UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB

DAVI RAMALHO FURTADO

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DERIVADO DE HIDRALAZINA HDZH2, 4DCL E EFEITO DA INIBIÇÃO DAS BOMBAS DE EFLUXO *NorA* E *MepA* EM *Staphylococcus aureus*

Orientador: Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos

Coorientadora: Profª. Dra. Janaína Esmeraldo Rocha

CRATO-CE

2026

UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA

DAVI RAMALHO FURTADO

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DERIVADO DE HIDRALAZINA HDZH2, 4DCL E EFEITO DA INIBIÇÃO DAS BOMBAS DE EFLUXO *NorA* E *MepA* EM *Staphylococcus aureus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Hélcio Santos Silva

Coorientador: Profa. Dra. Janaina Esmeraldo Rocha

Crato

2026

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA

Furtado Ramalho, Davi
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DERIVADO DE HIDRALAZINA HDZH2, 4DCL E EFEITO DA INIBIÇÃO DAS BOMBAS DE EFLUXO *NorA* E *MepA* EM Staphylococcus aureus
73p

Dissertação/Tese (Mestrado) – Universidade Regional do Cariri – Centro de Ciências Biológica e da Saúde – Departamento de Química Biológica.

1. Bomba de efluxo 2. Resistência bacteriana 3. Hidralazinas.
I. NorA e MepA. Universidade Regional do Cariri – Centro de Ciências Biológica e da Saúde – Departamento de Química Biológica.

Davi Ramalho Furtado

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DERIVADO DE HIDRALAZINA HDZH2, 4DCL E EFEITO DA INIBIÇÃO DAS BOMBAS DE EFLUXO NorA E MepA EM *Staphylococcus aureus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial necessário para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica

Dissertação defendida e aprovada em 30 / 01 / 2026

BANCA EXAMINADORA

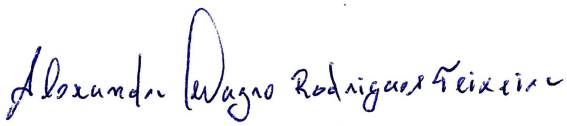
Documento assinado digitalmente
gov.br HELCIO SILVA DOS SANTOS
Data: 26/03/2026 15:57:03-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos
Orientador-presidente - (UECE)

Janaina Esmeraldo Rocha

Profa. Dra. Janaina Esmeraldo Rocha
Coorientadora (URCA)

Profa. Dr. – Raimundo Luiz Silva Pereira
Membro titular externo (UNINASSAU)



Prof. Dr. – Alaxandre Magno Rodrigues Teixeira
Membro titular interno (UECE)

Prof. Dr. – Francisco Nascimento Pereira Junior

Membro suplente externo (UFCA)

Dedico este Trabalho a minha irmã, Maria Rayane Ramalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hélcio Santos Silva pela oportunidade e apoio, por me direcionar durante a realização deste trabalho e pela compreensão com os percalços trilhados. À Profa. Dra. Janaína Esmeraldo Rocha, minha coorientadora, pela paciência e todos os ensinamentos, saiba que você é inspiração para todos nós.

Aos professores Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira, Dr. Thiago Freitas Sampaio, Dr. Emmanuel Silva Marinho, Dr. Diniz Maciel de Sena Junior, Dr. Henrique Douglas Coutinho, Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, Dr. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga pelos ensinamentos, apoio em compreensão diante das dificuldades enfrentadas.

À todos os colegas do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - LMBM, sem vocês nada disso seria possível, grato pela paciência e todos os ensinamentos. A todos os meus amigos que me apoiaram e acreditaram em mim, Matheus, Susana, Alex, Gabriel, Levy, Leonardo, Fábio, Mateus, Herique, Anderson, Natanael, Ana Julia. A minha irmã, Rayane por sempre me motivar a querer mais e me apoiar independente das circunstancias que a vida nos colocasse.

À Universidade Regional do Cariri-URCA, pelas instalações e pelo curso de mestrado. À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica-PPQB. À CAPES, CNPq, FUNCAP e FINEP, pelo apoio financeiro e equipamentos.

“Se você sentir que está chegando ao seu limite, lembre-se do motivo pelo qual você luta... lembre-se do porquê você começou por esse caminho, e deixe essa memória levá-lo além do seu limite.”.

All Might

Título **Página**

Esquema 1: Estrutura do trabalho de dissertação. 5

Figura 1: Principais famílias de bombas de efluxo 11

Figura 2: Alteração Estrutural da Hidralazina. 14

Capitulo I: Atividade antibacteriana do derivado de hidralazina HDZH2, 4DCL e sua capacidade de reversão do mecanismo de bomba de efluxo em *Staphylococcus aureus*

Esquema 1. Síntese da hidrazona: 1H NMR (500 MHz, DMSO); δH 12.43 (s, NH-1), 8.70 (d, J = 8.6 Hz, H-6'), 8.66 (s, H-7'), 8.35 (d, J = 7.9 Hz, H-8), 8.20 (s, H-4), 7.78 (3H, m, H-5/H-6/H-7), 7.67 (d, J = 2.2 Hz, H-3'), 7.49 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, H-5'). 13C NMR (125 MHz, DMSO); δC 149.5 (C-1), 147.3 (C-7'), 138.4 (C-4), 134.6 (C-1'), 133.7 (C-2'), 132.7 (C-6), 131.9 (C-7), 131.5 (C-3'), 129.8 (C-6'), 129.0 (C-4'), 127.5 (C-5'), 127.2 (C-4a), 126.5 (C-5), 125.7 (C-8a), 124.0 (C-8). 19

Fig 1: Estrutura da HDZH2, 4DCL. 23

Tabela 1. Dados das interações ligante–receptor (L–R) no processo de redocking do agonista CPZ, dos substratos clássicos CCCP e EtBr, e das simulações de docking molecular da HDZH2,4DCL, utilizando o receptor da bomba de efluxo MepA. 26

Fig 2: (A) Visualização tridimensional do acoplamento dos ligantes na bomba de efluxo MepA, cepa *S. aureus* K2068, e visualização tridimensional das interações ligante–receptor entre os resíduos de aminoácidos (cor azul) da bomba de efluxo MepA com os ligantes (cor nude): (B) CCCP, (C) CPZ, (D) EtBr e (E) HDZH2,4DCL (ciano). 27

Tabela 2. Dados das interações ligante–receptor (L–R) no processo de redocking do agonista CPZ, dos substratos clássicos CCCP e EtBr, e das simulações de docking molecular da HDZH2,4DCL, utilizando o receptor da bomba de efluxo NorA. 28

Fig 3:(A) Visualização tridimensional do acoplamento dos ligantes na bomba de efluxo NorA, cepa *S. aureus* 1199B, e visualização tridimensional das interações ligante–receptor entre os resíduos de aminoácidos (cor azul) da bomba de efluxo NorA com os ligantes (cor nude): (**B**) CPZ, **(C)** CCCP, (**D**) EtBr e (**E**) HDZH2,4DCL (verde). 29

Tabela 3. Propriedades físico-químicas e perfil de drug-likeness da chalcona HDZH2O 31

Fig 4: (A) Mapa de superfície do potencial de lipofilicidade molecular (MLP) da base conjugada à HDZH2,4DCL (logD 7,4); (B) radar de otimização multiparamétrica (MPO), que expressa o grau de desejabilidade em ADME. O espectro MPO foi analisado especificamente por meio do alinhamento de (C) TPSA e logP, para estimar o perfil de permeabilidade no sistema nervoso central (SNC); e (D) massa molecular (MM) e logD em pH 7,4, para estimar o perfil de absorção oral e a estabilidade 32

metabólica.

Tabela 4. Farmacocinética avaliada por meio dos modelos ADME dos servidores web SwissADME e PreADMET 34

Tabela 5. Desfechos toxicológicos e dose letal oral (DL_{50}) segundo a predição consensual das ferramentas web PreADMET e ProTox-II 35

Quadro 1: Concentração Inibitória Mínima da Hidrazona e das substâncias padrão em cepas de *Staphylococcus aureus*. 36

Fig 5: Efeito adjuvante da hidrazona HDZH2, 4DCL sobre o mecanismo de bomba de efluxo da cepa *Staphylococcus aureus* 1199B, quando associada ao Brometo de Etídio. 38

Fig 6: Efeito adjuvante da hidrazona HDZH2, 4DCL sobre o mecanismo de bomba de efluxo da cepa *Staphylococcus aureus* K2068, quando associada ao Brometo de Etídio. 39

Fig 7: Efeito adjuvante da hidrazona HDZH2, 4DCL 41

Fig 8: Efeito adjuvante da hidrazona HDZH2, 4DCL sobre a cepa *Staphylococcus aureus* K2068 quando associada à Ciprofloxacina. 42

Símbolo, sigla ou abreviatura	Significado
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cip	Ciprofloxacino
Nor	Norfloxacina
CPZ	Clorpromazina
EP	Efflux Pumps
EB	Brometo de etídio
S.K.A.P.E	*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e espécies de Enterobacter*
IPBE	Inibidor Padrão de Bomba de Efluxo
ATCC	*American Type Culture Collection*
HDZ	Hidralazina
MATE	Família de "Extrusão de Multidrogas e Toxinas"
MFS	Superfamília de Facilitadores Maiores
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina
SKAPE	*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*
BHI	*Brain Heart Infusion*
MepA	Gene que expressa a proteína de efluxo MepA
NorA	Gene que codifica a proteína de efluxo de NorA
OMS	Organização Mundial da Saúde
HDZH2,4DCL	Hidrazona diclorada

SUMÁRIO

Item	Assunto	Página
1.	INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1	OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS	2
1.2	ESTRATÉGIAS DE PESQUISA	2
1.3	ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	5
2.	OBJETIVOS	7
2.1	Objetivo Geral	7
2.2	Objetivos específicos	7
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
3.1	Resistência Bacteriana	8
3.2	*Staphylococcus aureus*	9
3.3	Bomba de efluxo	10
3.3.1	Bombas de efluxo *NorA e MepA*	11
3.4	Deviravados de hidralazina	12
4.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	15
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
5.1	Conclusões finais	52
5.2	Perspectiva de investigações futuras	53
6.	REFERÊNCIAS	54

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DERIVADO DE HIDRALAZINA HDZH2, 4DCL E EFEITO DA INIBIÇÃO DAS BOMBAS DE EFLUXO NorA E MepA EM *Staphylococcus aureus*

RESUMO

Introdução: Desde épocas mais remotas a resistência bacteriana tem sido um problema para a população mundial. Essa problemática se da devido a uma grande variedade de fatores, como o uso indiscriminado de antibióticos, o fácil acesso aos fármacos juntamente com a automedicação e o uso de forma excessiva e indevida, além da passagem de uma pandemia conhecida como COVID 19 que acabou intensificando ainda mais o problema com microrganismos multirresistentes, como *Staphylococcus aureus.* A combinação de medicamentos já conhecidos com substâncias sinteticas, surge como uma alternativa promissora no bloqueio dos mecanismos de resistência bactériana como é o caso das bombas de efluxo NorA e MepA, assim permitindo a reutilização desses farmácos e suprindo lacunas existentes. A substância que vem ganhando bastante destaque devido ao seu efeito sinérgico, é a hidralazina e seus derivados. Substância essa normalmente utilizada para o tratamento de hipertensão e outras doenças. **Objetivo:** Avaliar a atividade antibacteriana direta da hidrazona HDZH2, 4DCL, assim como, a capacidade de reversão de resistência através da inibição do mecanismo de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus*. **Metodologia:** Os testes de atividade antibacteriana direta e de inibição de bombas de efluxo foram realizados usando métodos padrão de microdiluição e análise visual com resazurina, além dos testes de docking molecular e ADMET. Foram utilizados os antibióticos ciproflorxacina e norfloxacina, e o inibidor CPZ. **Resultados e discussões:** A hidrazona HDZH2, 4DCL não apresentou atividade antibacteriana intrínseca significativa, com CIMs ≥ 1024 μg/mL. No entanto, mostrou-se capaz de potencializar o efeito do brometo de etídio na cepa K2068, que expressa a bomba de efluxo MepA, mas não teve o mesmo efeito na cepa 1199B, que expressa a bomba NorA. A técnica de docking molecular foi utilizada para verificar a viabilidade da formação de complexos receptor-ligante e a reprodutibilidade dos resultados. As simulações de docking molecular mostraram que a HDZH2, 4DCL apresenta a possibilidade de efeito para SAK2068 (que expressa MepA) e seletividade contra as cepas de bactérias *S. aureus* SA1199B (que superexpressa NorA), e apresenta baixo risco de toxicidade por ingestão. C**onclusão:** Embora a hidrazona HDZH2, 4DCL não tenha demonstrado atividade antibacteriana direta significativa, seu potencial adjuvante na inibição de bombas de efluxo justifica investigações adicionais para o desenvolvimento de terapias combinadas mais eficazes contra bactérias resistentes.

Palavras-Chave: Bomba de efluxo; Resistência bacteriana; Hidralazinas; NorA e MepA.

Agradecimentos: NEPET, CEPB, CNPq e FAPEG.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE HYDRALAZINE DERIVATIVE HDZH2,4DCL AND THE EFFECT OF NorA AND MepA EFFLUX PUMP INHIBITION IN *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Introduction: Since ancient times, bacterial resistance has been a major problem for the global population. This issue arises from a variety of factors, such as the indiscriminate use of antibiotics, easy access to drugs combined with self-medication, excessive and improper use, and the recent COVID-19 pandemic, which further intensified the problem with multidrug-resistant microorganisms such as *Staphylococcus aureus*. The combination of known drugs with synthetic substances emerges as a promising alternative to block bacterial resistance mechanisms, such as the NorA and MepA efflux pumps, thus enabling the reuse of these drugs and addressing existing gaps. A substance that has been gaining attention due to its synergistic effect is hydralazine and its derivatives, commonly used in the treatment of hypertension and other diseases. **Objective:** To evaluate the direct antibacterial activity of the hydrazone HDZH2,4DCL, as well as its ability to reverse resistance through inhibition of efflux mechanisms in *Staphylococcus aureus* strains. **Methodology:** Direct antibacterial activity and efflux pump inhibition assays were performed using standard microdilution methods and visual analysis with resazurin, in addition to molecular docking and ADMET studies. The antibiotics ciprofloxacin and norfloxacin, as well as the inhibitor chlorpromazine (CPZ), were used. **Results and Discussion:** The hydrazone HDZH2,4DCL did not show significant intrinsic antibacterial activity, with MICs ≥ 1024 μg/mL. However, it was able to potentiate the effect of ethidium bromide in the K2068 strain, which expresses the MepA efflux pump, but did not show the same effect in the 1199B strain, which expresses the NorA pump. Molecular docking was used to evaluate the feasibility of receptor–ligand complex formation and the reproducibility of the results. The simulations indicated that HDZH2,4DCL may exhibit an effect in SA-K2068 (MepA-expressing) and selectivity toward *S. aureus* SA1199B strains (NorA-overexpressing), with a low predicted risk of toxicity upon ingestion. **Conclusion:** Although the hydrazone HDZH2,4DCL did not demonstrate significant direct antibacterial activity, its potential as an adjuvant in efflux pump inhibition supports further investigation for the development of more effective combination therapies against resistant bacteria.

Keywords: Efflux pump; Bacterial resistance; Hydralazines; NorA and MepA.

Acknowledgements: NEPET, CEPB, CNPq e FAPEG.

IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE

Desde épocas mais remotas, infecções por bactérias resistentes representam um grave desafio à saúde, devido ao seu alto índice de reprodução e resistência a antibióticos. Causando redução nas opções de tratamento disponíveis e aumento os casos de morte. A pandemia da Covid-19 causada por um vírus mortal, alastrou ainda mais a problemática causada pela resistência bacteriana, pois durante esse período houve uso descontrolado de rémedios para tratar sintomas semelhantes aos sentidos pela Covid. Em consequência dessas situações, se viu a necessidade de novas alternativas para combater a resistência dessas bactérias, e o reposicionamento de remédios surge como uma delas. Um método eficaz, seguro de menor custo para consolidar novas terapias, pois utiliza medicamentos já testado. O derivado de hidralazina, HDZH2, 4DCL mostrou potencial para atuar em conjunto com antibiótico norfloxacina e o brometo de etídio, aumentando sua eficácia e reduzindo as doses necessárias, assim, fortalecendo os mecanismos de ação dos remédios.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A resistência bacteriana, tem sido um problema para a população mundial desde épocas mais remotas, mas, perdurou-se até os dias atuais trazendo desafios significativos para humanidade (Silva., 2023). O desenvolvimento dessa resistência a fármacos está associado a uma diversidade de fatores, tais como: fácil acessibilidade de antibióticos, e a irregularidade na falta de fiscalização em estabelecimentos que fornecem esses medicamentos, assim como diagnósticos imprecisos, que contribuem para o uso excessivo e indevido dessas drogas, além da falta de conhecimento sobre o uso desses antibióticos e a disseminação de informações inadequadas para o autotratamento, assim, desencadeando o esgotamento de antimicrobianos eficazes para o tratamento de infecções bacterianas (Morris, Cerceo, 2020; Freires, Rodrigues júnior, 2022).

Outro fator contribuinte para o avanço da resistência bacteriana, foi o surgimento de uma nova doença causada por um vírus conhecido como, Sars-cov2, descrita como Covid-19, a qual se espalhou e alastrou uma pandemia global, com várias mortes registradas (Freires; Rodrigues júnior, 2022). Além do uso excessivo de antibióticos por parte da população para prevenir ou tratar as doenças e as infecções secundárias associadas a Covid-19 (Pereira, 2024). Desta forma, abrindo as portas para o aumento da resistência bacteriana e possibilitando a seleção de bactérias resistentes independentemente da função pretendida pelo uso do antibiótico (Freires; Rodrigues júnior, 2022)

O aumento da resistência bacteriana a antibióticos dificulta o tratamento de infecções causadas por bactérias do tipo oportunistas, a exemplo de *Staphylococcus aureus* que é um tipo de bactéria comensal. Um dos agentes infecciosos que mais causam morbidade e mortalidade mundial, podendo causar uma grande variedade de enfermidades no organismo humano. Visto isso, essa bactéria foi condicionada como prioridade “alta” para o desenvolvimento de antimicrobianos, já que o seu tratamento é complicado devido a resistência a antibióticos, e não haver disponibilidade de vacinas eficazes (Cheung, Bae, Otto., 2021; Who, 2017).

Existem vários tipos de mecanismos pelos quais a resistência bacteriana pode acontecer. Entre elas a absorção limitada de fármacos, modificação do alvo, inativação enzimática e bombas de efluxo (Yilmaz, Aslantas, 2017). Esta última é uma proteína transmembranar capaz de expulsar substâncias nocivas para o meio extracelular (Oliveira-Tintino, 2021). Uma das principais bombas encontradas em *S. aureus* é a bomba de efluxo

NorA, a qual desempenha um papel fundamental no mecanismo de resistência a múltiplas drogas, principalmente a fluoroquinolonas (Ika Irianti *et al.*, 2023).

Nesse contexto, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas utilizando substâncias de origem natural e sintética como as hidrazidas e hidrazonas, tem atraído a atenção de pesquisadores como possíveis inibidores de mecanismos de resistências e/ou potencializadores de ação dos antibióticos contra bactérias multirresistentes (Nery *et al*., 2023).

Outra substância que vem ganhando bastante destaque devido ao seu efeito sinérgico, é a hidralazina e seus derivados. Substância essa normalmente utilizada para o tratamento de hipertensão e outras doenças (Herman *et al.,* 2024). Recentemente foi descoberto que a hidralazina atua como adjuvante de medicamentos clássicos como oxacilina e a vancomicina demonstrando atividade bactericida contra o *S. aureus* (Nascimento *et al*., 2023).

