2021.

LUPINACCI, F. S. et al. High prevalence of clindamycin resistance in Staphylococcus aureus blood culture isolates in São Paulo, Brazil. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 9, n. 04, p. 314–316, 2017.

MAIKRANZ, E. et al. Different binding mechanisms of Staphylococcus aureus to hydrophobic and hydrophilic surfaces. **Nanoscale**, v. 12, n. 37, p. 19267–19275, 2020.

MARINHO, E. M. et al. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, p. 104365, 2020.

MARSTON, H. D. et al. Antimicrobial Resistance. **JAMA**, v. 316, n. 11, p. 1193, 20 set. 2016.

MASADEH, M. M. et al. Ciprofloxacin-Induced Antibacterial Activity is Reversed by Vitamin E and Vitamin C. **Current Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 457–462, 18 maio 2012.

MASIP, L.; VEERAVALLI, K.; GEORGIU, G. The Many Faces of Glutathione in Bacteria. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 5–6, p. 753–762, maio 2006.

MATUSZEWSKA, M. et al. The Evolutionary Genomics of Host Specificity in Staphylococcus aureus. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 465–477, 2020.

MEHRSHAD, S.; HAGHKHAH, M.; AGHAEI, S. Epidemiology and molecular

characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from skin and soft tissue infections in Shiraz, Iran. **TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES**, v. 47, n. 1, p. 180–187, 2017.

MEMAR, M. Y. et al. Antimicrobial use of reactive oxygen therapy: Current insights. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 567–576, 2018.

MENEZES, M. **Detecção de bactérias resistentes a antibióticos triplicou na pandemia**. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/deteccao-de-bacterias-resistentes-antibioticos-triplicou-na-pandemia>>. Acesso em: 25 abr. 2023.

MILLES, L. F. et al. Molecular mechanism of extreme mechanostability in a pathogen adhesin. **Science**, v. 359, n. 6383, p. 1527–1533, 2018.

MILOSHEV, G.; MIHAYLOV, I.; ANACHKOVA, B. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 513, n. 1–2, p. 69–74, jan. 2002.

MINATO, Y. et al. Mutual potentiation drives synergy between trimethoprim and sulfamethoxazole. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. et al. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8088, 22 jul. 2022.

MONE, N. et al. Naphthoquinones and Their Derivatives: Emerging Trends in Combating Microbial Pathogens. **Coatings**, v. 11, n. 4, p. 434, 9 abr. 2021.

MONE, N. S. et al. Antibacterial and Antibiofilm Potency of Menadione Against Multidrug-Resistant *S. aureus*. **Current Microbiology**, v. 79, n. 9, p. 1–14, 2022.

MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 365–376, maio 2017.

MURRAY, C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, fev. 2022.

MUTHUKRISHNAN, G. et al. Mechanisms of Immune Evasion and Bone Tissue Colonization That Make *Staphylococcus aureus* the Primary Pathogen in Osteomyelitis. **Current Osteoporosis Reports**, v. 17, n. 6, p. 395–404, 13 dez. 2019.

NAKAMINAMI, H. et al. Current status of Pantone–Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients with skin and soft tissue infections in Japan. **Journal of Dermatology**, v. 47, n. 11, p. 1280–1286, 2020.

NEGRI, L. B. et al. Vitamin K3 (Menadione) is a multifunctional microbicide acting as a photosensitizer and synergizing with blue light to kill drug-resistant bacteria in biofilms. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 244, p. 112720, jul. 2023.

NETO, J. B. A. et al. Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds in vitro against

fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: A special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014.

NGUYEN, T. et al. Targeting Mannitol Metabolism as an Alternative Antimicrobial Strategy Based on the Structure-Function Study of Mannitol-1-Phosphate Dehydrogenase in *Staphylococcus aureus*. **mBio**, v. 10, n. 4, p. 1–23, 27 ago. 2019.

NJUS, D. et al. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 159, n. May, p. 37–43, 2020.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **The Review on Antimicrobial Resistance**, n. May, 2016.

OKWU, M. U. et al. Methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) and anti-MRSA activities of extracts of some medicinal plants: A brief review. **AIMS Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 117–137, 2019.

PARASTAN, R. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. **Gene Reports**, v. 20, n. March, 2020.

PARLET, C. P.; BROWN, M. M.; HORSWILL, A. R. Commensal Staphylococci Influence *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Disease. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 497–507, jun. 2019.

PARVEKAR, P. et al. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. **Biomaterial Investigations in Dentistry**, v. 7, n. 1, p. 105–109, 2020.

PAUL, P. et al. 1,4-Naphthoquinone accumulates reactive oxygen species in *Staphylococcus aureus*: a promising approach towards effective management of biofilm threat. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 3, p. 1183–1193, 2021.

PEREIRA-FRANCHI, E. P. L. et al. Prevalence of and risk factors associated with the presence of *Staphylococcus aureus* in the chronic wounds of patients treated in primary health care settings in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 833–838, 2017.

PEREIRA, A. L. DA C.; DE OLIVEIRA, S. N. DE; SILVA, H. DE A. Vigilância e epidemiologia de infecções hospitalares causadas por *Staphylococcus aureus* em um hospital Universitário na cidade de Uberlândia-MG. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 25, n. 2, p. 85–94, 2022.

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

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 4 set. 2019.

PROCOP, G. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

PULINGAM, T. et al. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 170, p. 106103, 2022.

PUSHPAKOM, S. et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, 12 jan. 2019.

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

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

RAIMONDI, M. V. et al. DHFR inhibitors: Reading the past for discovering novel anticancer agents. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1–19, 2019.

RAVICHANDIRAN, P. et al. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of 1,4-Naphthoquinone Derivatives as Potential Antibacterial Agents. **ChemistryOpen**, v. 8, n. 5, p. 589–600, 2019.

RIBEIRO, L. M. B. C. et al. Structure-activity relationships and mechanism of action of tetragomycin derivatives as inhibitors of *Staphylococcus aureus* staphyloxanthin biosynthesis. **Microbial Pathogenesis**, v. 144, n. March, p. 104127, 2020.

RIFFEL, A. et al. In vitro antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 7, p. 811–818, jul. 2002.

RODRÍGUEZ-OLLEROS RODRÍGUEZ, C.; DÍAZ CURIEL, M. Vitamin K and Bone Health: A Review on the Effects of Vitamin K Deficiency and Supplementation and the Effect of Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulants on Different Bone Parameters. **Journal of Osteoporosis**, v. 2019, 2019.

RONDEVALDOVA, J.; NOVY, P.; KOKOSKA, L. In vitro Combinatory Antimicrobial Effect of Plumbagin with Oxacillin and Tetracycline against *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 1, p. 144–147, jan. 2015.

ROUARD, C. et al. Emergence and Within-Host Genetic Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Resistant to Linezolid in a Cystic Fibrosis Patient. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 12, dez. 2018.

RUBIO GOMEZ, M. A.; IBBA, M. Aminoacyl-tRNA synthetases. **RNA**, v. 26, n. 8, p. 910–936, ago. 2020.

RUKAVINA, Z. et al. Azithromycin-loaded liposomes for enhanced topical treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 553, n. 1–2, p. 109–119, 2018.

SÁNCHEZ-CALVO, J. M. et al. Synthesis, antibacterial and antifungal activities of

naphthoquinone derivatives: a structure–activity relationship study. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, n. 6, p. 1274–1285, 2016.

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

SARAVOLATZ, L. D.; STEIN, G. E. Delafloxacin: A New Anti–methicillin-resistant Staphylococcus aureus Fluoroquinolone. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 6, p. 1058–1062, 5 mar. 2019.

SAUER, K. et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608–620, 2022.

SCHIEBER, A. Reactions of Quinones - Mechanisms, Structures, and Prospects for Food Research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 50, p. 13051–13055, 2018.

SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 3, p. 1–36, 19 ago. 2020.

SCHLIEVERT, P. M. et al. Menaquinone Analogs Inhibit Growth of Bacterial Pathogens. v. 57, n. 11, p. 5432–5437, 2013.

SELBY, A. R.; HALL, R. G. Utilizing the patient care process to minimize the risk of vancomycin-associated nephrotoxicity. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 6, p. 1–12, 2019.

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

SHAMS-ABADI, M. S. et al. Epidemiology of toxic shock syndrome toxin-1 harboring Staphylococcus aureus obtained from clinical samples in Iran: A Systematic Review and Meta-analysis. **Annali di Igiene Medicina Preventiva e di Comunita**, v. 30, n. 5, p. 391–400, 2018.

SHARIATI, A. et al. The global prevalence of Daptomycin, Tigecycline, Quinupristin/Dalfopristin, and Linezolid-resistant Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci strains: A systematic review and meta-analysis. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 1–20, 2020.

SHAW-TAYLOR, L. An introduction to the history of infectious diseases, epidemics and the early phases of the long-run decline in mortality†. **Economic History Review**, v. 73, n. 3, p. E1–E19, 2020.