Diante disso, objetivo do trabalho foi sintetizar uma substância derivada da hidralazina, o HDZH2,4DCL, e avaliar sua atividade antibacteriana direta, assim como, a capacidade de reversão de resistência através da inibição de bomba de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus*.

1.1 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS

A motivação para a realização dessa pesquisa, se deu devido ao aumento significativo do numero de casos de infecções bacterianas causadas por super bactérias resistentes a diversos medicamentos. Pois, é um problema para saúde pública global, e uma das maiores ameaças sanitárias no século. Além da escassez crescente de antibióticos eficazes e contribuição direta no sistema único de saúde (SUS).

Dentro desse contexto, o Trabalho buscar elucidar se a substância HDZH2, 4DCL sintetizada a partir da hidralazina poderá servir de bactericida ou potencializador de antibióticos para tentar reverter a resistência bacteriana a fármacos através da inibição de mecanismos de resistência como bomba de efluxo. Já que em outros momentos, através da sinergia, derivados de hidralazina puderam apresentar diversas atividades biológicas, tais como anticâncer, antifungica e até mesmo antibacteriana

A finalidade desta pesquisa como maneira de produzir conhecimento sobre o tema e sobre a metodologia trabalhada enriquece e valoriza a pesquisa na área, e também contribuir

para a formação pessoal, podendo representar uma contribuição valorosa para a sociedade no âmbito da saúde pública.

1.2 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA

A estratégia utilizada para está pesquisa tem como finalidade principal avaliar o potencial de novas moléculas como agentes moduladores da resistência bacteriana, especificamente por meio de inibição de bombas de efluxo em cepas resistentes de *Staphylococcus aureus.*

A nova molécula de hidrazona foi obtida a partir dos medicamentos comerciais Apresolina®, e Isoniazida, respetivamente. O fármaco Apresolina® de nome genérico hidralazina é usado como redutor emergencial da pressão arterial de pacientes em crise de hipertensão (Ehrenpreis; Ehrenpreis, 2001).

O inibidor de bomba de efluxo utilizado para controle foi: Clorpromazina; Os antibióticos específicos para as bombas de cada bactéria: Norfloxacina para a bomba NorA contida na cepa 1199B,e Ciprofloxacina para bomba MepA presente na K2068. Assim como o DMSO e o Brometo de etidio, todos obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

A utilização dos métodos descritos na metodologia é fundamental para garantir rigor, confiabilidade e relevância na investigação de novos moduladores de bomba de efluxo e potencializadores de antibióticos. O emprego de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a fluoroquinolonas hidrofílicas por meio das bombas de efluxo NorA e MepA permite que os ensaios se aproximem de cenários clínicos reais, nos quais a resistência bacteriana representa um obstáculo crescente ao tratamento de infecções. Trabalhar com cepas bem caracterizadas assegura que os resultados obtidos reflitam mecanismos genuínos de resistência, sendo crucial para avaliar se uma substância é realmente capaz de interferir no processo de extrusão de antimicrobianos.

A padronização dos inóculos pela escala McFarland 0.5 é igualmente indispensável, pois garante que a quantidade de micro-organismos empregada seja uniforme em todos os ensaios. Essa consistência é central para que os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) forneçam valores confiáveis, permitindo determinar com precisão a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento bacteriano. A determinação da CIM é uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de novos antimicrobianos e adjuvantes, pois possibilita comparar a eficácia de diferentes substâncias e estabelecer

parâmetros de sensibilidade, resistência ou ação sinérgica (Clinical and Laboratory Standarts Institute, 2023).

Os ensaios de modificação da ação de antibióticos complementam essa análise ao investigar se um composto é capaz de potencializar o efeito de moléculas já utilizadas clinicamente. No contexto da resistência mediada por bombas de efluxo, esse tipo de teste é essencial, pois revela se a substância estudada consegue inibir o mecanismo que expulsa o antibiótico da célula bacteriana, restaurando ou aumentando sua atividade. Isso abre portas para o uso de doses menores de antimicrobianos, reduzindo efeitos colaterais, diminuindo a pressão seletiva e prolongando a vida útil dos medicamentos existentes (Tintino, *et al.,* 2018).

Por fim, o tratamento estatístico adequado, com testes realizados em triplicata, uso de média geométrica e análise por two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, confere robustez aos resultados. Esses métodos garantem que as diferenças observadas não sejam fruto do acaso, mas sim de efeitos reais e reprodutíveis. Assim, a combinação desses procedimentos metodológicos fortalece a confiabilidade dos achados e contribui significativamente para o avanço no desenvolvimento de novos inibidores de bomba de efluxo e potencializadores terapêuticos.

De inicio a sequência de aminoácidos da proteína MepA de *Staphylococcus aureus* K2068 foi selecionada, e em seguida obtida a partir do banco de dados Universal Protein Resource – UniProt (http://www.uniprot.org), onde se encontra depositada sob o código NCTC8325. Para a modelagem estrutural da proteína, foi utilizado o servidor SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/), o qual realiza a busca por modelos tridimensionais por meio de alinhamentos de sequência utilizando o algoritmo HHBlits (*HMM-HMM-based lightning-fast iterative sequence search*). A estrutura com maior identidade e cobertura de alinhamento foi selecionada como modelo, sendo esta correspondente ao transportador de extrusão de múltiplos fármacos e compostos tóxicos (MATE) de *Bacillus halodurans*, disponível no Protein Data Bank sob o código PDB: 5C6N. (De Araújo et al. 2025; Rezende-Júnior et al. 2020; Pundir et al., 2016; Warraich et al., 2021; Remmert et al., 2012; (Radchenko et al., 2015; Barbosa et al., 2023).

Já para a estrutura da proteína NorA, foi obtida diretamente do RCSB Protein Data Bank (https://www.rcsb.org), sob o código PDB: 7LO7. Esta corresponde à proteína NorA em complexo com o fragmento Fab25, que apresenta resolução de 3,74 Å, e foi determinada por microscopia eletrônica e classificada como proteína transportadora. O organismo de origem foi *Staphylococcus aureus*, com contribuição estrutural de *Homo sapiens.* A seleção criteriosa e a modelagem estrutural das proteínas-alvo associadas à resistência bacteriana permitem

compreender como os compostos sintéticos podem atuar em mecanismos moleculares específicos, como a extrusão de antibióticos. A escolha de estruturas com alta identidade confere maior confiabilidade às simulações, possibilitando a identificação racional de sítios de ligação relevantes ao bloqueio das bombas de efluxo. (Brawley *et al.*. 2022; Da Silva *et al.*, 2025).

As simulações de acoplamento do docking molecular foram conduzidas por meio do software AutoDock Vina, utilizando caixas de delimitação (*grid boxes*) configuradas de modo a englobar integralmente as regiões ativas das estruturas-alvo. Para a proteína MepA, a caixa foi centralizada nas coordenadas x = 9,189; y = –19,589; z = –19,523, com dimensões de 84 × 98 × 118 Å. No caso da proteína NorA, a centralização foi realizada nas coordenadas x = 139,133; y = 138,065; z = 155,834, com dimensões de 108 × 126 × 126 Å. Esse metódo é essencial para prever a afinidade e o modo de ligação entre o composto sintético e proteínas relacionadas à resistência. A validação por redocking e o critério de RMSD garantem precisão metodológica, enquanto a análise da energia livre de ligação indica o potencial do composto em inibir funcionalmente proteínas que contribuem para a multirresistência bacteriana (Trott & Olson, 2010; Wiley *et al.*, 2006; Agarwal & Smith, 2023; Yusuf *et al*., 2008; Shityakov, Förster, 2014).

As subestruturas identificadas como alertas toxicológicos foram analisadas em termos de sua correlação com potenciais efeitos adversos, utilizando o composto HDZCl como modelo para avaliação de similaridade estrutural. Esses efeitos adversos incluem hepatotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade aguda, aspectos críticos para a avaliação da segurança do composto. Esse processo é de suma importância, pois, é crucial para a eliminação dessas substâncias nocivas ainda na fase in silica, garantindo futuras aplicações no combate a resistência bacteriana.

1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A dissertação se encontra dividida em Introdução, Objetivos, Fundamentação Teórica, Produção Científica, Considerações finais.

Esquema 1: Estrutura do trabalho de dissertação



2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana direta da hidrazona HDZH2, 4DCL, assim como, a capacidade de reversão de resistência através da inibição do mecanismo de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus*.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetiza uma nova molécula derivada da hidralazina;
- Avaliar a atividade direta da hidrazona frente as cepas de *Staphylococcus aureus* portadoras da bomba NorA e MepA;
- Avaliar a inibição do mecanismo de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus* portadoras da bomba NorA e MepA;
- Realizar a docagem molecular;
- Verificar a toxicidade através dos testes computacionais de ADMET.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Resistência bacteriana

Dentro de um contexto histórico, os primeiros casos de resistência bacteriana surgiram por volta dos anos de 1942, logo após produção de uma substância capaz de controlar e inibir a proliferação bacteriana, denominada penicilina, que foi descoberto no ano de 1928 pelo microbiologista Alexander Fleming (1881-1955), a partir de experimentos em bactérias do tipo *Staphylococcus aureus* utilizando o fungo *Penicillium notatum* (Varoto; Evangilista; Santos*,* 2023).

Desde épocas mais remotas, o ser humano combate microrganismos, tais como bactérias que causam morbidade e mortalidade na população mundial. Onde, até os dias atuais essa resistência a antibióticos vem sendo um desafio significativo e afetando diretamente os aspectos da saúde global (Silva, 2023). A resistência bacteriana ocorre quando bactérias anteriormente sensíveis a determinados tratamentos passam a não responder mais a esses fármacos. Esse fenômeno é fortemente influenciado por atividades humanas, como a poluição química e biológica, além do uso inadequado e indiscriminado de medicamentos. Adicionalmente, as bactérias podem sofrer alterações em sua própria estrutura ou em seus mecanismos fisiológicos, o que lhes permite adquirir resistência aos antibióticos e sobreviver mesmo na presença desses agentes terapêuticos (Echeverriar, 2023).

O uso generalizado de antibióticos representa um dilema para a saúde pública. Embora sua ampla disponibilidade e prescrição frequente tenham revolucionado o tratamento de infecções, o uso excessivo e inadequado desses medicamentos tem levado ao aumento preocupante de microrganismos multirresistentes. Esse fenômeno se tornou um grande desafio tanto para os profissionais de saúde quanto para os pacientes(Baran A, Kwiatkowsk A, Potocki L, 2023; Dadgostar, 2019)

Além disso, as ações humanas exercem papel central nesse cenário, especialmente por meio do consumo excessivo e do uso inadequado de antibióticos. Soma-se a isso o aumento do fluxo turístico, que favorece a disseminação de bactérias resistentes a múltiplos fármacos em diferentes regiões geográficas, contribuindo para a ampliação global da resistência bacteriana (Dadgostar, 2019).

O crescimento da resistência bacteriana a múltiplos medicamentos representa uma crise global, agravada pela escassez de novos antibióticos eficazes em desenvolvimento (Yuan *et al.,* 2022). Essa diminuição nos estudos farmacêuticos sobre novas classes de

fármacos, provocou a necessidade de novas condutadas para tratar esse problema de multirresistencia bacteriana (Geronikaki *et al.*, 2020). Já que apenas 5 das 20 empresas farmacêuticas da década de 1980 que estiveram envolvidas na produção de novos medicamentos da época estão ativas nos dias de hoje. Pois a maioria delas abandonaram essas áreas de descobertas, possibilitando que outras empresas menores assumissem esta responsabilidade (Nicolaou K, Rigou S, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) em um dos seus últimos relatórios, emitiu uma alerta de crescimento exponencial para altos níveis de resistência em bactérias que causam infecções comuns entre a população mundial (Organização Mundial da Saúde - OMS., 2024).

Bactérias multirresistentes aos antibióticos se configuram como um problema de saúde pública em escala mundial, acometendo tanto países desenvolvidos quanto subdesenvolvidos (Brito, 2021). Estima-se que até o ano de 2050 pelo menos 10 milhões de pessoas morrerão devido ao aumento significativo dos casos de resistência bacteriana aos antibióticos, gerando preocupação entre autoridades de saúde (Arancibia, 2019).

Essa resistência bacteriana a antibióticos é geneticamente codificada, mas pode ocorrer de várias formas, tais como: inativação enzimática, capaz de destruir ou impedir que o fármaco de se ligar aos sítios-alvo; alteração das porinas, proporcionando resistência intrínseca não permitindo a entrada do remédio; alteração do próprio sítio-alvo, impedindo o efeito da ação do antibiótico ou a diminuição; e bomba de efluxo (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2022).

A resistência bacteriana tornou-se um fenômeno cada vez mais frequente, resultado da capacidade adaptativa das bactérias em enfrentar a ação de agentes antibacterianos ao longo dos séculos. O surgimento contínuo de resistência aos antibióticos, aliado à escassez no desenvolvimento de novos fármacos, configura um cenário preocupante para o futuro do tratamento das infecções bacterianas (Uddin TM *et al*., 2021).

3.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus é um gênero que representa mais de 51 espécie, onde boa parte delas apresentam relação ecológica de comensalismo na pele e mucosa de mamíferos (Leroy *et al.,* 2020). Presente no grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*), grupo que apresenta bactérias caracterizadas pela resistência a antibióticos (De Oliveira *et al*., 2020).

Staphylococcus aureus é um dos agentes infecciosos que mais causa morbidade e mortalidade em todo o mundo. É um patógeno que acomete uma grande pluralidade de doenças, desde pneumania e outras infecções do trato respiratório, sítio cirúrgico, articulação protética e infecções cardiovasculares (Cheung GYC, Bae JS, Otto M., 2021; Tong SY *et al.,* 2015).

Este é um microrganismo Gram-positivo, e um dos patógenos humanos que mais causam enfermidades, tais como, infecções leves de pele e feridas até sepse fatal ou falência de múltiplos órgãos (Chen *et al*., 2022). Ultimamente vem causando vários problemas para saúde mundial, como a alta taxa de mortalidade causada pelo desenvolvimento de resistência a medicamentos (Howden *et al.,* 2023).

As infecções podem ser causadas tanto em âmbitos nosocomiais quanto em corpos sociais, podendo variar de situações simples para quadros extremamente fatais. Afetando principalmente certos grupos suscetíveis, como profissionais da saúde, pacientes submetidos a longas hospitalizações, pacientes impossibilitados devido a cirurgias complicadas, e individuos com infecções cutâneas. Tornando-se um problema para esses devido ao aumenta de cepas resistentes a medicamentos dentro desses meios (Rasheed NA, Hussen NR, 2021).

Essa resistência desenvolvida por *S. aureus* se deu através de mecanismos intrínsecos ou adquiridos, como modificação enzimática, mutações, formação de biofilme, modificações na membrana e bomba de efluxo, responsável por expulsar o medicamento do interior da célula bacteriana (Guo Y *et al*., 2019).

3.3 Bombas de Efluxo

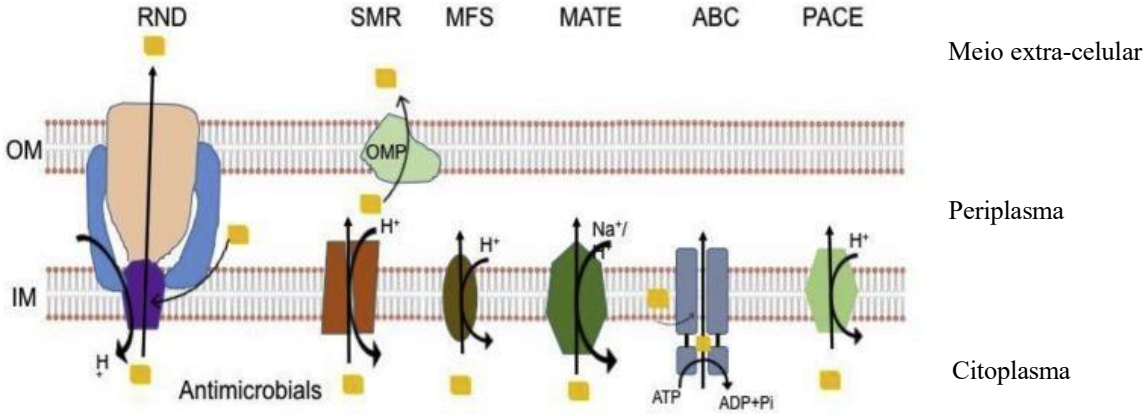
As bombas de efluxo são proteínas responsáveis pelo transporte de compostos nocivos, como antibióticos, para fora da célula bacteriana, reduzindo a concentração dessas substâncias no meio intracelular. Esse mecanismo permite que as bactérias elevem sua resistência a múltiplos fármacos que anteriormente eram eficazes, constituindo um dos principais mecanismos de resistência bacteriana conhecidos (Sharma; Gupta; Pathania, 2019). Além disso, a atuação das bombas de efluxo representa um problema significativo para a saúde pública global, uma vez que há dificuldades no desenvolvimento de novas substâncias capazes de superar esses sistemas de defesa bacterianos (Martin, 2023).

O funcionamento desse sistema de efluxo ocorre por meio da atividade de proteínas localizadas na membrana plasmática das células bacterianas, as quais utilizam a energia proveniente da hidrólise de ATP para transportar ativamente medicamentos do meio

intracelular para o meio extracelular (Freitas *et al*., 2021). As famílias de bombas de efluxo são compostas por proteínas transportadoras que removem do interior celular não apenas antibacterianos, mas também solventes orgânicos e metais pesados tóxicos, assegurando, assim, a resistência a múltiplos fármacos e contribuindo para a sobrevivência bacteriana (Huang *et al*., 2022).

As bombas de efluxo estão presentes ubiquamente na membrana plasmatica, e podem ser divididas em seis famílias (Figura 1), as quais se diferenciam pelas subunidades em suas estruturas, a saber: Superfamília Principal Facilitadora (Major Facilitator Superfamily [MFS]); Superfamília Ligada à ATP Cassete (ATP-binding cassette superfamily [ABC]); Pequena Família de Resistência a Múltiplos Medicamentos (Small multidrug resistance family [SMR]); Superfamília de Divisão Celular de Nodulação de Resistência, (Resistance-nodulation-cell division superfamily [RND]); Superfamília de Extrusão de Multidrogas e de Compostos Tóxicos (Multidrug and toxic compound extrusion family [MATE]) e Superfamília de Efluxo de Compostos Antimicrobianos Proteobacterianos (Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux [PACE]) (Kabra *et al*, 2019; Spengler *et al.,* 2017)

FIGURA 1: Principais famílias de bombas de efluxo



Fonte: Adaptado de KABRA et al., 2019

3.3.1 Bombas de efluxo *NorA* e *MepA*

A bomba de efluxo NorA pertence a família MFS (*Major Facilitador Superfamily*) e está presente em cepas de *Staphylococcus aureus* (Oliveira-Tintino *et al.,* 2023). É uma proteína que possui 388 aminoácidos com 12 segmentos transmembranar, e que são

responsáveis pelo aumento da resistência a antibióticos expelindo as substâncias nocivas através da força motriz de prótons para o meio extra-celular (Costa *et al.,* 2019).

Existe um grande potencial clínico nas bombas de efluxo NorA presentes em *S. aureus,* já que são os mecanismos de resistência mais eficazes nessas bactérias, e expressam os genes em resposta a fluoroquilonas, biocidas, corantes, compostos de amônio quaternário e antissépticos (Chandal *et al*., 2023). Tendo a NorA como alvo terapêutico, vários inibidores de efluxo vem se mostrando promissores como adjuvantes para inibir a ação dessas proteínas (Sharma; Gupta; Pathania, 2019).

Diversos compostos já foram identificados como potenciais inibitório da bomba de efluxo NorA, porém, poucos deles foram aprovados para o uso clínico devidos aos seus perfis de toxidade ,exceto, o nilotinibe um inibidor de tirosina quinase com boas atividades inibitórias da bomba de efluxo em combinação com a ciprofloxacina (Zimmermanna *et al.,* 2019).

Outra bomba de efluxo capaz de expulsar substâncias nocivas do meio intracelular para o extracelular das bactérias, é a bomba de efluxo MepA. Uma proteína da família MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*), capaz de expelir drogas e toxinas, sendo a única proteína MATE codificada no genoma de *S. aureus* (Schindler *et al*., 2013). A expressão de MepA é regulada por MepR, uma proteína transcricional de gene associado a MepA encontradas em *S. aureus* (Kaatz; Mcaleese; Seo, 2005).

A bomba de efluxo MepA é expressada pelo gene mepA, e é a responsável pela extrusão de algumas classes de compostos, como fluroquinolonas e quaternários de amônio (ARAUJO NJS, *et al.,* 2023). Esse sistema de efluxo também está relacionado na resistência de *S.aureus* no medicamento tigeciclina, um importante antibiótico para o tratamento de infecções bacterianas multirresistentes (Huang H, *et al*., 2023)

A forma pela qual as bactérias adquirem resistência aos antibiótico é reduzindo as concentrações do meio intracelular através da bomba de efluxo, visto isso, se vê uma extrema importância em aumentar a eficácia dos antibióticos utilizando inibidores de bomba de efluxo para superar este tipo de resistência (Seo; Kim; Jim, 2024).

3.4 Derivados de hidrazona

A hidralazina é um derivado da ftalazina, e atua como agente anti-hipertensivo que age por relaxamento direto do músculo liso arteriolar, dada a alteração na sinalização de cálcio intracelular. Foi um dos primeiros farmacos anti-hipertensivos postos na medicina clínica e

utilizado pela primera vez na década de 1950, sendo aprovado somente em 1984 (Cinical and research information on drug-induced liver injury, 2018). Esse é um medicamento utilizado como vasodilatador que pode atuar no tratamento de hipertensão e como um inibidor da metilação do DNA (Ruiz-Maganâ, 2016). A vasodilatação gerada pela hidralazina é continuada por uma resposta simpática reflexa que pode retroceder moderadamente seus efeitos anti-hipertensivos (Cinical and research information on drug-induced liver injury, 2018)

Como vasodilatador direto, pode ser utilizado por via oral no tratamento de hipertensão arterial essencial, além de outras doenças, e por via intravenosa para diminuir celeremente a pressão arterial em casos de urgência ou emergência hipertensiva (Herman LL, Bruss ZS, Tivakaran VS, 2023).

A hidralazina também vem sendo considerada no tratamento contra o câncer, já que possui atividades anticancerígenas, devido às suas propriedades de agir como um agente desmetilador, desmetilando genes supressores de tumor, restabelecendo sua função e reativando seus efeitos (Koltai, 2023). A hidralazina ganhou mais forças ainda em ações anticâncer devido a sua atividade sinergica com o dissulfiram, atuando como adjuvante na quimioterapia combinada, podendo superar a resistência com menos efeitos adversos em comparação à quimioterapia isoladamente (Lafi Z, *et al.,* 2023).

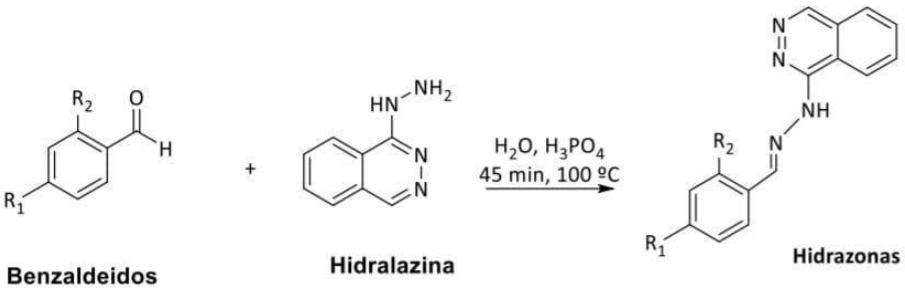
Nos últimos anos, essa sinergia entre fármacos vem sendo objeto de pesquisa para intervenção de múltiplas doenças, pois a combinação de substâncias mostrou-se promissora no tratamento de enfermidades mais complexas, proporcionando a ação simultânea sobre os diversos alvos, assegurando maior eficácia e menos probabilidade de resistência aos medicamentos empregados. Essas interações sinérgicas, podem ser notadas tanto em extratos vegetais, quanto em produtos naturais e fármacos sintéticos, que demonstram grande potencial terapêutico (Casanova LM; Costa SS).

Foi possível observar na hidralazina um potencial promissor como antifúngico, atuando em sinergia com o itraconazol levando a morte celular da *Candida spp* (Nascimento, *et al.,* 2023). Além do seu potencial antifúngico, as hidralazinas também podem ser utilizadas como antibacterianos, já que as infecções bacterianas vem se tornando cada vez mais difíceis de combater, pois as mesmas vêm adquirindo resistência contra os fármacos aos quais antes eram suscetíveis. A atividade sinérgica das hidralazinas possibilitou potencializar medicamentos como oxacilina e vancomicina no combate a bactérias como *Staphylococcus aureus* (Nascimento *et al.,* 2024).

A estrutura geral de compostos orgânicos como as Hidrazonas é caracterizada por –C=N–NH–. Essas substâncias podem ser obtidas através da condensação de hidrazinas com cetonas ou aldeídos (Guimarães *et al.,* 2017). Enquanto isso, as *N*-acilidrazonas apresentam uma estrutura como C=N-NH-(C=O)-, onde são desenvolvidas pela condensação de hidrazidas com compostos carbonílicos (Thota *et al*., 2018). Considerando sua importância química para medicina, destaca-se as estruturas químicas das hidrazonas e *N*-acilidrazonas (Arruda *et al*., 2018). A partir do desenvolvimento de novos compostos derivados das hidrazonas, foi possível observar que elas apresentam uma grande variedade de atividades farmacológicas e biológicas (Verma, 2014).

Com o passar dos anos, o grupo funcional das hidrazonas vem ganhando cada vez mais destaque na química medicinal. Isso acontece devido a sua funcionalidade e versatilidade nas suas aplicações dentro das áreas de farmacologia e biologia, além da sua estrutura simples passível a alterações (Figura 2) (Guimarães *et al.,* 2017). Pois, são compostos versáteis para a síntese de sistemas heterocíclicos, possuindo um vasto espectro de bioativades que incluem propriedade antibacterianas, antituberculosas, antifúngicas, anticancerígenas, anti-inflamatórias, anticonvulsivantes, antidepressivas, antivirais e antiprotozoárias(Popiołek Ł., 2021; Rollas S., Küçükgüzel Ş.G, 2007; Angelova V., *et al,* 2016; Popiołek Ł, 2010). Alguns derivados de hidrazonas que apresentaram atividade antibacteriana se mostraram promissores contra bactérias Gram-positiva, como *Staphylococcus epidermidis.* Outra sintetizada a partir de hidrazidas-hidrazonas como um derivado do benzimidazo, mostrou atividade contra *Staphylococcus aureus.* Além de novas hidrazidas-hidrazonas sintetizadas do ácido isonicotínico, mostraram ação bactericida contra cepas de *S. aureu* (Popiołek Ł, 2021; Popiołek Ł, Biernasiuk A, Malm A. Design, 2016; Yadav S, 2018; Popiołek *et al*., 2018).

FIGURA 2: Alteração Estrutural da Hidralazina.



4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Manuscrito1 – Análise do Efeito Antibacteriano e Adjuvante da Hidrazona HDZH2,4DCL sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* portadoras de Bombas de Efluxo

Autores: Davi Ramalho Furtado[1], Janaina E. Rocha[1], Karla Susanna Tavares Grangeiro Belém[1], Milena Oliveira Andrade Moreira[1], José Weverton Almeida-Bezerra[1], Jaiza Maria Lima Dias, Jessiaca Bezerra Maciel, Thiago Sampaio de Freitas[1,] Ana Joyce Morais Bendo[1,], Francisco das Chagas Lima Pintod, Emmanuel Silva Marinho, Marcia Machado Marinho,Alexandre M. R. Teixeira[1] Henrique D. M. Coutinho [1,] Hélcio S. dos Santos[1,2,†*]

Revista submetida: *Microbial Pathogenesis*

Fator de Impacto: 3,5

Situação: Submetido

Resumo do artigo em português

Os primeiros casos de resistência bacteriana passaram a ser notados logo após o descobrimento do primeiros antibiotico pelo microbiologista Alexander Fleming. Passando a ser um problema cada vez mais recorrente para a saúde pública global, e se intensificando ainda mais durante o período pandemico da Covid-19 causada pelo vírus Sars-cov2. Graças a isso, o aparecimento de cepas bacterianas resistentes a múltiplos antibióticos tornou-se um problema global, especialmente as bactérias do grupo ESKAPE. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva que possui vários mecanismos de resistência, incluindo proteínas de efluxo, como as das famílias MFS e MATE, que permitem a sobrevivência de bactérias em ambientes hospitalares e facilitam o acúmulo de mutações de alto nível, dificultando o tratamento de infecções. A hidrazona HDZH2,4DCL, derivada da hidralazina, foi investigada quanto ao seu potencial antibacteriano e adjuvante em inibir sistemas de efluxo em cepas de *S. aureus*. O estudo utilizou cepas de *S. aureus* que superexpressam genes de bombas de efluxo (NorA e MepA). Ensaios de atividade antibacteriana direta e testes de inibição de bombas de efluxo foram realizados utilizando métodos padrão de microdiluição e análise visual com resazurina, além de estudos de docking molecular e ADMET. Os antibióticos ciprofloxacino e norfloxacino foram utilizados, assim como o agente intercalante de DNA brometo de etídio (EtBr) e os inibidores CCCP e CPZ. A hidrazona HDZH2,4DCL não apresentou atividade antibacteriana intrínseca significativa, com valores de CIM ≥ 1024 μg/mL. No entanto, foi capaz de potencializar o efeito do brometo de etídio na cepa K2068, que expressa a bomba de efluxo MepA, mas não apresentou o mesmo efeito na cepa 1199B, que expressa a bomba de efluxo NorA. Esses achados indicam que a hidrazona pode exercer um efeito adjuvante em sistemas específicos de efluxo, destacando a importância da exploração de diferentes compostos e de suas variações estruturais no combate à resistência bacteriana.Técnicas de docking molecular foram empregadas para avaliar a viabilidade da formação do complexo receptor–ligante e a reprodutibilidade dos resultados. As simulações de docking demonstraram que a HDZH2,4DCL apresenta um potencial efeito sinérgico para *S. aureus*

K2068 (que expressa MepA) e seletividade contra cepas de *S. aureus* 1199B (que superexpressam NorA), além de apresentar baixo risco de toxicidade quando ingerida. Embora a hidrazona HDZH2,4DCL não tenha demonstrado atividade antibacteriana direta significativa, seu potencial adjuvante na inibição de bombas de efluxo justifica a realização de novas investigações voltadas ao desenvolvimento de terapias combinadas mais eficazes contra bactérias resistentes.

Palavras-Chaves: Resistência bacteriana; Bombas de efluxo; NorA; MepA; Hidrazona

Microbial Pathogenesis

Analysis of the Antibacterial and Adjuvant Potential of a new chlorinated hydrazone derived from the drug hydralazine against Efflux Pump–Overexpressing Staphylococcus aureus Strains

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Short Communication
Keywords:	Bacterial resistence; Eflux pumps; NorA; MepA; Hydrazone
Corresponding Author:	Helcio Santos State University of Acaraú Valley EUsébio, Brazil
First Author:	Davi Ramalho Furtado
Order of Authors:	Davi Ramalho Furtado
	Janaina Esmeraldo Rocha
	Karla Susanna Tavares Grangeiro Belém
	Milena Oliveira Andrade Moreira
	José Weverton Almeida-Bezerra
	Thiago Sampaio de Freitas
	Ana Joyce Morais Bento
	Jaiza Maria Lima Dias
	Jessiaca Bezerra Maciel
	Henrique Douglas Melo Coutinho
	Francisco das Chagas Lima Pinto
	Emmanuel Silva Marinho
	Marcia Machado Marinho
	Alexandre Magno Rodrigues Teixeira
	Helcio Santos
Abstract:	The first cases of bacterial resistance were observed shortly after the discovery of the first antibiotic by the microbiologist Alexander Fleming. Over time, bacterial resistance became an increasingly recurrent problem for global public health, intensifying even further during the COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus. As a result, the emergence of bacterial strains resistant to multiple antibiotics has become a global

1. **Introdução**

Com o descobrimento dos primeiros antibioticos durante os anos de 1928 pelo microbiologista Alexander Fleming (1881-1955), surgiram também os primeiros problemas de resistência bacteriana, os quais se estenderam até os dias de atuais (Varoto; Evangelista; Santos., 2023). A resistência bacteriana virou uma ocorrência cada vez mais comum no mundo moderno, já que durante a pandemia da Covid-19, causada pelo vírus Sars-cov2, juntamente com a falta de conhecimento sobre medicamentos e a disseminação de falsas informações sem qualquer embasamento científico, passou a gerar diversas preocupações para a saúde pública global (Freires; Rodrigues Júnior, 2022; Uddin *et al*., 2021). Visto que o aumento do uso de antibióticos durante esse período, agravou ainda mais os casos de multirresistência (Santos *et al.,* 2023).

As superbactérias resistentes a múltiplos antibióticos passaram a gerar vários problemas para a saúde pública global, como o caso das bactérias presentes no grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*), as quais apresentam mecanismos de resistência contra várias classes de antibióticos, dentre eles a presença de proteínas de efluxo das famílias MFS e MATE (Oliveira *et al*., 2020).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva que varia entre colonizador assintomático e patógeno invasivo, dependendo de fatores bacterianos intrínsecos e interações com o hospedeiro (Howden *et al*., 2023). Expressa fatores de proteção, através de mecanismos intrínsecos ou adquiridos, como modificação enzimática, mutações, formação de biofilme, modificações na membrana e bomba de efluxo (Guo Y *et al*., 2019).

As bombas de efluxo são proteínas transportadoras presentes na membrana plasmática das células bacterianas, que por meio de hidrólise de ATP, conduz ativamente os medicamentos do meio intracelular para o meio extracelular, capacitando a bactéria a elevar sua resistência a múltiplas drogas que antes eram eficientes (Freitas TS, *et al.,* 2021; Sharma, Gupta, Pathania, 2019).

A bomba de efluxo é um mecanismo de resistência de baixo nível, mas importante na prática clínica, uma vez que permite a sobrevivência de populações bacterianas que poderão acumular diversas mutações de alto nível, dificultando o tratamento (Ebbensgaard; Lobner-Olesen; Frimodt-Moller, 2020). Cepas de *Staphylococcus* portadoras de bomba de efluxo estão relacionadas com a permanência destas em ambiente hospitalar, mesmo após

desinfecção, aumentando a probabilidade do acúmulo de mutações que codificam variados mecanismos de resistência (Dashtbani-Roozbehani, Abolfazl; Brown, 2021).

Diversas são as proteínas de efluxo encontradas em cepas de *S. aureus*, com distribuições variadas entre as regiões do globo. Apesar da larga variação, as proteínas de efluxo NorA, Norb, NorC e MepA foram as mais associadas às cepas resistentes à fluoroquinolonas, com predominância dos genes NorA nas américas (Hassanzadeh *et al*., 2020). Para combater a resistência aos antimicrobianos, o desenvolvimento de novos antibióticos, bem como, métodos para melhorar a atividade de antibióticos já em uso clínico, são as estratégias apresentadas (Murugaiyan *et al*., 2022). Dentre as opções para melhoria da atividade de antibióticos já em uso, a terapia combinada de compostos se destaca, com a possibilidade de atuação de fármacos como adjuvante do efeito antibiótico, exibindo efeitos sinérgicos (Pulingam *et al*., 2022).

Dentre as terapias adjuvantes, o desenvolvimento de moléculas capazes de inibir bombas de efluxo está dentro de um roll de terapias promissoras (Thakur; Uniyal; Tiwari, 2021). Ao inibir as proteínas de efluxo, os inibidores de bomba conseguem melhorar o desempenho de um antibiótico, tornando-o novamente eficaz no controle de uma infecção por bactérias resistentes (Almatar *et al*., 2021). A descoberta de moléculas que consigam inibir bombas de efluxo torna-se essencial para a reversão da resistência bacteriana, seja através da prospecção de fitoquímicos ou do desenvolvimento de moléculas com base em estruturas químicas previamente estudadas e modificadas para tal fim (Gaurav *et al*., 2023), sendo que substâncias sintéticas em uso na prática clínica para este fim, superam os fitoquímicos prospectados (Chawla *et al*., 2022).

Hidrazonas são compostos orgânicos formados pela reação entre uma hidrazina e um aldeído ou cetona, com a substituição de um oxigênio do grupo funcional por NNH2 (SHARMA, 2020), resultando em compostos contendo o grupamento azometina R-NHN=CH-R (Arunkumar *et al*., 2020). Elas têm várias aplicações em síntese orgânica, química medicinal, química analítica e estudos de mecanismo (Balgotra *et al*., 2020).

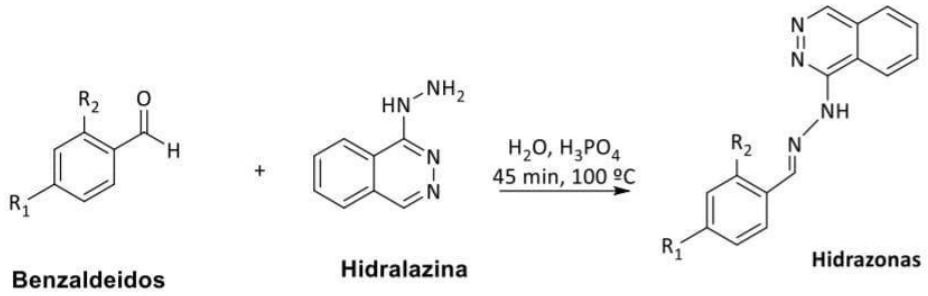
Devido a sua estrutura facilmente modificável, são compostos que apresentam elevado potencial para atividades biológicas diversas (Sedaghat *et al*., 2023; SHI *et al*., 2022). Compostos derivados de hidrazona apresentam, descritos na literatura, atividade anticâncer (Devi; Kumar; Taxak, 2022), antioxidante (Basaran *et al*., 2022), potencial contra doença de Alzheimer (Çevik, Ulviye Acar *et al*., 2020), antiviral (Tian, Jia *et al*., 2022) e antibacteriano (Shah *et al*., 2022).

Este estudo tem como objetivo investigar o potencial antibacteriano da hidrazona HDZH2,4DCL, derivada da hidralazina. Foram avaliados tanto o seu efeito antibacteriano direto quanto o seu potencial adjuvante na inibição de sistemas de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus* que expressam as bombas NorA e MepA.