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

SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated

- transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 23–36, 2014.
- SIES, H. Oxidative stress: Concept and some practical aspects. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 1–6, 2020.
- SILVA, L. J. et al. Antifungal activity of dexamethasone against fluconazole-resistant *Candida albicans* and its activity against biofilms. **Future Microbiology**, v. 17, n. 8, p. 607–620, 2022.
- SMIRNOVA, G. V; OKTYABRSKY, O. N. Glutathione in Bacteria. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 11, p. 1199–1211, nov. 2005.
- SONG, R. et al. Naphthoquinone-derivative as a synthetic compound to overcome the antibiotic resistance of methicillin-resistant *S. aureus*. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, p. 529, 24 set. 2020.
- SOULIOTIS, V. L. et al. DNA damage response and oxidative stress in systemic autoimmunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 1–24, 2020.
- SOUSA, N. A. DE et al. Sepsis neonatal – perfil microbiológico e sensibilidade antimicrobiana em um hospital no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 51, n. 1, p. 46–51, 2019.
- SUREWAARD, B. G. J. et al. α -Toxin Induces Platelet Aggregation and Liver Injury during *Staphylococcus aureus* Sepsis. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 2, p. 271–284.e3, 2018.
- SWEENEY, D. et al. Comparative in vitro activity of oritavancin and other agents against methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 2, p. 121–128, 2017.
- TANDON, V. K. et al. Synthesis and biological evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antibacterial and antiviral agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 14, p. 3463–3466, jul. 2005.
- TAYLOR, S. D.; PALMER, M. The action mechanism of daptomycin. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 24, p. 6253–6268, 2016.
- THURONYI, B. W. et al. Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity. **Nature Biotechnology**, p. 1070–1079, 2019.
- TINTINO, S. R. et al. Vitamin K enhances the effect of antibiotics inhibiting the efflux pumps of *Staphylococcus aureus* strains. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, n. 1, p. 261–267, 2018.
- TINTINO, S. R. et al. Effect of Vitamin K3 Inhibiting the Function of NorA Efflux Pump and Its Gene Expression on *Staphylococcus aureus*. **Membranes**, v. 10, n. 6, p. 130, 25 jun. 2020.
- TONELLI, M. et al. Host dihydrofolate reductase (DHFR)-directed cycloguanil analogues endowed with activity against influenza virus and respiratory syncytial virus. **European**

Journal of Medicinal Chemistry, v. 135, p. 467–478, 2017.

TRIPATHY, S.; SAHU, S. K. FtsZ inhibitors as a new genera of antibacterial agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 91, n. December 2018, p. 103169, 2019.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, 2010.

TYERS, M.; WRIGHT, G. D. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 141–155, 2019.

VESTERGAARD, M.; FREES, D.; INGMER, H. Antibiotic resistance and the MRSA problem. **Gram-Positive Pathogens**, p. 747–765, 2019.

VISANSIRIKUL, S.; KOLODZIEJ, S. A.; DEMCHENKO, A. V. Staphylococcus aureus capsular polysaccharides: A structural and synthetic perspective. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 783–798, 2020.

WANG, J. et al. Antibacterial activity of juglone against staphylococcus aureus: From apparent to proteomic. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 1–12, 2016.

WATKINS, R. R.; HOLUBAR, M.; DAVID, M. Z. Antimicrobial Resistance in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus to Newer Antimicrobial Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 12, p. 1–48, dez. 2019.

WHO. **Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis**. Disponível em: <https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/PPLreport_2017_09_19.pdf?ua=1>. Acesso em: 3 mar. 2023.

WHO. Water, Sanitation, Hygiene and Health: A Primer for Health Professionals. **World Health organization**, p. 1–40, 2019.

XU, X.-W. et al. Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: retrospective case series. **BMJ**, v. 368, n. January, p. m606, 19 fev. 2020.

XUE, H. et al. Review of drug repositioning approaches and resources. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 10, p. 1232–1244, 2018.

YAGHOUBI, S. et al. Tigecycline antibacterial activity, clinical effectiveness, and mechanisms and epidemiology of resistance: narrative review. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 41, n. 7, p. 1003–1022, 2022.

YAN, J. et al. α -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 213–223, 2014.

YANG, Y. et al. Protective effect of the golden staphyloxanthin biosynthesis pathway on

staphylococcus aureus under cold atmospheric plasma treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 3, 2020.

YAP, C. H. et al. Potential application of menadione for antimicrobial coating of surgical sutures. **Biotechnology Notes**, v. 4, n. February, p. 20–27, 2023.

YAP, J. K. Y. et al. Synergistic Antibacterial Activity between 1,4-Naphthoquinone and β -Lactam Antibiotics against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. **Microbial Drug Resistance**, v. 27, n. 2, p. 234–240, 2021.

YOSHIDA, T. et al. Incidence of central venous catheter-related bloodstream infections: Evaluation of bundle prevention in two intensive care units in central Brazil. **Scientific World Journal**, v. 2019, 2019.

YOUSEFI, M. et al. Identification of tigecycline- and vancomycin-resistant Staphylococcus aureus strains among patients with urinary tract infection in Iran. **New Microbes and New Infections**, v. 19, p. 8–12, 2017.

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

ZAVALA-FLORES, E.; SALCEDO-MATIENZO, J. Medicación prehospitalaria en pacientes hospitalizados por COVID-19 en un hospital público de Lima-Perú. **ACTA MEDICA PERUANA**, v. 37, n. 3, p. 393–395, 3 set. 2020.

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

ZHU, C. et al. Structure and Activity of the Camellia oleifera Sapogenin Derivatives on Growth and Biofilm Inhibition of Staphylococcus aureus and Escherichia coli. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 51, p. 14143–14151, 2019.