2. Materiais e métodos

2.1. Síntese da Hidrazona

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, 0,50 mmol de 2,4-diclorobenzaldeído foi misturado com 0,50 mmol do fármaco hidralazina, 9,0 mL de água destilada e 1,0 mL de H_3PO_4 concentrado (Esquema 1). A mistura reacional foi submetida à agitação magnética e aquecida a 100 °C por 45 minutos. Em seguida, foram adicionados 15 mL de etanol absoluto à mistura reacional, que foi então filtrada, sendo o filtrado coletado em um béquer. O resíduo retido no papel de filtro foi descartado, e ao filtrado foram adicionados 20 mL de uma solução aquosa fria de $NaHCO_3$ a 5,0% (m/v). O sólido formado foi filtrado a vácuo, lavado com etanol absoluto frio e seco à temperatura ambiente. Por fim, o sólido foi removido do papel de filtro e pesado.



Esquema 1. Síntese da hidrazona

1H NMR (500 MHz, DMSO); δH 12.43 (s, NH-1), 8.70 (d, J = 8.6 Hz, H-6'), 8.66 (s, H-7'), 8.35 (d, J = 7.9 Hz, H-8), 8.20 (s, H-4), 7.78 (3H, m, H-5/H-6/H-7), 7.67 (d, J = 2.2 Hz, H-3'), 7.49 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, H-5'). 13C NMR (125 MHz, DMSO); δC 149.5 (C-1), 147.3 (C-7'), 138.4 (C-4), 134.6 (C-1'), 133.7 (C-2'), 132.7 (C-6), 131.9 (C-7), 131.5 (C-3'), 129.8 (C-6'), 129.0 (C-4'), 127.5 (C-5'), 127.2 (C-4a), 126.5 (C-5), 125.7 (C-8a), 124.0 (C-8).

2.1.1. Detalhes computacionais

As simulações foram conduzidas em um sistema operacional de 64-bits. As extensões utilizadas foram: Avogadro (http://avogadro.cc/), MarvinSketch (http://www.chemaxon.com), UCSF Chimera (https://chimeratool.com/pt), Discovery studio visualizer viewer (https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download), AutodockTools (El-Hachem

et al., 2017) and AutoDockVina (Morris et al., 2009). Ademais, os códigos aplicados são de acesso livre e destinados ao uso acadêmico.

2.1.2. **Preparação de ligantes**

A estrutura molecular da hidrazona HDZH2,4DCL Fig 1, foi inicialmente modelada por meio do ambiente gráfico disponibilizado pelo software MarvinSketch (ChemAxon, disponível em: https://chemaxon.com/products/marvin). Posteriormente, a referida estrutura foi submetida a um processo de otimização conformacional com base no campo de força clássico Merck Molecular Force Field 94 (MMFF94), visando à obtenção de uma geometria energeticamente mais estável. As etapas de minimização de energia foram executadas no programa Avogadro® (Snyder & Kucukkal, 2017), devidamente configurado para a utilização do formalismo MMFF94, implementando-se o algoritmo *Steepest Descent*. Foram realizadas 500 iterações, adotando-se como critério de convergência o valor de 1×10^{-7}, conforme os parâmetros estabelecidos por Donchev *et al.* (2005).

2.1.3. **Obtenção e preparação das estruturas de proteínas**

A sequência de aminoácidos da proteína MepA de *Staphylococcus aureus* K2068 foi selecionada com base nas adaptações metodológicas descritas por De Araújo *et al*. (2025), bem como por Rezende-Júnior *et al*. (2020). Esta sequência foi obtida a partir do banco de dados Universal Protein Resource – UniProt (http://www.uniprot.org), onde se encontra depositada sob o código NCTC8325 (Pundir *et al*., 2016; Warraich *et al*., 2021). Para a modelagem estrutural da proteína, foi utilizado o servidor SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/), o qual realiza a busca por modelos tridimensionais por meio de alinhamentos de sequência utilizando o algoritmo HHBlits (*HMM-HMM-based lightning-fast iterative sequence search*) (Remmert *et al*., 2012). A estrutura com maior identidade e cobertura de alinhamento foi selecionada como modelo, sendo esta correspondente ao transportador de extrusão de múltiplos fármacos e compostos tóxicos (MATE) de *Bacillus halodurans*, disponível no Protein Data Bank sob o código PDB: 5C6N (Radchenko et al., 2015; Barbosa *et al*., 2023).

Adicionalmente, a estrutura da proteína NorA foi obtida diretamente do RCSB Protein Data Bank (https://www.rcsb.org), sob o código PDB: 7LO7. Esta corresponde à proteína NorA em complexo com o fragmento Fab25, apresenta resolução de 3,74 Å, foi determinada por microscopia eletrônica e é classificada como proteína transportadora. O organismo de

origem foi *Staphylococcus aureus*, com contribuição estrutural de *Homo sapiens*, conforme caracterização recente por Brawley *et al*. (2022) e aplicada nos estudos Da Silva *et al*., (2025).

2.1.4. **Procedimentos gerais do dockin**

As simulações de acoplamento molecular (*docking*) foram conduzidas por meio do software AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010), utilizando caixas de delimitação (*grid boxes*) configuradas de modo a englobar integralmente as regiões ativas das estruturas-alvo. Para a proteína MepA, a caixa foi centralizada nas coordenadas x = 9,189; y = –19,589; z = –19,523, com dimensões de 84 × 98 × 118 Å. No caso da proteína NorA, a centralização foi realizada nas coordenadas x = 139,133; y = 138,065; z = 155,834, com dimensões de 108 × 126 × 126 Å.

A preparação prévia das estruturas tridimensionais das proteínas e dos respectivos ligantes incluiu a adição de cargas parciais segundo os modelos de *Gasteiger* e *Kollman*, bem como a introdução de hidrogênios apolares associados aos seus respectivos átomos pesados, conforme os protocolos estabelecidos para utilização no AutoDock Vina. Todos os demais parâmetros do programa foram mantidos em seus valores predefinidos (Wiley *et al*., 2006).

Para cada ligante, foram realizadas cinquenta execuções independentes, sendo geradas vinte conformações de encaixe (*poses*) por execução. O parâmetro de *exhaustiveness* foi ajustado para o valor 64, de modo a assegurar uma amostragem abrangente e representativa do espaço conformacional. A seleção da pose representativa considerou a menor energia livre de ligação prevista, assumindo-se tal conformação como a mais estável do complexo ligante-proteína, a qual foi, então, utilizada para análises estruturais e energéticas subsequentes (Agarwal & Smith, 2023).

Com o propósito de validar, tanto estatística quanto metodologicamente, os protocolos de acoplamento molecular empregados, foram realizadas simulações de redocking, nas quais os ligantes co-cristalizados foram reposicionados em suas respectivas proteínas-alvo. A acurácia dessas simulações foi avaliada por meio do cálculo do desvio quadrático médio das posições atômicas (Root Mean Square Deviation – RMSD) entre as poses previstas e as estruturas experimentais originais. Valores de RMSD inferiores ou iguais a 2,0 Å foram adotados como indicativo de validação satisfatória, em conformidade com os critérios amplamente estabelecidos na literatura especializada (Yusuf *et al*., 2008).

A estabilidade dos complexos formados entre proteínas e ligantes foi inferida com base nos valores de energia livre de ligação estimados nas simulações de docking.

Consideraram-se energeticamente favoráveis e, portanto, potencialmente estáveis, os complexos que apresentaram afinidades inferiores a –6,0 kcal/mol, conforme proposto por Shityakov e Förster, (2014).

Todas as simulações foram executadas sob condições parametrizadas de maneira uniforme, assegurando rigor metodológico e possibilitando comparações consistentes entre os dados obtidos. O desempenho dos ligantes investigados foi comparado àquele apresentado por antibióticos de referência utilizados como controles positivos nos respectivos sistemas: CCCP (carbonyl-m-chlorophenyl hydrazone cyanide), CPZ (chlorpromazine) e EtBr (ethidium bromide).

2.1.5. **Semelhança à fármacos e propriedades ADME**

Conforme o protocolo estabelecido por De Oliveira *et al*., (2024) e Silva *et al*., (2025), as propriedades físico-químicas do composto HDZH2,4DCL foram determinadas utilizando o software MarvinSketch (ChemAxon, licença acadêmica). Os parâmetros calculados foram analisados de acordo com os critérios de drug-likeness definidos pelas diretrizes clássicas da Regra dos Cinco de Lipinski, (2004) e Lipinski *et al*., (2012) (Pfizer), bem como pela Regra de Veber, (2002) (GSK). Esses critérios consideram limites críticos para propriedades como logP, peso molecular, número de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, além da superfície polar topológica (TPSA) e do número de rotações livres, fatores fundamentais para a previsão da viabilidade de absorção e eficácia de fármacos.

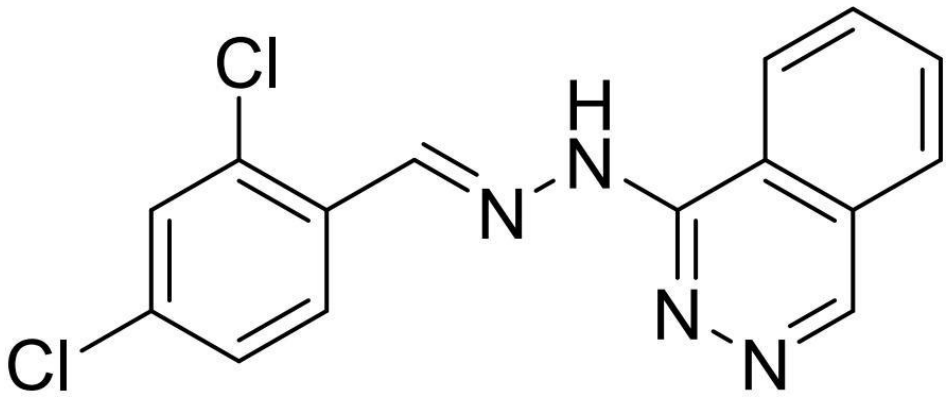
Adicionalmente, foi aplicada a metodologia de Otimização Multiparamétrica para Penetração no Sistema Nervoso Central (CNS MPO) (Wager *et al*., 2010; Rocha *et al*., 2021), integrada ao software utilizado, com o objetivo de prever o potencial do composto para atravessar a barreira hematoencefálica (BBB), um critério essencial para fármacos com atividade central.

Os parâmetros farmacocinéticos relacionados à absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) foram estimados por meio de uma abordagem de consenso, que combinou as predições do servidor PreADMET, baseado em modelos in vitro (https://preadmet.bmdrc.kr/adme-prediction/), com os resultados das ferramentas de triagem in silico disponíveis no servidor SwissADME (http://www.swissadme.ch/), com o intuito de maximizar a robustez das inferências sobre a viabilidade biofarmacêutica do composto.

2.1.6. **Efeitos toxicológicos**

Subestruturas identificadas como alertas toxicológicos foram analisadas quanto à sua correlação com potenciais efeitos adversos, utilizando o composto HDZH2,4DCL como modelo para avaliação de similaridade estrutural. Essa análise foi complementada por dados preditivos obtidos a partir dos servidores PreADMET (https://preadmet.bmdrc.kr/toxicity/) e ProTox-3.0 (https://tox.charite.de/protox3/index.php?site=home), possibilitando a associação das subestruturas identificadas com seus respectivos riscos toxicológicos. Esses riscos incluem hepatotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade aguda, aspectos críticos para a avaliação da segurança do composto.

FIGURA 1: Estrutura da HDZH2,4DCL



2.2. Cepas Bacterianas

Foram utilizadas as cepas *Staphylococcus aureus* 1199B, e mantida em ágar sangue (Laboratorios Difco Ltda., Brazil); a cepa *Staphylococcus aureus* K2068 e a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para controle negativo. Ambas as cepas são portadoras de proteínas de efluxo, superexpressando o gene NorA e o gene MepA, respectivamente. Para a realização dos testes, as cepas foram cultivadas em BHI agar (microMED – ISOFAR, Duque de Caxias RJ, Brazil) e mantidas em incubadora bacteriológica (SANYO, model MOC-17AC, Japan) a 37ºC no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). O cultivo foi realizado 24 horas antes dos testes.

2.3. **Teste de atividade antibacteriana direta**

Para o teste de atividade antibacteriana intrínseca da substância, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Javadpour *et al*., (1996), com modificações. Os inóculos foram preparados 24 horas após o cultivo das cepas, em solução salina 0,9%, com turbidez mensurada pela escala McFarland 0,5 (1 x 10^8 Unidades Formadoras de Colônia/mL). Microtubos Eppendorf® (CRALPLAST, Cotia SP, Brasil) foram preenchidos com 900 µL de caldo BHI 10% (Brain Heart Infusion) e 100 µL do inóculo bacteriano. Os microtubos foram utilizados para o preenchimento de placas de microdiluição (CRALPLAST, Cotia SP, Brasil) com 100 µL da solução em cada poço.

As placas foram microdiluídas com a hidrazona e com o inibidor padrão de bomba de efluxo clorpromazina (SIGMA-ALDRICH, ST. LOUIS, EUA), ambos em uma concentração inicial de 1024 µg/mL, na proporção de 1:1. A concentração nos poços variaram de 512 µg/mL no primeiro poço a 8 µg/mL no penúltimo poço. Após 24 horas de incubação a 37 ºC em incubadora bacteriológica, os valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram mensuradas por método visual utilizando o reagente Resazurina (VETEC, Rio de Janeiro RJ, Brasil) (ABD Algaffar *et al*., 2021).

2.4. **Teste de atividade Inibitória das Bombas de Efluxo**

Para a determinação do potencial adjuvante da hidrazona, foi empregada a metodologia de Coutinho e colaboradores (2008), com adaptações. As concentrações subinibitórias dos compostos ([SubI] = CIM/8), foram calculadas e convertidas em termos de volume a ser colocado em microtubos com volume final de 1.500 µL. A solução dos microtubos foi composta por 150 µL de inóculo + volume correspondente à concentração subinibitória de cada substância + volume de BHI 10% (microMED – ISOFAR, Duque de Caxias RJ, Brasil).

Os controles dos antibióticos e do Brometo de Etídio também foram preparados em microtubos Eppendorf® (CRALPLAST, Cotia SP, Brasil) contendo apenas 1350 µL de meio BHI 10% e 150 µL de inóculo bacteriano.

O processo de microdiluição foi realizado com os antibióticos específicos para cada cepa e com o Brometo de Etídio (SIGMA-ALDRICH, ST. LOUIS, EUA). As concentrações nos poços variaram de 512 µg/mL, no primeiro poço da placa de uma determinada coluna a 0,5 µg/mL no penúltimo poço. A análise da presença da bomba de efluxo foi realizada comparando as Concentrações Inibitórias Mínimas de brometo de etídio na presença do inibidor padrão Clorpromazina e na sua ausência (Controle). Uma redução dos valores das CIMs significa a presença do mecanismo de efluxo.

O teste de brometo de etídio é um método simples e seguro para a predição da inibição de bombas de efluxo, em cepas portadoras de genes que codificam tais proteínas, como no caso das cepas 1199B e K2068. Amaral e colaboradores (2010) validaram o teste do Brometo de Etídio com esta finalidade após demonstrar o acúmulo de brometo de etídio no interior de cepas transportadoras de bombas de efluxo após adição de inibidores como CCCP e Clorpromazina.

2.5. **Análise Estatística**

Os dados centrais e desvios padrões foram obtidos de acordo com a metodologia de Freitas *et al*., (2021a), sobre análise microbiológica em placas de microdiluição. Foi realizado um teste ANOVA de uma via, com teste post hoc de Bonferroni. Para a análise, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6.01, considerando $p < 0,05$ como significativo e $p > 0,05$ não significativo.

3. Resultados e discussão

3.1. Molecular docking

3.1.1. Docking molecular contra MepA

Com base em um conjunto de simulações independentes de docking molecular, o ligante HDZH2,4DCL apresentou a energia de ligação mais favorável (–8,0 kcal/mol), sugerindo uma interação mais forte e, consequentemente, maior afinidade pelo receptor quando comparado aos demais ligantes testados, como o brometo de etídio (–7,9 kcal/mol), a clorpromazina (–6,1 kcal/mol) e o CCCP (–5,9 kcal/mol). Esses resultados indicam que a HDZH2,4DCL pode apresentar um potencial significativo para se ligar de forma estável à MepA, demonstrando desempenho comparável ou superior ao de ligantes conhecidos.

No entanto, ao considerar o desvio quadrático médio (RMSD), que avalia a acurácia da conformação predita, o CCCP apresentou o melhor alinhamento com a estrutura experimental, com um valor de RMSD de 0,766 Å, indicando maior precisão preditiva. Em contraste, a HDZH2,4DCL apresentou o maior valor de RMSD (1,680 Å), sugerindo que, embora interaja fortemente com o receptor, a pose predita apresenta um leve desvio em relação às estruturas experimentais cocristalizadas. Ainda assim, o valor de RMSD obtido para a HDZH2,4DCL permanece dentro de limites aceitáveis para simulações de docking, indicando que a predição, embora ligeiramente menos precisa, ainda é considerada válida

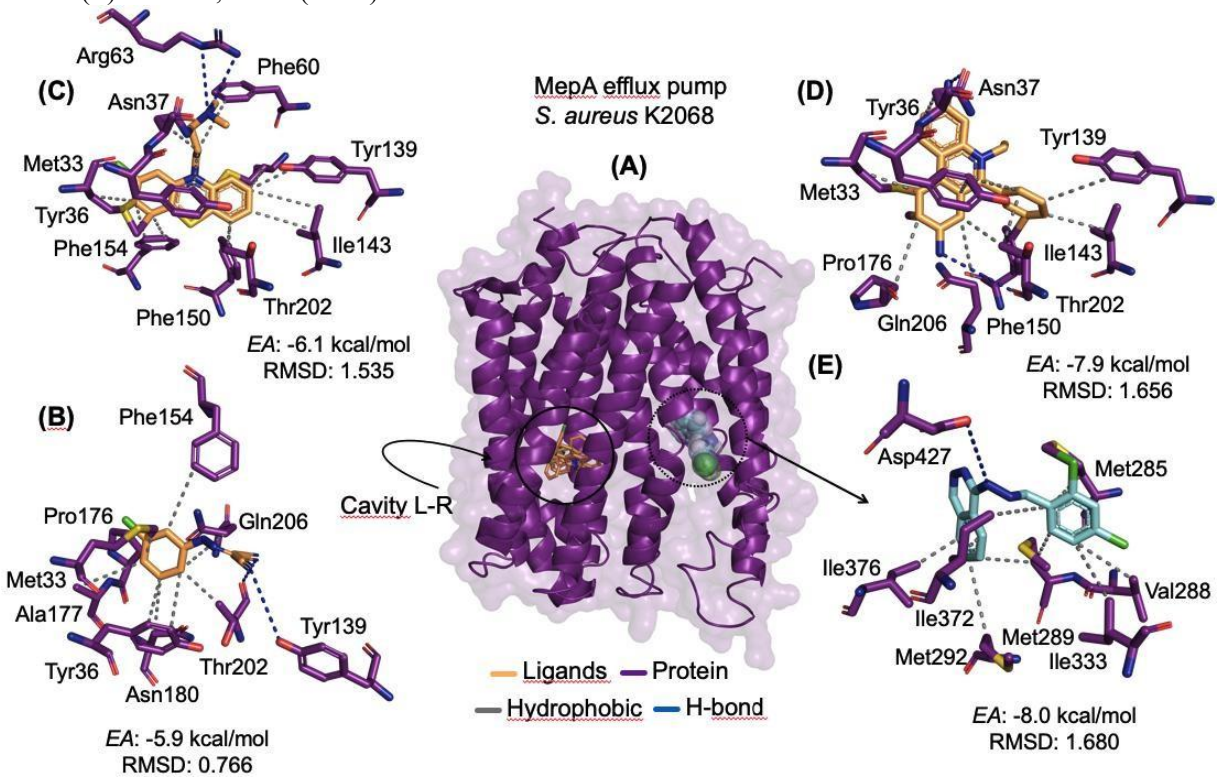
Tabela 1. Dados das interações ligante–receptor (L–R) no processo de redocking do agonista CPZ, dos

substratos clássicos CCCP e EtBr, e das simulações de docking molecular da HDZH2,4DCL, utilizando o receptor da bomba de efluxo MepA.

Compd	EA (kcal/mol)	RMSD (Å)	Inter. type	Residues / distances (Å)
CCCP	-5.9	0.766	Hidrofóbica	Met33 (2.33), Tyr36 (3.86), Tyr36 (4.06), Phe154 (4.41), Pro176 (3.43), Pro176 (4.61), Ala177 (4.63), Asn180 (4.60), Thr202 (3.54), Gln206 (4.99)
			ponte de hidrogênio	Tyr139 (4.25), Thr202 (3.61), Gln206 (4.30)
CPZ	-6.1	1.535	Hidrofóbica	Met33 (4.16), Tyr36 (4.34), Asn37 (4.33), Phe60 (4.97), Met63 (4.67), Tyr139 (4.82), Ile143 (4.90), Ile143 (4.59), Phe150 (2.16), Phe154 (4.23), Phe154 (3.84), Thr202 (4.06)
			ponte de hidrogênio	Arg283 (3.84), Arg283 (3.74)
EtBr	-7.9	1.656	Hidrofóbica	Met33 (3.64), Tyr36 (3.94), Tyr36 (3.93), Tyr36 (4.44), Asn37 (3.81), Tyr139 (4.54), Ile143 (4.05), Phe150 (2.00), Pro176 (4.33), Thr202 (3.43), Thr202 (3.57), Gln206 (4.73)
			ponte de hidrogênio	Asn37 (2.47), Thr202 (3.95)
HDZH2 ,4DCL	-8.0	1.680	Hidrofóbica	Met285 (4.37), Val288 (4.21), Met289 (4.61), Met289 (4.50), Met292 (4.62), Ile333 (4.39), Ile372 (4.84), Ile372 (3,26), Ile376 (2.9)
			ponte de hidrogênio	Asp427 (4.14)

Notes: CCCP: carbonyl-*m*-chlorophenyl hydrazone cyanide. CPZ: Chlorpromazine. EtBr: Ethidium bromide.

Fig. 2. (A) Visualização tridimensional do acoplamento dos ligantes na bomba de efluxo MepA, cepa *S. aureus* K2068, e visualização tridimensional das interações ligante–receptor entre os resíduos de aminoácidos (cor azul) da bomba de efluxo MepA com os ligantes (cor nude): (B) CCCP, (C) CPZ, (D) EtBr e (E) HDZH2,4DCL (ciano).



A análise das interações moleculares entre os ligantes e o receptor MepA revelou perfis de interação distintos (Fig. 2A). CCCP, CPZ e EtBr apresentaram predominantemente interações hidrofóbicas com resíduos como Met33, Tyr36, Phe154 e Thr202, além de interações por ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos Tyr139, Thr202 e Gln206 (Tabela 1). Esses padrões de interação são consistentes com aqueles relatados para outros ligantes conhecidos, sugerindo um modo de interação relativamente conservado, conforme ilustrado nas Fig. 2B–D.

Em contraste, a HDZH2,4DCL apresentou um perfil de interação distinto, caracterizado por interações hidrofóbicas pronunciadas com os resíduos Met285, Val288, Met289, Ile333, Ile372 e Ile376, indicando sua inserção em regiões hidrofóbicas do receptor (Tabela 1). Adicionalmente, a formação de uma única ligação de hidrogênio com o resíduo Asp427 (4,14 Å) sugere uma interação complementar, embora menos dependente de grupos funcionais polares (Fig. 2E).

Esses achados indicam que a HDZH2,4DCL pode se ligar a um sítio diferente em comparação com os demais ligantes testados, possivelmente ocupando uma região distinta da proteína MepA. Essa divergência nos padrões de interação pode ser indicativa de um efeito

sinérgico, uma vez que a HDZH2,4DCL aparenta interagir com o receptor de forma não competitiva em relação aos ligantes tradicionais, sugerindo um mecanismo de ação potencialmente único.

3.1.2. ***Docking*** **molecular contra NorA**

As simulações de *docking* para o receptor NorA mostraram diferenças notáveis nas energias de ligação e na estabilidade estrutural dos ligantes. Em termos de energia de ligação, EtBr apresentou a energia mais significativa (–7.8 kcal/mol), seguido de HDZH2,4DCL (–7.5 kcal/mol), CCCP (–6.0 kcal/mol) e CPZ (–5.1 kcal/mol), Table 2. Esses dados indicam que HDZH2,4DCL delimitou uma afinidade relevante pelo receptor, apenas ligeiramente inferior à de EtBr, mas substancialmente mais forte do que CPZ e CCCP, evidenciando seu potencial como um ligante competitivo.

No que se refere aos valores de RMSD, a HDZH2,4DCL apresentou o menor valor (1,788 Å) entre os ligantes testados, indicando uma conformação mais estável e melhor concordância com a estrutura experimental quando comparada ao CCCP (1,834 Å), ao EtBr (1,950 Å) e à CPZ (1,945 Å). Esse menor RMSD sugere que a HDZH2,4DCL se ajusta de forma eficaz ao sítio de ligação da NorA, sustentando um perfil de interação mais confiável e uma eficiência inibitória potencialmente maior, corroborando assim a robustez do protocolo de docking aplicado (Tabela 2).

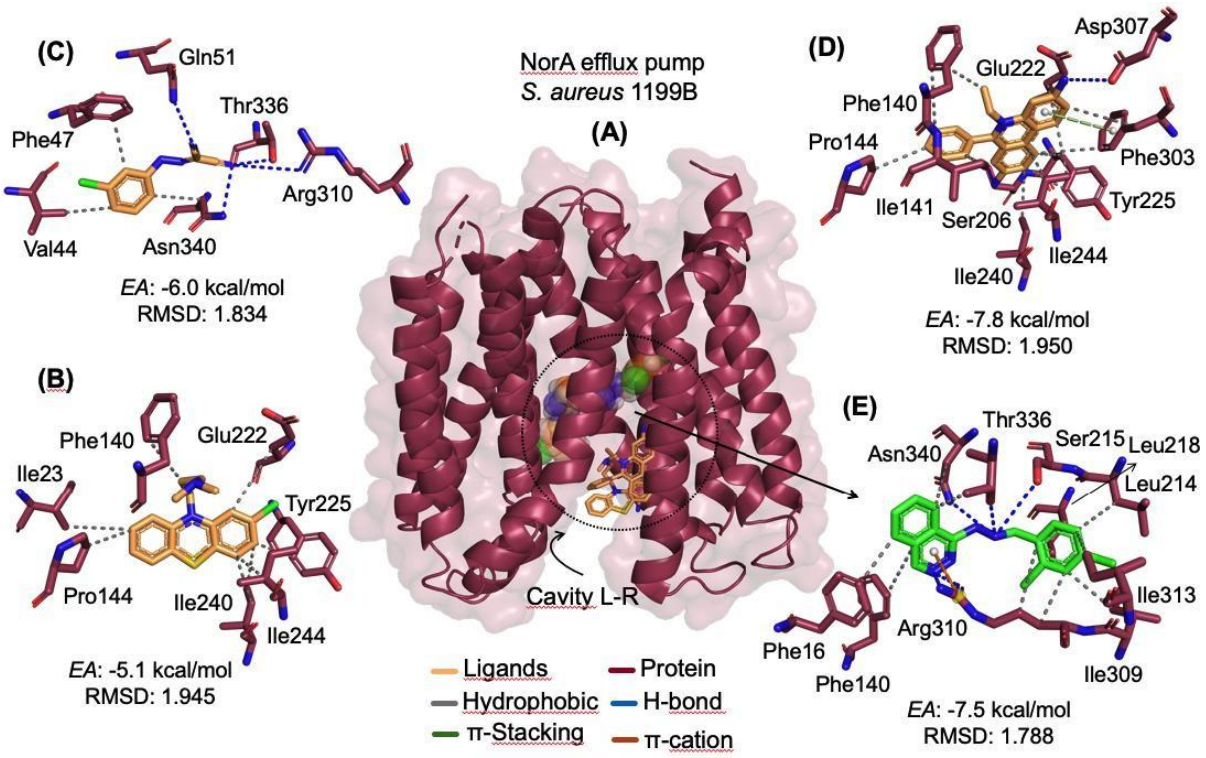
Tabela 2. Dados das interações ligante–receptor (L–R) no processo de redocking do agonista CPZ, dos substratos clássicos CCCP e EtBr, e das simulações de docking molecular da HDZH2,4DCL, utilizando o receptor da bomba de efluxo NorA.

Compd	**EA (kcal/mol)**	**RMSD (Å)**	**Inter. type**	**Residues / distances (Å)**
CCCP	-6.0	1.834	Hidrofóbica	Val44 (3.87), Phe47 (3.58), Asn340 (3.80)
			Ligação de hidrogênio	Gln51 (2.65), Arg310 (4.05), Thr336 (2.38), Asn340 (2.56)
CPZ	-5.1	1.945	Hidrofóbica	Ile23 (4.90), Phe140 (4.88), Pro144 (3.77), Glu222 (4.99), Tyr225 (3.65), Ile240 (3.73), Ile240 (4.29), Ile244 (3.89)

EtBr	-7.8	1.950	Hidrofóbica	Phe140 (4.92), Phe140 (3.53), Ile141 (4.08), Pro144 (3.82), Glu222 (3.90), Tyr225 (3.68), Tyr225 (3.96), Ile240 (4.22), Ile244 (3.52), Ile244 (3.70), Phe303 (4.50), Phe303 (4.70)
			Ligação de hidrogênio	Ser226 (3.70), Asp307 (3.50)
			π-stacking	Phe303 (4.74)
HDZH2,4DCL	-7.5	1.788	Hidrofóbica	Phe16 (3.40), Phe140 (4.79), Leu214 (3.74), Leu218 (3.48), Ile309 (3.75), Arg310 (3.71), Arg310 (4.95), Ile313 (3.64), Thr336 (3.70), Asn340 (4.03)
			Ligação de hidrogênio	Ser215 (3.17), Arg310 (2.21), Arg310 (4.10), Thr336 (2.00), Asn340 (3.30)
			π-Cation	Arg310 (4.08)

Notes: CCCP: carbonyl-*m*-chlorophenyl hydrazone cyanide. CPZ: Chlorpromazine. EtBr: Ethidium bromide

Fig. 3. (A) Visualização tridimensional do acoplamento dos ligantes na bomba de efluxo NorA, cepa *S. aureus* 1199B, e visualização tridimensional das interações ligante–receptor entre os resíduos de aminoácidos (cor azul) da bomba de efluxo NorA com os ligantes (cor nude): (**B**) CPZ, **(C)** CCCP, (**D**) EtBr e (**E**) HDZH2,4DCL (verde).



A análise comparativa das cavidades evidenciou que HDZH2,4DCL coincide a mesma cavidade de interação do CCCP, enquanto EtBr e CPZ ocupam em um sítio adjacente, com pouca ou nenhuma sobreposição de resíduos com CCCP/HDZH2,4DCL. Esse mapeamento corrobora a hipótese de que HDZH2,4DCL possa interagir com a bomba NorA de maneira semelhante à do desacoplador CCCP, com potencial de atuar como inibidor competitivo, Tabela 2. and Fig. 3. (A).

Nesse conexto, as interações revelaram diferenças significativas nos padrões entre os compostos testados (CCCP, CPZ, EtBr e HDZH2,4DCL) com a bomba de efluxo NorA. Dada a ocupação semelhante entre CCCP e HDZH2,4DCL, estes delimitaram interações com resíduos Arg310, Thr336 e Asn340. Essas interações incluem ligações de hidrogênio com Arg310 (distâncias de 4.05 Å para CCCP e 2.21/4.10 Å para HDZH2,4DCL), Thr336 (2.38 Å e 2.00 Å, respectivamente) e Asn340 (3.80 Å e 3.30 Å), além de interações hidrofóbicas nos mesmos resíduos. A presença da interação do tipo π-cátion com Arg310 na molécula HDZH2,4DCL representa um diferencial adicional que pode contribuir para a estabilidade do complexo, Tabela 2 e Fig. 3. (C and E).

Todavia, os compostos CPZ e EtBr apresentaram perfis de ligação distintos, localizando-se em uma região adjacente ao sítio ocupado por CCCP e HDZH2,4DCL. Estas interagiram majoritariamente através de interações hidrofóbicas, com destaque para resíduos como Phe140, Pro144, Glu222, Tyr225, Ile240 e Ile244. No caso do EtBr, além das

interações hidrofóbicas, observou-se a presença de ligações de hidrogênio com Ser226 e Asp307, bem como uma interação de π-stacking com Phe303 (4.74 Å), ausente nos demais compostos. CPZ, por sua vez, não apresentou interações do tipo hidrogênio ou π, sugerindo um padrão de interação mais superficial ou menos diversificado, Tabela 2 e Fig. 3. (B e D).

3.1.3. **Avaliação das propriedades físico-quimícas e semelhança com fármacos**

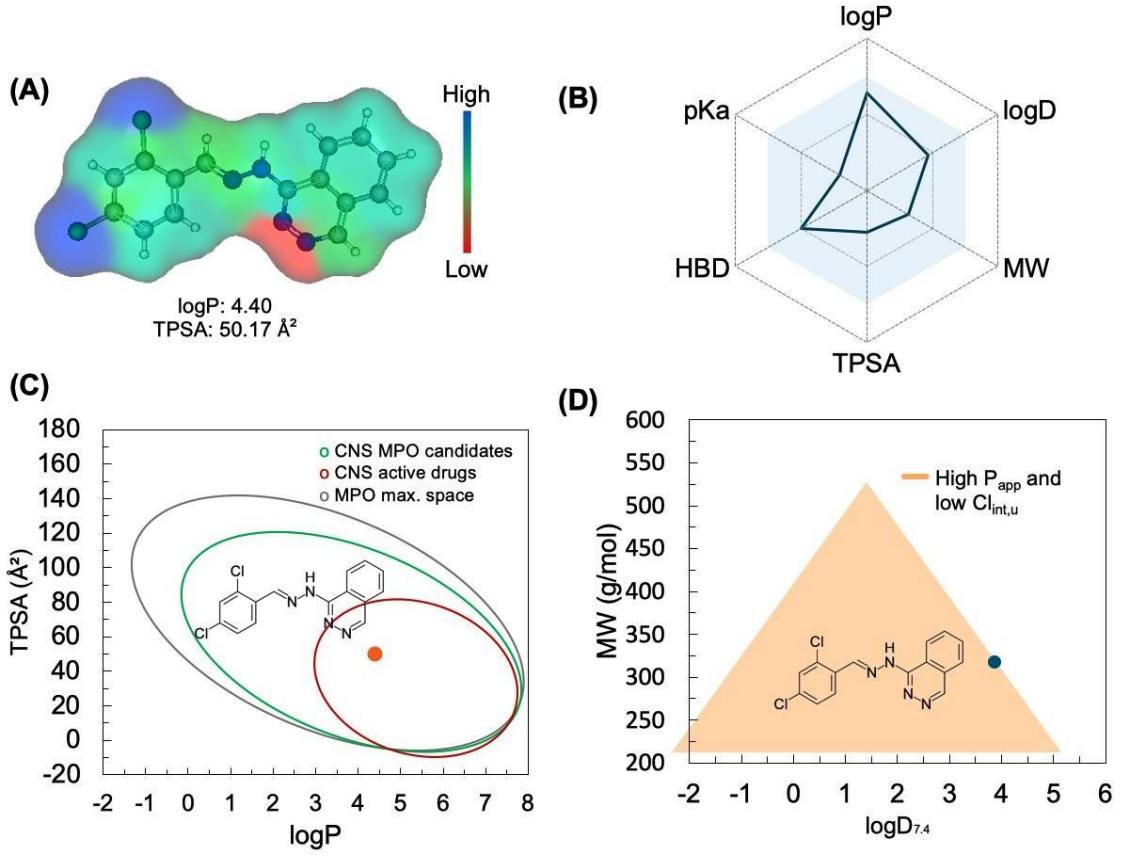
Os parâmetros físico-químicos e a similaridade com fármacos da molécula HDZH2,4DCL encontram-se sumarizados na Tabela 3 e representados graficamente no radar de biodisponibilidade da Figura 4(B). O peso molecular, de 37,17 g/mol, associado à área de superfície polar topológica (TPSA) de 50,17 Å², indica que a molécula apresenta um caráter compacto, com polaridade adequada para potencializar a permeabilidade celular. Tal perfil corrobora os valores de lipossolubilidade estimados pelos métodos de cálculo de partição, apresentando logP de 4,40 (ChemAxon) e 4,19 (método de Crippen), os quais estão em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela "regra dos cinco" de Lipinski e pela regra de Veber, que preveem adequada biodisponibilidade via administração oral. A variação da lipofilicidade em função do pH está detalhada no gráfico da Figura 4(A) e nos dados da Tabela 3. O valor de pKa igual a 3,34, relacionado à presença de um grupo amina em um dos anéis aromáticos e ao fragmento *orto-para* -Cl, evidencia a existência de um centro básico suscetível de aumentar a lipofilicidade sob condições fisiológicas. A proximidade entre os valores de logD e logP, ambos próximos de 4,4, sugere que a forma predominante da molécula é neutra, indicando um equilíbrio entre as propriedades lipofílicas e hidrofílicas compatível com a permeabilidade e absorção intestinal.

Tabela 3. Propriedades físico-químicas e perfil de drug-likeness da chalcona HDZH2O

Propriedade físico-química	**Valor**	**Fonte**
Massa molecular	317,17	CheAxon
logP	4,40	CheAxon
WlogP	4,19	Método de Wildman
Aceitadores de ligação de hidrogênio	3,0	CheAxon
Doadores de ligação de hidrogênio	1,0	CheAxon

Ligações rotacionáveis	3,0	CheAxon
Área de Superfície Polar Topológica (TPSA)	50,17	CheAxon
pKa (centro mais básico)	3,34	CheAxon
logD em pH 6,4	4,4	CheAxon
logD em pH 7,4	4,4	CheAxon
logS	–4,88	CheAxon
Regra dos cinco	Aceita	Método de Lipinski
Regra GSK	Aceita	Método de Veber
Escore CNS MPO (Pfizer)	4,05	CheAxon

Fig. 4. (A) Mapa de superfície do potencial de lipofilicidade molecular (MLP) da base conjugada à HDZH2,4DCL (logD 7,4); (B) radar de otimização multiparamétrica (MPO), que expressa o grau de desejabilidade em ADME. O espectro MPO foi analisado especificamente por meio do alinhamento de (C) TPSA e logP, para estimar o perfil de permeabilidade no sistema nervoso central (SNC); e (D) massa molecular (MM) e logD em pH 7,4, para estimar o perfil de absorção oral e a estabilidade metabólica.



Neste contexto, a molécula HDZH2,4DCL exibe características congruentes com compostos ativos no sistema nervoso central (SNC), indicando potencial para atravessar barreiras fisiológicas, assim como para apresentar perfis farmacocinéticos adequados, com risco reduzido de neurotoxicidade. A aplicação do índice de Otimização Multiparamétrica do SNC (CNS MPO), apresentado na Figura 4(C), resultou em uma pontuação de 4,05, evidenciando que a molécula satisfaz os critérios de similaridade com fármacos e detém atributos desejáveis, tais como elevadas permeabilidades passivas (P_{app}), baixa suscetibilidade ao efluxo mediado pela glicoproteína P (P_{-gp}) e depuração metabólica reduzida (Yee, 1997). Esses parâmetros posicionam a HDZH2,4DCL dentro do quadrante correspondente a compostos centrais ativos no conjunto de referência da Pfizer, conforme ilustrado na Figura 4(D), corroborando seu perfil promissor para aplicações no SNC.

3.1.4. **Propriedades farmacocinéticas**

As propriedades físico-químicas da HDZH2,4DCL estão diretamente correlacionadas à sua biodisponibilidade prevista, estimada em 55% de probabilidade de atingir pelo menos 10% de absorção oral em modelos animais de ratos, frequentemente empregados como preditores para humanos. Considerando que HDZH2,4DCL permaneça neutra em condições fisiológicas e atenda aos parâmetros da "regra dos cinco" de Lipinski (peso molecular ≤ 500, logP ≤ 5, número de aceitadores de ligações de hidrogênio ≤ 10, e doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5), esta apresenta baixa probabilidade de ser substrato da glicoproteína P (P_{-gp}), o que favorece sua elevada absorção intestinal, estimada em 93,56% (HIA) (Daina; Michielin & Zoete, 2017) conforme apresentado na Tabela 4.

A predição da ligação a proteínas plasmáticas (PPB = 94,36%) indica que a substância possui distribuição significativa entre o plasma e diversos tecidos, aumentando sua capacidade de alcançar o sistema nervoso central. Ademais, o valor calculado de permeabilidade aparente ($P_{app} = 1{,}96 \times 10^{-6}$ cm/s), obtido *in vitro* em células renais caninas MDCK via PreADMET, corrobora a previsão *in silico* de boa permeabilidade às membranas biológicas seletivas, conforme indicado pelo modelo de absorção e permabilidade da SwissADME, conforme exibido na Tabela 4.

Tabela 4. Farmacocinética avaliada por meio dos modelos ADME dos servidores web SwissADME e PreADMET

Perfil ADME	PreADMET	SwissADME
F > 10% (Biodisponibilidade)	Não reportado	0,55
Inibidor de P-gp	Sim	Não reportado
Substrato de P-gp	Não reportado	Não
HIA (Absorção intestinal humana)	93,56%	Alta
PPB (Ligação a proteínas plasmáticas)	94,36%	Não reportado
MDCK	$1,96 \times 10^{-6}$ cm/s (Papp)*	Não reportado
Substrato de CYP3A4	Não	Não reportado
Substrato de CYP2D6	Não	Não reportado
Inibidor de CYP3A4	Não	Não
Inibidor de CYP2D6	Não	Não
Inibidor de CYP2C9	Sim	Sim
Inibidor de CYP2C19	Sim	Sim

Notas: Modelo in vitro de permeabilidade passiva (Papp) da linhagem celular Madin-Darby Canine Kidney (MDCK).

A investigação do metabolismo da HDZH2,4DCL pelas isoformas do citocromo P450 (CYP450) revela baixa propensão ao composto a ser metabolizada pelas enzimas CYP3A4 e CYP2D6, indicando uma potencial redução na taxa de depuração e consequente prolongamento da meia-vida plasmática. Adicionalmente, a HDZH2,4DCL apresenta forte potencial para inibição das isoformas CYP2C19 e CYP2C9, o que pode resultar em elevação das concentrações plasmáticas de fármacos coadministrados que dependam dessas enzimas para sua biotransformação, conforme evidenciado na Tabela 4.

3.1.5. **Efeitos toxicológicos**

A avaliação da toxicidade da HDZH2,4DCL, enunciada através das plataformas PreADMET e ProTox-II, sugere que o fragmento de anilina apresenta instabilidade metabólica, o que pode contribuir para hepatotoxicidade induzida por fármacos (DILI). Essa toxicidade está particularmente associada à inibição das isoformas CYP2C9 e CYP2C19, que

são cruciais para o metabolismo de diversos fármacos e podem levar ao acúmulo de substâncias tóxicas no organismo. Adicionalmente, os fragmentos de phthalazine apresentam potencial para interações covalentes com o DNA, indicando risco mutagênico. No entanto, o grupo *orto-para* substituído no anel benzênico pode aumentar a seletividade para a atividade antimicrobiana. A previsão da dose letal (LD50 = 1000 mg/kg) aponta que efeitos adversos significativos podem ocorrer em doses elevadas, embora o risco tóxico seja considerado moderado sob condições de exposição fisiológica normal, como evidenciado na Tabela 5.

Tabela 5. Desfechos toxicológicos e dose letal oral (DL_{50}) segundo a predição consensual das ferramentas web PreADMET e ProTox-II

Propriedade toxicológica	PreADMET	ProTox-3.0
DILI (Lesão hepática induzida por fármacos)	Não reportado	+ (0,60)
Mutagenicidade AMES	Mutagênico	+ (0,60)
Inibição de hERG	Risco médio	Não reportado
DL_{50}	Não reportado	1000 mg/kg (classe 4)

3.2. Efeito antibacteriano direto e adjuvante sobre cepas portadoras de bomba

Apesar da diversidade de métodos utilizados em pesquisas sobre atividade antibacteriana, bem como das gradações utilizadas para afirmar a capacidade antibacteriana de um composto, valores de CIM menores que 10 μg/mL são preditivos para uma substância com elevado potencial antibiótico (Kuete, 2010). Produtos com valores de CIM maiores que 10 μg/mL podem ainda ser considerados quanto ao seu potencial antibacteriano, contanto que seus valores não sejam ≥ 1000 μg/mL, quando então uma substância é considerada inativa para uma determinada cepa (Tamokou; Mbaveng; Kuete, 2017).

Considerando a literatura referenciada, o composto hidrazônico HDZH2,4DCL não apresentou efeito antibacteriano intrínseco contra as cepas testadas, como demonstrado na Quadro 1. As concentrações inibitórias mínimas foram ≥ 1024 μg/mL, tanto para as cepas portadoras de bomba de efluxo, quanto para a cepa utilizada como controle negativo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima da Hidrazona e das substâncias padrão em cepas de *Staphylococcus aureus*.

Substância	S.a 1199B	S.a K2068	S.a ATCC 25923
HDZH2,4DCL	≥ 1024 μg/mL	≥ 1024 μg/mL	≥ 1024 μg/mL
Brometo de Etídio	71,84 μg/mL	80,63 μg/mL	5,04 μg/mL

Legend: S.a 1199B = Cepa de *Staphylococcus aureus* que expressa a bomba de efluxo NorA; S.a K2068 = Cepa de *Staphylococcus aureus* que expressa a bomba de efluxo MepA. S.a ATCC 25923 = Cepa de *Staphylococcus aureus* da American Type Culture Collection que não apresenta bomba de efluxo; Valores são descritos como a média de triplicata.

Uma série de complexos hidrazônicos foram testados quanto sua capacidade antibacteriana contra 7 cepas causadoras de cáries. No referido teste, a hidrazona que forneceu o esqueleto base dos compostos apresentou atividade moderada a baixa contra as cepas. Já seus complexos apresentaram atividades de moderada a alta. Dois compostos com ligantes de cloro foram utilizados. O composto hidrazônico com ligante de cloro associado a um núcleo de Zinco apresentou a menor CIM contra as cepas testadas, entre todos os complexos. Porém, o referido composto apresentou-se inativo contra uma das cepas testadas. O composto com ligante de cloro associado a um núcleo de cobre apresentou-se mais ativo contra 3 cepas em relação ao outro e ambos compostos clorados foram mais ativos contra a cepa *S. Mutans* (Santiago *et al*., 2020).

Hidrazona Fluorada associada a um núcleo de Zinco apresentou elevada eficiência contra cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, demostrando atividade bactericida através de um mecanismo de geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) com danos à membrana. Quando comparado com os outros compostos do teste, uma melhora na lipofilicidade devido a presença do halogênio foi apontada como causa da boa atividade do composto (Marchetti *et al*., 2022).

Uma série de 6 hidrazonas sintéticas foram testadas quanto suas atividades antibacterianas contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 11774 e *Escherichia coli* ATCC 10536, apresentando resultados de inibição de crescimento bacteriano dependente da concentração. Microscopia de Força Atômica revelou danos a estrutura celular e desorganização das colônias (Shah *et al*., 2022).

Compostos hidrazônicos com átomos de cloro na sua estrutura foram testados contra cepa de *S. pyogenes*, juntamente com hidrazonas não cloradas, apresentando atividades antibacterianas variadas. Um dos compostos com ligante de cloro apresentou a melhor no teste, enquanto outro composto com ligante de cloro apresentou o pior efeito antibacteriano

entre todos os compostos testados. Estes compostos variaram quanto ao núcleo metálico utilizado, com o paládio no melhor efeito e o cobre no pior (Aly; Fathalla, 2020).

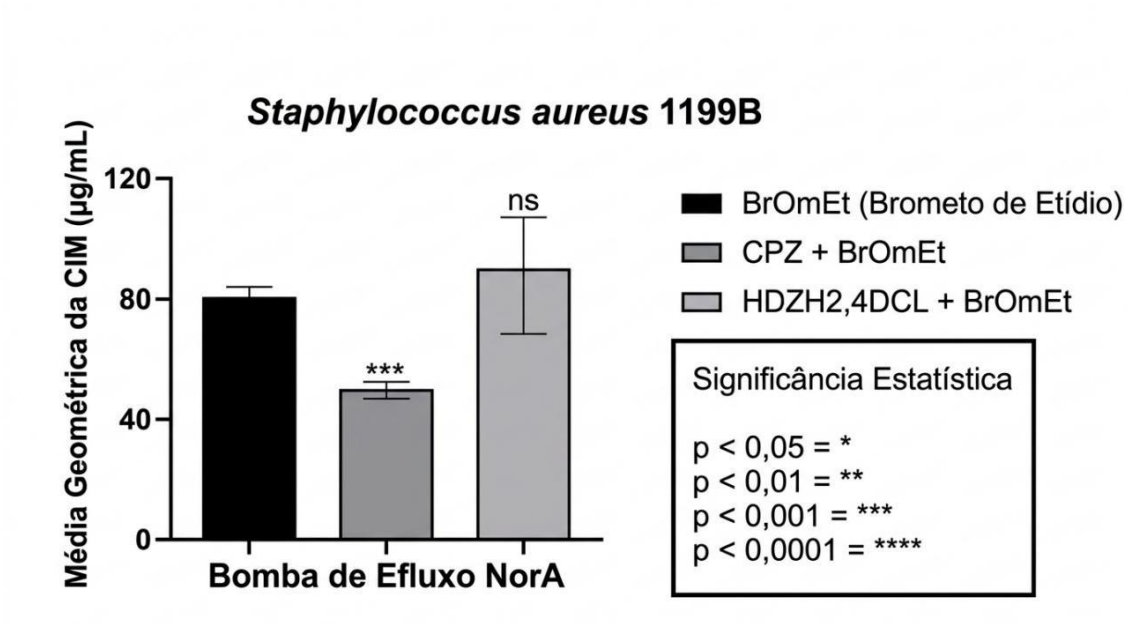
Características determinantes da fluidez dos compostos hidrazônicos através das membranas, como caráter hidrofóbico e valor do coeficiente de partição podem estar relacionadas com variações nas cadeias laterais dos compostos bem como de substituintes em seu núcleo, atuando diretamente na atividade antibacteriana dos mesmos (Dantas *et al*., 2018).

Diminuição da polaridade de moléculas de hidrazonas complexadas contribuiu com um aumento da lipofilicidade e facilidade para atravessar as membranas (Abdalla *et al*., 2023). A elevada eletronegatividade do substituinte cloro pode ter aumentado a polaridade da molécula causando uma diminuição do efeito antibacteriano.

Desta forma, podemos inferir que a estrutura do composto, bem como a morfologia específica de cada cepa bacteriana em análise influem na melhor ou pior atividade bacteriana de um candidato a fármaco. Assim, possíveis divergências encontradas entre os resultados da atividade antibacteriana direta da hidrazona HDZH2,4DCL com os efeitos antibacterianos discutidos em outros artigos podem ocorrer devido a essas diferenças.

Compostos que não possuem atividade antibacteriana intrínseca ainda podem contribuir para o controle de bactérias resistentes através de um efeito adjuvante. Ao serem associados com antibióticos de uso clínico, os compostos podem interagir com os mecanismos de resistência bacterianos, aumentando o potencial de ação dos antibióticos (Chawla *et al*., 2022). Neste sentido, os dados do efeito adjuvante da hidrazona HDZH2,4DCL, relacionado ao bloqueio do mecanismo de efluxo bacteriano, estão dispostos nas figuras 5 e 6.

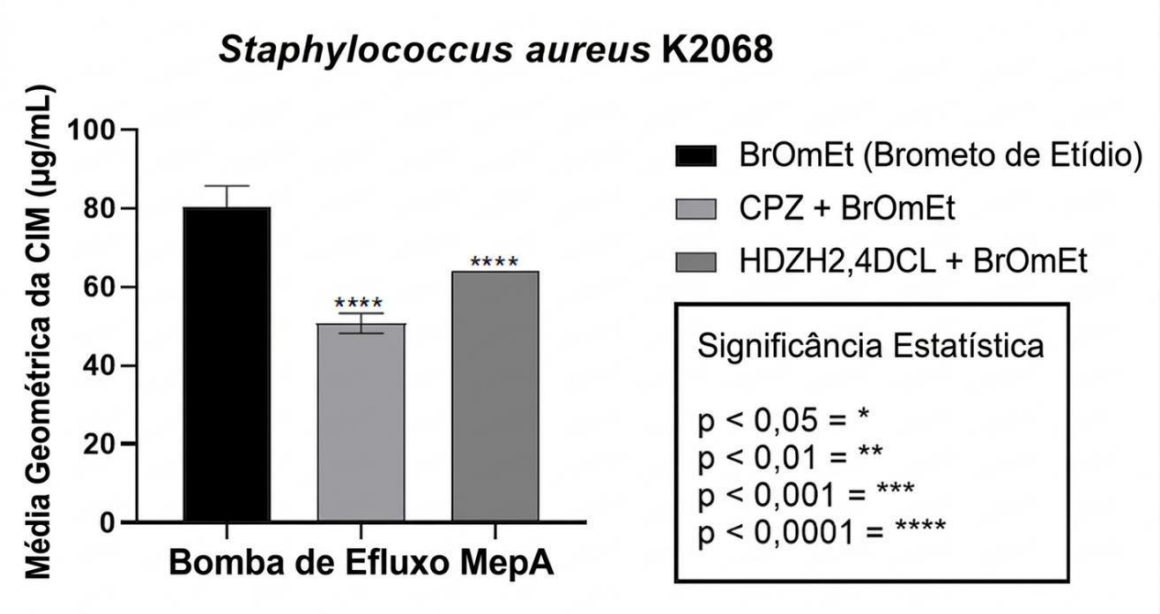
Fig 5: Efeito adjuvante da hidrazona HDZH2,4DCL sobre o mecanismo de bomba de efluxo da cepa *Staphylococcus aureus* 1199B, quando associada ao Brometo de Etídio.



Legenda: cepa *Staphylococcus aureus* 1199B é portadora do gene NorA. BrOmEt = Brometo de Etídio; CPZ = Clorpromazina; ns = não significativo. * = representa a significância estatística das substâncias testadas em relação ao controle, quando $p < 0,05$.

As cepas de *Staphylococcus aureus* 1199B e K2068 são bactérias reconhecidas na literatura como portadoras de bomba de efluxo, fenotipicamente diferenciadas de cepas não portadoras (Dashtbani-Roozbehani, Abolfazl; Brown, 2021). Elas apresentam modificações no DNA que promovem a superexpressão de genes codificadores de bombas de efluxo, gene NorA na cepa 1199B (Kaatz; Seo, 1995) e gene MepA na cepa K2068 (Kaatz; Mpudgal; Seo, 2002).

Fig 6: Efeito adjuvante da hidrazona HDZH2,4DCL sobre o mecanismo de bomba de efluxo da cepa *Staphylococcus aureus* K2068, quando associada ao Brometo de Etídio.



Legenda: cepa *Staphylococcus aureus* K2068 é portadora do gene MepA. BrOmEt = Brometo de Etídio; CPZ = Clorpromazina. * = representa a significância estatística das substâncias testadas em relação ao controle, quando $p < 0,05$

A presença de bombas de efluxo associadas às cepas 1199B e K2068 pode ser verificada ao comparar a CIM do Brometo de Etídio quando associado ao Inibidor Padrão de Bomba de Efluxo (IPBE) clorpromazina com a CIM do Brometo de Etídio sozinho. Para a cepa 1199B a CIM do Brometo decresceu de 71,84 para 45,25 µg/mL. Na cepa K2068, houve uma redução de 80,63 para 50,80 µg/mL. Quando analisamos a eficácia da hidrazona HDZH2,4DCL em inibir as bombas de efluxo, foi verificado que ela foi capaz de potencializar o efeito do Brometo apenas na cepa K2068.

O Brometo de Etídio é um substrato específico para diversas bombas de efluxo presentes em *Staphylococcus aureus*, cuja CIM está aumentada na ausência de um inibidor de bomba, tornando o seu uso para detecção de bombas de efluxo, um método fácil e rápido. Na ausência de um inibidor, concentrações acima de 25 µg/mL indicam um fenótipo portador de proteínas de efluxo (Patel *et al*., 2010).

Devido a falta de genes codificadores de bombas de efluxo associados à fluoroquinolonas, a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Nguyen *et al*., 2021) foi utilizada como controle da expressão fenotípica. As duas cepas portadoras de bomba de efluxo apresentaram CIMs acima do valor de referência, enquanto a cepa *S. aureus* ATCC 25923 apresentou CIM igual a 5,04 µg/mL (Quadro 1) demostrando a diferença fenotípica entre elas.

Em estudo sobre o desenvolvimento e inibição de bombas de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus* derivadas de *S. aureus* ATCC 25923, houve o aparecimento de bombas de efluxo em cepas cultivadas com concentrações subinibitórias de brometo de etídio e posterior inibição desse mecanismo de efluxo por 5 inibidores padrão, sendo a clorpromazina e a tioridazina os mais efetivos (Couto *et al*., 2008).

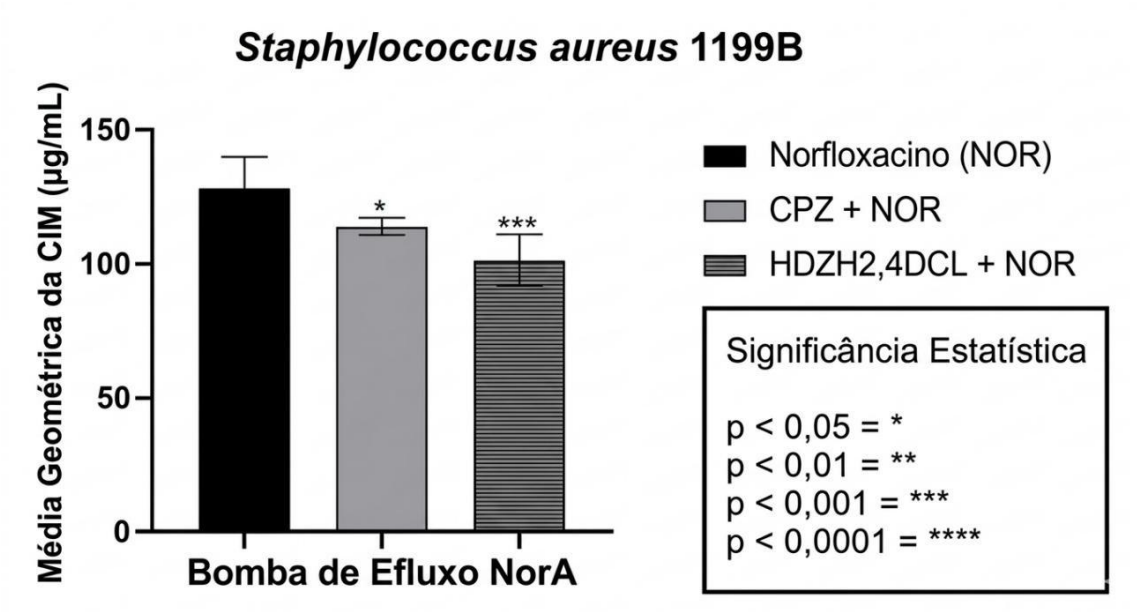
Uma séria de compostos derivados de N'-benzylidene-3,4-dimetoxibenzohydrazida foram testados contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas. Os compostos testados apresentaram diversos níveis de atividade antibacteriana sobre as cepas, além de apresentar atividade sobre bombas de fluxo da família MATE. Neste estudo, o composto com substituinte dicloro não conseguiu inibir a cepa de *Staphylococcus aureus* (Ezz Eldin *et al*., 2022).

O resultado do composto dicloro foi similar ao exibido pela HDZH2,4DCL, uma vez que também não apresentou atividade antibacteriana intrínseca, porém conseguiu inibir a bomba de efluxo MepA, da cepa K2068, que também é uma proteína de efluxo da família MATE.

Em estudo com cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis,* 8 derivados de hidrazonas foram testados quanto a capacidade de inibição de bombas de efluxo. O teste de acúmulo de brometo visualizado através de fluorescência indicou que 2 dos 8 compostos apresentaram atividades sobre proteínas de efluxo desta bactéria. Neste teste, as hidrazonas variaram quanto aos ligantes do anel da estrutura e quantidade de substituinte, sendo o esqueleto principal da molécula, o mesmo (Sampiron *et al*., 2019).

Na presença dos antibióticos específicos para cada cepa, houve a evidência de bombas de efluxo atuando sobre os antibióticos, tanto para a cepa que expressa NorA quanto para MepA, porém a HDZH2,4DCL foi capaz de potencializar apenas o efeito da norfloxacina para a cepa 1199B. Estes resultados estão descritos nas figura 7 e 8, respectivamente.

Fig 7: Efeito adjuvante da hidrazona HDZH2,4DCL sobre a cepa *Staphylococcus aureus* 1199B quando associada à Norfloxacina.



Legenda: cepa *Staphylococcus aureus* 1199B é portadora do gene NorA. NOR = Norfloxacina; CPZ = Clorpromazina. * = representa a significância estatística das substâncias testadas em relação ao controle, quando $p < 0,05$.

Em estudo com uma série de hidrazonas, 4 hidrazonas com ligantes de cloro foram capazes de potencializar o efeito do antibiótico norfloxacina, bem como do brometo de etídio, reduzindo as CIMs em até 16 vezes, em comparação com os controles. Essas 4 hidrazonas tiveram suas atividades atribuídas ao substituinte Cloro, que é um grupo removedor de elétron. Comparando as estruturas dos compostos, houve variação das CIMs combinadas tanto com norfloxacina quanto com brometo de etídio dependendo do número de ligantes e da posição em que eles se encontravam no anel aromático (Dantas *et al*., 2018).

Derivados de cromeno-hidrazona apresentaram atividade antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* através de ligação com o DNA bacteriano, bem como com o DNA do plasmídeo. O artigo também reforça a atuação das hidrazonas sobre o quórum sensing bacteriano, alterando a comunicação e expressão gênica (Ressler *et al*., 2023). Em outro estudo, quinazolinas incorporadas à hidrazonas apresentaram fortes interações com DNA-girase de cepas de *Escherichia coli*, com atividade comparada ao inibidor de referência (Mohi El-Deen; Nossier; Karam, 2022).

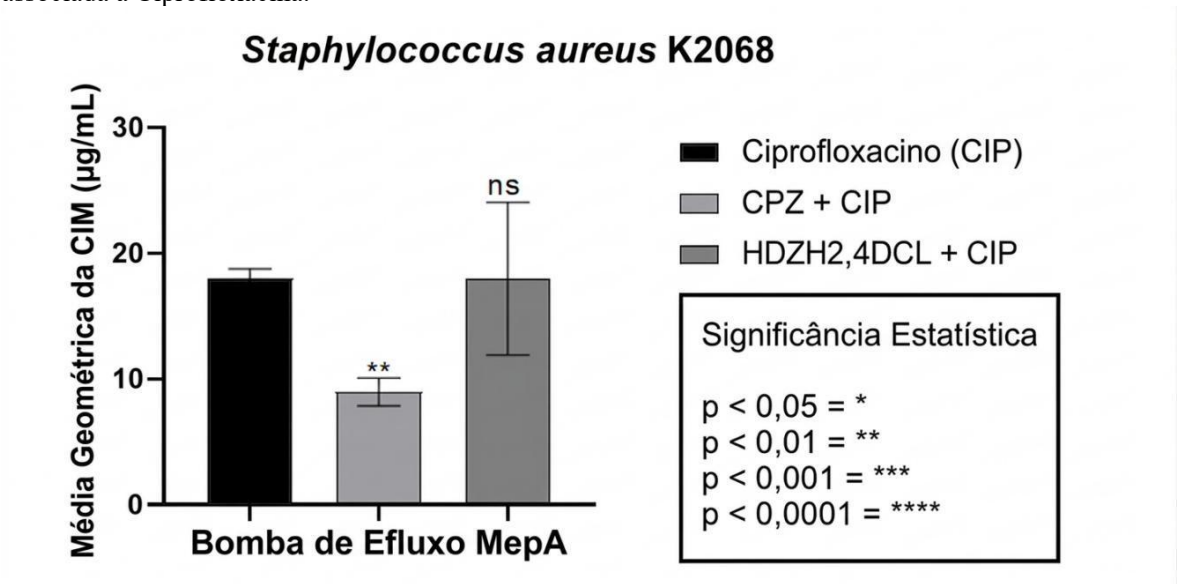
Interações com a enzima DNA-girase, bem como com outros alvos moleculares, foi encontrado em estudo com a hidralazina, molécula que forneceu a estrutura principal para a hidrazona HDZH2,4DCL. A hidralazina também se mostrou capaz de causar danos à membrana e fragmentação do DNA (Nascimento *et al*., 2024).

Essa interação com alvos no DNA bacteriano pode explicar a melhor interação antibiótica da hidrazona HDZH2,4DCL na cepa 1199B, interferindo possivelmente em outro mecanismo de resistência às fluoroquinolonas, uma vez que a cepa 1199B apresenta uma mutação na topoisomerase, adicionando a essa cepa um segundo mecanismo de resistência (Kaatz, G.W.; Seo, 1997), mutação essa, não encontrada na cepa K2068, quando comparadas à cepa sem bombas de efluxo (Kaatz; Mpudgal; Seo, 2002).

Derivados de 2-fenilquinolina foram testados quanto a atividade bloqueadora de bombas de efluxo NorA em cepa de *Staphylococcus aureus* 1199B. A melhor atividade de inibição da proteína de efluxo foi desempenhada por um composto com um substituinte de cloro na sua estrutura. Este composto também foi hábil na interação com a norfloxacina, através da inibição da referida bomba. Esta inibição foi relacionada a capacidade do composto em interferir na polarização da membrana e no gradiente de prótons, inibindo a força motriz da bomba de efluxo, como acontece com o cianeto de carbonila m-clorofenil hidrazona (inibidor de bomba de efluxo já reconhecido na literatura) (Felicetti *et al*., 2020).

Devido à interações de substituintes de cloro com proteínas de efluxo quando combinados Norfloxacina, não se pode excluir uma provável interação da HDZH2,4DCL com a bomba de efluxo NorA, mesmo havendo um segundo mecanismo de ação.

Fig 8: Efeito adjuvante da hidrazona HDZH2,4DCL sobre a cepa *Staphylococcus aureus* K2068 quando associada à Ciprofloxacina.



Legenda: cepa *Staphylococcus aureus* K2068 é portadora do gene MepA. CIP = Ciprofloxacina; CPZ = Clorpromazina. * = representa a significância estatística das substâncias testadas em relação ao controle, quando $p < 0,05$.

Composto hidralazina foi capaz de inibir bombas de efluxo NorA e MepA quando associada com o brometo de etídio, bem como potencializou o antibiótico ciprofloxacina contra a cepa K2068 (Bento *et al*., 2024). A presença do substituinte dicloro na HDZH2,4DCL interferiu diretamente no efeito combinado com o antibiótico ciprofloxacina, fazendo com que o efeito se tornasse indiferente.

Composto hidrazônico derivado da hidralazina potencializou o brometo de etídio, bem como o antibiótico norfloxacina contra a cepa *S. aureus* 1199B (Campos Lima *et al*., 2024). Este composto difere da HDZH2,4DCL pela presença de substituinte divergente do cloro no esqueleto principal. A perca do efeito sobre a bomba de efluxo NorA quando comparada com a hidralazina (Bento *et al*., 2024) e quando comparado com o composto hidrazonico citado, presume que os efeitos diversos encontrados são devidos à incorporação do cloro na molécula da HDZH2,4DCL.

Do mesmo modo, o composto testado por Campos Lima e colaboradores (2024) não conseguiu potencializar o efeito do brometo de etídio para a cepa K2068, porém potencializou o antibiótico cirpofloxacina, apresentando efeito contrário ao encontrado para a HDZH2,4DCL.

Este fato levanta o questionamento sobre a possibilidade de melhoria do efeito da hidrazona com modificações na quantidade de substituintes utilizados em sua estrutura. Também pode explicar o efeito diferente encontrado quando a HDZH2,4DCL interagiu com proteínas de efluxo diferentes.

4. **Conclusão**

As simulações de docking molecular revelaram que a HDZH2,4DCL apresenta a possibilidade de efeito sinérgico para SAK2068 (que expressa MepA) e seletividade contra as cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* SA1199B (que superexpressa NorA). Em consonância, as análises farmacocinéticas demonstraram alta semelhança a farmaco oral com atividade antimicrobiana, com volume de distribuição e possibilidade de permeabilidade as membranas microbiológicas atividade e com baixo risco de toxicidade por ingestão.

No teste de efeito antibacteriano intrínseco contra as cepas de *Staphylococcus aureus* portadoras de bomba de efluxo NorA e MepA, a hidrazona HDZH2,4DCL não apresentou efeito antibacteriano direto. Mas, ao interagir com a bomba de efluxo MepA das cepas *S. aureus* K2068, potencializando o efeito do Brometo de Etídio, e potencializou o antibiótico Norfloxacina contra *Staphylococcus aureus* 1199B, portadora da bomba de efluxo NorA.

Porém, a potenciação do antibiótico norfloxacina pela hidrazona, deve-se provavelmente por uma interação com um segundo mecanismo de resistência na cepa 1199B, que apresenta uma mutação na DNA girasse, quando comparada com a cepa controle. O substituinte Cloro interferiu diretamente nos efeitos adjuvantes encontrados neste teste. A posição do átomo, bem como a quantidade ligada no esqueleto principal da molécula pode interferir nos resultados sobre as bombas de efluxo.

5. **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Universidade Estadual do Ceará (UECE), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Ceará (FUNCAP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsas. Os autores também agradecem ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN). Hélcio Silva dos Santos agradece o apoio financeiro do CNPq–PQ (Processo nº 306008/2022-0) e da FUNCAP–UNIVERSAL (Processo nº UNI-0210 00337.01.00/23). Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Processo nº 88887.928835/2023-00, no âmbito do Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação – Apoio ao Desenvolvimento da Região Semiárida Brasileira, da Universidade Regional do Cariri.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD ALGAFFAR, S. O. *et al*. Development and validation of an in vitro resazurin-based susceptibility assay against Madurella mycetomatis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 10.1128/aac. 01338-20, 2021.

ABDALLA, Ehab M. *et al*. Synthesis, characterization, DNA binding, DFT, anticancer, antibacterial, and the effect of gamma irradiation of novel Co (II), Ag (I), and Cd (II) complexes with hydrazone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 101770, 2023.

Agarwal, R., & Smith, J. C. (2023). Speed vs accuracy: effect on ligand pose accuracy of varying box size and exhaustiveness in AutoDock vina. *Molecular Informatics*, 42(2), 2200188.

ALMATAR, Manaf *et al*. Efflux pump inhibitors: new updates. **Pharmacological Reports**, v. 73, p. 1-16, 2021.

ALY, S. A.; FATHALLA, Shaimaa Kamal. Preparation, characterization of some transition metal complexes of hydrazone derivatives and their antibacterial and antioxidant activities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 3735-3750, 2020.

AMARAL, Leonard *et al*. Phenothiazines, bacterial efflux pumps and targeting the macrophage for enhanced killing of intracellular XDRTB. **in vivo**, v. 24, n. 4, p. 409-424, 2010.

ARUNKUMAR, A *et al*. Syntheis and Characterization of Aroyl Hydrazones and its Anti Epileptic Property. **Scholar: National School of Leadership**, v. 9, n. 1.4, 2020.

Barbosa, C. R. D. S, Macedo, N. S., de Sousa Silveira, Z., Rocha, J. E., Freitas, T. S., Muniz, D. F., ... & da Cunha, F. A. B. (2023). Evaluation of the antibacterial and inhibitory activity of the MepA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by riparins I, II, III, and IV. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 748, 109782.

Brawley, D. N., Sauer, D. B., Li, J., Zheng, X., Koide, A., Jedhe, G. S., ... & Traaseth, N. J. (2022). Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from Staphylococcus aureus. *Nature Chemical Biology*, 18(7), 706-712.

BALGOTRA, Shilpi *et al*. Catalytic advances in direct functionalizations using arylated hydrazines as the building blocks. **Catalysis Reviews**, v. 62, n. 3, p. 406-479, 2020.

BAŞARAN *et al*. Synthesis, structural characterization, and biological evaluation of some hydrazone compounds as potential antioxidant agents. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 143-152, 2022.

BENTO, Ana Joyce De Morais *et al*. Quantum-chemical calculation, antibiotic potentiating activity, evaluation of efflux pump inhibition against S. aureus multi-resistant strains and molecular docking of the drugs isoniazid and hydralazine. **Journal of Molecular Structure**, p. 138474, 2024.

CAMPOS LIMA, Igor Kleber *et al*. Structural Characterization, Dft Calculations, Admet Studies, Antibiotic Potentiating Activity, Evaluation of Efflux Pump Inhibition of Hydrazone Derivative of the Drug Hydralazine.

ÇEVIK, Ulviye Acar *et al*. Multifunctional quinoxaline-hydrazone derivatives with acetylcholinesterase and monoamine oxidases inhibitory activities as potential agents against Alzheimer's disease. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, p. 1000-1011, 2020.

CHAWLA, Meenal *et al*. Antibiotic potentiators against multidrug-resistant bacteria: discovery, development, and clinical relevance. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 887251, 2022.

COUTINHO, Henrique DM *et al*. In vitro anti-staphylococcal activity of Hyptis martiusii Benth against methicillin-resistant Staphylococcus aureus: MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 670-675, 2008.

COUTO, Isabel *et al*. Efflux-mediated response of Staphylococcus aureus exposed to ethidium bromide. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 504-513, 2008.

DANTAS, Natalina *et al*. Aminoguanidine hydrazones (AGH's) as modulators of norfloxacin resistance in Staphylococcus aureus that overexpress NorA efflux pump. **Chemico-biological interactions**, v. 280, p. 8-14, 2018.

Da Silva, A. J. A., de Sousa Silveira, Z., Macêdo, N. S., dos Santos Barbosa, C. R., da Silva Sousa, Â. E., da Silva, T. F., ... & da Cunha, F. A. B. (2025). Evaluation of the antibacterial and inhibitory activity of the NorA efflux pump in Staphylococcus aureus by citronellol. *Biologia*, 1-15.

Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1), 42717.

De Araújo, A. C. J., Freitas, P. R., Araújo, I. M., de Oliveira Borges, J. A., Almeida, R. S., de Araújo-Neto, J. B., ... & Braga, M. F. B. M. (2025). Assessment of MepA inhibition potential using thiadiazine derivatives through fluorometry, docking, and qPCR. *Gene Reports*, 39, 102162.

De Oliveira, V. M., da Rocha, M. N., Roberto, C. H. A., Lucio, F. N. M., Marinho, M. M., Marinho, E. S., & de Morais, S. M. (2024). Insights of structure-based virtual screening and MPO-based SAR analysis of berberine-benzimidazole derivatives against Parkinson disease. *Journal of Molecular Structure*, 1302, 137453.

DASHTBANI-ROOZBEHANI, Abolfazl; BROWN, Melissa H. Efflux pump mediated antimicrobial resistance by staphylococci in health-related environments: challenges and the quest for inhibition. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1502, 2021.

DEVI, Jai; KUMAR, Binesh; TAXAK, Bharti. Recent advancements of organotin (IV) complexes derived from hydrazone and thiosemicarbazone ligands as potential anticancer agents. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 139, p. 109208, 2022.

Donchev, A. G., Ozrin, V. D., Subbotin, M. V., Tarasov, O. V., & Tarasov, V. I. (2005). A quantum mechanical polarizable force field for biomolecular interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(22), 7829-7834.

EBBENSGAARD, Anna Elisabeth; LØBNER-OLESEN, Anders; FRIMODT-MØLLER, Jakob. The role of efflux pumps in the transition from low-level to clinical antibiotic resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 855, 2020.

El-Hachem, N., Haibe-Kains, B., Khalil, A., Kobeissy, F. H., & Nemer, G. (2017). AutoDock and AutoDockTools for protein-ligand docking: beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) as a case study. In *Neuroproteomics: Methods and Protocols* (pp. 391-403). New York, NY: Springer New York.

EZZ ELDIN, Rogy R. *et al*. Ligand-based design and synthesis of N'-Benzylidene-3, 4-dimethoxybenzohydrazide derivatives as potential antimicrobial agents; evaluation by in vitro,

in vivo, and in silico approaches with SAR studies. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 1098-1119, 2022.

FELICETTI, Tommaso *et al*. C-2 phenyl replacements to obtain potent quinoline-based Staphylococcus aureus NorA inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 584-597, 2020.

FREIRES, M. S.; RODRIGUES JÚNIOR, O. M. Resistência bacteriana ao uso indiscriminado de azitromicina versus Covid-19: uma revisão integrativa. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 1, e31611125035, 2022.

FREITAS, Thiago S. *et al*. UPLC-QTOF-MS/MS analysis and antibacterial activity of the Manilkara zapota (L.) P. Royen against Escherichia coli and other MDR bacteria. **Cellular and Molecular Biology**, v. 67, n. 1, p. 116-124, 2021a.

FREITAS, Thiago S. *et al*. In vitro and in silico studies of chalcones derived from natural acetophenone inhibitors of NorA and MepA multidrug efflux pumps in Staphylococcus aureus. **Microbial Pathogenesis**, v. 161, p. 105286, 2021b.

GAURAV, Amit *et al*. Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. **Microbiology**, v. 169, n. 5, p. 001333, 2023.

Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. Front Cell Infect Microbiol. 2020 Mar 17;10:107..

HASSANZADEH, Sepideh *et al*. Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among Staphylococcus aureus; A systematic review. **Microbial pathogenesis**, v. 139, p. 103850, 2020.

HOWDEN, Benjamin P. *et al*. Staphylococcus aureus host interactions and adaptation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 380-395, 2023.

JAVADPOUR, M.M. *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

KAATZ, G.W.; SEO, S.M. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2650-2655, 1995.

KAATZ, G.W.; SEO, S.M. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 12, p. 2733-2737, 1997.

KAATZ, G.W.; MOUDGAL, V.V.; SEO, S.M. Identification and characterization of a novel efflux-related multidrug resistance phenotype in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 833-838, 2002.

KUETE, Victor. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. **Planta medica**, v. 76, n. 14, p. 1479-1491, 2010.

Lipinski, C. A. (2004). Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4), 337-341.

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Advanced drug delivery reviews, 64, 4-17.

MARCHETTI, Fabio *et al*. Role of hydrazone substituents in determining the nuclearity and antibacterial activity of Zn (II) complexes with pyrazolone-based hydrazones. **Dalton Transactions**, v. 51, n. 37, p. 14165-14181, 2022.

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, Beata *et al*. Molecular mechanisms of drug resistance in Staphylococcus aureus. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 15, p. 8088, 2022.

MOHI EL-DEEN, Eman M.; NOSSIER, Eman S.; KARAM, Eman A. New quinazolin-4 (3 H)-one derivatives incorporating hydrazone and pyrazole scaffolds as antimicrobial agents targeting DNA gyraze enzyme. **Scientia Pharmaceutica**, v. 90, n. 3, p. 52, 2022.

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(16), 2785-2791.

MURUGAIYAN, Jayaseelan *et al*. Progress in alternative strategies to combat antimicrobial resistance: Focus on antibiotics. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, p. 200, 2022.

NASCIMENTO, Francisca BSA. *et al*. Antimicrobial activity of hydralazine against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 91-106, 2024.

NGUYEN, Tiep K. *et al*. Activity of moxifloxacin against biofilms formed by clinical isolates of *Staphylococcus aureus* differing by their resistant or persister character to fluoroquinolones. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 785573, 2021.

OLIVEIRA, David MP *et al*. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 3, p. 10.1128/cmr. 00181-19, 2020.

PATEL, Diixa *et al*. Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in Staphylococcus aureus. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5070-5073, 2010.

Pundir, S., Martin, M. J., O'Donovan, C., & UniProt Consortium. (2016). UniProt tools. *Current Protocols in Bioinformatics*, 53(1), 1-29.

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

Radchenko, M., Symersky, J., Nie, R., & Lu, M. (2015). Structural basis for the blockade of MATE multidrug efflux pumps. *Nature communications*, 6(1), 7995.

Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A., & Söding, J. (2012). HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nature methods*, *9*(2), 173-175.

RESSLER, Andrew J. *et al*. Synthesis, anti-ferroptosis, anti-quorum sensing, antibacterial and DNA interaction studies of chromene-hydrazone derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 90, p. 117369, 2023.

Rezende-Júnior, L. M., Andrade, L. M. D. S., Leal, A. L. A. B., Mesquita, A. B. D. S., Santos, A. L. P. D. A. D., Neto, J. D. S. L., ... & Barreto, H. M. (2020). Chalcones isolated from Arrabidaea brachypoda flowers as inhibitors of NorA and MepA multidrug efflux pumps of *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 9(6), 351.

Rocha, M. N. D., Alves, D. R., Marinho, M. M., Morais, S. M. D., & Marinho, E. S. (2021). Virtual screening of citrus flavonoid tangeretin: A promising pharmacological tool for the treatment and prevention of Zika fever and COVID-19. *Journal of Computational Biophysics and Chemistry*, 20(03), 283-304.

Sarah S. Tang, Anucha Apisarnthanarak, Li Yang Hsu, Mechanisms of β-lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria, Advanced Drug Delivery Reviews, Volume 78, 2014, Pages 3-13, ISSN 0169-409X.

SAMPIRON, Eloísa G. *et al*. Hydrazone, benzohydrazones and isoniazid-acylhydrazones as potential antituberculosis agents. **Future Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 981-994, 2019.

SANTIAGO, Pedro HO *et al*. Copper (II) and zinc (II) complexes with Hydrazone: Synthesis, crystal structure, Hirshfeld surface and antibacterial activity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 508, p. 119632, 2020.

SEDAGHAT, Tahereh *et al*. New organotin (IV) complexes with a bis-acyl-hydrazone ligand: Synthesis, crystal structure and immobilization on magnetic mesoporous silica nanoparticles as a strategy in cancer therapy. **Journal of Molecular Structure**, v. 1275, p. 134622, 2023.

SHAH, Muhammad Abdullah *et al*. Synthesis and characterization of novel hydrazone derivatives of isonicotinic hydrazide and their evaluation for antibacterial and cytotoxic potential. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6770, 2022.

SHARMA, Hariom. Synthesis and Characterization of Biocidal Studies of Some Hydrazones and Their Metal Chelates. **Synthesis**, v. 3, n. 11, 2020.

SHARMA, A.; GUPTA, V.K.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **Indian J Med Res**. v. 149, n. 2, p. 129-145. 2019.

SHI, Tianzhu *et al*. Highly efficient and selective adsorption of heavy metal ions by hydrazide-modified sodium alginate. **Carbohydrate Polymers**, v. 276, p. 118797, 2022.

SIQUEIRA, Marina Micaele Rodrigues *et al*. Aminophenyl chalcones potentiating antibiotic activity and inhibiting bacterial efflux pump. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 158, p. 105695, 2021.

Shityakov, S., & Förster, C. (2014). In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 23-36.

Silva, J., da Rocha, M. N., de Oliveira, V. M., Roberto, C. H. A., Lúcio, F. N. M., Marinho, M. M., ... & Marinho, E. S. (2025). Allosteric modulation of laeviganoid-based clerodane diterpenes derivatives in muscarinic acetylcholine M1 receptor against tinnitus: a structure-based virtual screening approach. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 33.

Snyder, H. D., & Kucukkal, T. G. (2021). Computational chemistry activities with Avogadro and ORCA. *Journal of Chemical Education*, *98*(4), 1335-1341.

TAMOKOU, J. D. D.; MBAVENG, A. T.; KUETE, V. Antimicrobial activities of African medicinal spices and vegetables. In: **Medicinal spices and vegetables from Africa**. Academic press, 2017. p. 207-237.

THAKUR, Vaibhav; UNIYAL, Ankit; TIWARI, Vinod. A comprehensive review on pharmacology of efflux pumps and their inhibitors in antibiotic resistance. **European Journal of Pharmacology**, v. 903, p. 174151, 2021.

Thiago S. Freitas, Jayze C. Xavier, Raimundo L.S. Pereira, Janaína E. Rocha, Fábia F. Campina, José B. de Araújo Neto, Maria M.C. Silva, Cristina R.S. Barbosa, Emmanuel S. Marinho, Carlos E.S. Nogueira, Hélcio S. dos Santos, Henrique D.M. Coutinho, Alexandre M.R. Teixeira, In vitro and in silico studies of chalcones derived from natural acetophenone inhibitors of NorA and MepA multidrug efflux pumps in Staphylococcus aureus, Microbial Pathogenesis, Volume 161, Part B, 2021, 105286, ISSN 0882-4010.

TIAN, Jia *et al*. Discovery of novel α-aminophosphonates with hydrazone as potential antiviral agents combined with active fragment and molecular docking. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, p. 911453, 2022.

Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, *31*(2), 455-461.

Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, Zidan BRM, Mitra S, Emran TB, Dhama K, Ripon MKH, Gajdács M, Sahibzada MUK, Hossain MJ, Koirala N. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. J Infect Public Health. 2021 Dec;14(12):1750-1766. doi: 10.1016/j.jiph.2021.10.020. Epub 2021 Oct 23. PMID: 34756812.

VAROTO, C.; EVANGELISTA, E.A.; SANTOS, JS. Perfil bacteriológico em secreções traqueais de pacientes internados em unidade de terapia intensiva: uma revisão narrativa. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 12, pág. e108121244038, 2023.

Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615-2623.

Wager, T. T., Hou, X., Verhoest, P. R., & Villalobos, A. (2010). Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties. *ACS chemical neuroscience*, 1(6), 435-449.

Warraich, A. A., Mohammed, A. U. R., Gibson, H., Hussain, M., & Rahman, A. S. (2021). Acidic amino acids as counterions of ciprofloxacin: Effect on growth and pigment production in Staphylococcus aureus NCTC 8325 and Pseudomonas aeruginosa PAO1. *Plos one*, *16*(4), e0250705.

Wiley, E. A., MacDonald, M., Lambropoulos, A., Harriman, D. J., & Deslongchamps, G. (2006). LGA-dock/EM-dock exploring Lamarckian genetic algorithms and energy-based local search for ligand receptor docking. *Canadian Journal of Chemistry*, 84(3), 384-391.

Yee, S. (1997). *In vitro* permeability across $_{Caco\text{-}2}$ cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man—fact or myth. *Pharmaceutical Research*, 14(6), 763-766.

Yusuf, D., Davis, A. M., Kleywegt, G. J., & Schmitt, S. (2008). An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 48(7), 1411-1422.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÕES GERAIS

Não há discordância quando se diz que os antibióticos tornaram-se aliados indispensáveis desde sua origem. Com isso, surgiu uma fácil acessibilidade na obtenção desses medicamentos, fazendo com que parte da população os utilizam para se auto medicar de enfermidades que os acometem no dia a dia, consequentemente fazendo com que algumas bactérias oportunistas como *Staphylococcus aures* acabassem desenvolvendo resistência contra fármacos que antes surtiam efeito. Essa resistência muitas vezes acontece através de mecanismos intrínsecos ou adquiridos, que podem agir na forma de modificação enzimática, mutações, formação de biofilme, modificações na membrana e bomba de efluxo, responsável por expulsar o medicamento do interior da célula bacteriana. Por isso se vê uma necessidade de continuar explorando a diversidade funcional e estrutural das bombas de efluxo,

intensificando as exigências em compreender profundamente para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes utilizando substâncias como os derivados de hidralazina.

No estudo, o composto hidrazônico HDZH2,4DCL não apresentou efeito antibacteriano intrínseco contra as cepas de *staphylococcus aureus* 1199B portadora da bomba de efluxo NorA e K2068 portadora da bomba de efluxo MepA testadas, ou seja, o composto não apresenta capacidade natural de inibir ou eliminar bactérias, sem a necessidade da adição de agentes antimicobrianos externos. A elevada eletronegatividade do substituente cloro pode ter aumentado a polaridade da molécula causando uma diminuição do efeito antibacteriano. Desta forma, podemos inferir que a estrutura do composto, bem como a morfologia específica de cada cepa bacteriana em análise influem na melhor ou pior atividade bacteriana de um candidato a fármaco.

Apesar do compostos não apresentar atividade antibacteriana intrínseca ainda pôde contribuir para o controle de bactérias resistentes através de um efeito adjuvante, sendo associado com antibióticos de uso clínico. Na cepa 1199B, o derivado de hidralazina HDZH2,4DCL em conjunto com Brometo de etídio, não apresentou resultado significativo. Já nas cepas K2068, quando analisado a eficácia da hidrazona HDZH2,4DCL em inibir as bombas de efluxo, foi possível observar que ela foi capaz de potencializar o efeito do Brometo apenas na cepa K2068.

Na presença dos antibióticos específicos para cada cepa, norfloxacina em 1199B, e Ciprofloxacina em K2068, houve a evidência de bombas de efluxo atuando sobre os antibióticos, tanto para a cepa que expressa NorA quanto para MepA, porém a HDZH2,4DCL foi capaz de potencializar apenas o efeito da norfloxacina para a cepa 1199B. Já a Ciprofloxacina em K2068, não apresentou resultados significativos. Devido à interações de substituintes de cloro com proteínas de efluxo quando combinados Norfloxacina, não podemos excluir uma provável interação da HDZH2,4DCL com a bomba de efluxo NorA, mesmo havendo um segundo mecanismo de ação.

O estudo em questão contribuiu para formação pessoal e perspetiva em pesquisa, ademais de todo aprendizado e conhecimento adquirido durante a formação. Além da contribuição voltada para área da saúde ao experimentar um novo adjuvante de medicamento para o combate da resistência bacteriana.

5.2 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS

Este trabalho abre possibilidade para estudos posteriores, já que levanta o questionamento sobre a possibilidade de melhoria do efeito da hidrazona com modificações na quantidade de substituintes utilizados em sua estrutura, pois, o substituinte Cloro interferiu

diretamente nos efeitos adjuvantes encontrados neste teste. A posição do átomo de cloro, bem como a quantidade ligada no esqueleto principal da molécula pode interferir nos resultados sobre as bombas de efluxo.

Objetivando avaliar essa combinação promissora de fármacos com atividade potencializadora em estudos in vivo utilizando zebrafish *(Danio rerio)* para confirmar o efeito potencializador observado entre a hidralazina e a Norfloxacina contra *S. aureus* 1199B, portadoras das bombas NorA, para entender se essa interação entre a combinação do medicamento e a substância com a bomba de efluxo aconteceu por um segundo mecanismo de resistência bacteriana.

Com base nos estudos de docagem molecular, realizar pesquisas para a otimização molecular, modificando quimicamente a hidralazina para aumentar sua afinidade e especificidade pelos alvos das bombas NorA e MepA. Também se abre a possibilidade de desenvolver novos compostos adjuvantes baseados nas interações moleculares identificadas neste estudo, explorando características estruturais que maximizem a inibição das bombas de efluxo.

6 REFERÊNCIAS

ARANCIBIA, J. M. Estratégias de uso de antimicrobianos em pacientes graves. **Revista Médica Clínica Las Condes**, v. 30, n. 2, p. 151 – 159, 2019.

ARRUDA, I. E. *et al.* Preparação de hidrazona e n-acilidrazona usando fármacos comerciais como reagentes: aulas práticas de síntese de compostos bioativos. **Quim. Nova**, v. 43, n. 5, p. 642-648, 2018.

Angelova V., Karabeliov V., Andreeva-Gateva PA, Tchekalarova J. Desenvolvimentos recentes de derivados de hidrazida/hidrazona e seus análogos como agentes anticonvulsivantes em modelos animais. Drug Dev. Res. 2016;77:379–392.

Baran A, Kwiatkowska A, Potocki L. Antibiotics and Bacterial Resistance-A Short Story of an Endless Arms Race. Int J Mol Sci. 2023 Mar 17;24(6):5777.

BRITO, G. B. TREVISAN, M. O uso indevido de antibióticos e o eminente risco de resistência bacteriana. **Revista Artigos. Com**, v.*30*, e7902. 2021. Disponível em: https://acervomais.com.br/index.php/artigos/article/view/7902. Acesso em: 28 maio 2024.

Casanova, L. M.; Costa, S. S.. Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. *Rev. Virtual Quim.* |Vol 9| |No. 2| |575-595|.

CHANDAL N, *et a*l. 2023.Efflux pump inhibitory potential of indole derivatives as an arsenal against norA over-expressing Staphylococcus aureus . Microbiol Spectr11:e04876-22.

CHEN, H. *et al*. Explorando o papel de *Staphylococcus aureus* em doenças inflamatórias. **Toxinas**, v. 14, p. 464. 2022.

Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. Virulence. 2021 Dec;12(1):547-569.

COSTA, S. S. *et al.* Genetic Diversity of norA, Coding for a Main Efflux Pump of *Staphylococcus aureus*. **Sec. Evolutionary and Genomic Microbiology**, v 9, 2019.

COUTINHO, H.D.M. *et al*. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli by Mentha arvensis L.* and Chlorpromazine.**Chemotherapy**. V. 54, n. 4, p. 328-330, 2008.

Dadgostar P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. Infect Drug Resist. 2019 Dec 20;12:3903-3910.

DE OLIVEIRA, D. M. P. *et al.* Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clin Microbiol Ver, v.** 13, n. 33, :e00181-19. 2020.

FREIRES, M. S.; RODRIGUES JÚNIOR, O. M. Resistência bacteriana ao uso indiscriminado de azitromicina versus Covid-19: uma revisão integrativa. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 1, e31611125035, 2022.

GERONIKAKI, Athina et al. Antibacterial activity of griseofulvin analogues as an example of drug repurposing. International journal of antimicrobial agents, v. 55, n. 3, p. 105884, 2020.

GUIMARÃES, D. G. *et al*. Investigação do Potencial Biológico de Hidrazonas Obtidas Sinteticamente na Última Década (2006-2016): Uma Revisão Sistemática. **Rev. Virtual Quim**, v. 9, n. 6, p. 2551-2592. 2017.

Herman LL, Bruss ZS, Tivakaran VS. Hydralazine. 2023 Mar 28. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan–. PMID: 29262006.

HERMAN, L.L., BRUSS, Z.S., TIVAKARAN, V.S. Hydralazine. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024–. PMID: 29262006.

HOWDEN, B. P. *et al.* Interações e adaptação do hospedeiro *Staphylococcus aureus* . **Nat Rev Microbiol***,* v. 21, p. 380–395. 2023.

Huang H, Wan P, Luo X, Lu Y, Li X, Xiong W, Zeng Z. Tigecycline Resistance-Associated Mutations in the MepA Efflux Pump in Staphylococcus aureus. Microbiol Spectr. 2023 Aug 17;11(4):e0063423. doi: 10.1128/spectrum.00634-23. Epub 2023 Jul 11. PMID: 37432114; PMCID: PMC10434020.
HUANG, Lulu et al. Bacterial multidrug efflux pumps at the frontline of antimicrobial resistance: an overview. Antibiotics, v. 11, n. 4, p. 520, 2022.

IKA IRIANTI, M. *et al.* Prenylated isoflavonoids from Fabaceae against the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*. **Sci Rep**. V. 18, n. 13, p. 22548. 2023.
KAATZ, G.W.; MCALEESE, F.; SEO, S.M. Multidrug resistance in Staphylococcus aureus due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 5, p. 1857-64. 2005.
Kabra R, Chauhan N, Kumar A, Ingale P, Singh S. Efflux pumps and antimicrobial resistance: Paradoxical components in systems genomics. Prog Biophys Mol Biol. 2019 Jan;141:15-24. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.07.008. Epub 2018 Jul 18. PMID: 30031023; PMCID: PMC7173168.
KOLTAI, Tomas. Fundamentals for the repurposing of hydralazine as an anti-neoplastic drug. World Journal of Advanced Pharmaceutical and Life Sciences, v. 5, n. 1, p. 012 023, 2023.
MARTIN, Ana Luiza de Aguiar Rocha. Efeito in vitro e in silico de derivados cumarínicos na inibição da função da bomba de efluxo MepA e NorA em Staphylococcus aureus. 2023. 99 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza/CE, 2023.
MORRIS, S.; CERCEO, E. Trends, Epidemiology, and Management of Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospitalized Setting. Antibiotics, v. 9, n. 4, p. 196, 2020.
MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda, 2022.
Nara Juliana Santos Araújo, Ana Raquel Pereira da Silva, Maria do Socorro Costa, Camila Aparecida Pereira Silva, Thiago Sampaio de Freitas, Erlanio Oliveira de Sousa, José Maria Barbosa Filho, Yedda Maria Lobo Soares de Matos, Henrique Douglas Melo Coutinho, Jacqueline Cosmo Andrade-Pinheiro, Evaluation of the antibacterial activity of hecogenin acetate and itsinhibitory potential of NorA and MepA efflux pumps from Staphylococcus aureus, Microbial Pathogenesis, Volume 174, 2023, 105925, ISSN 0882-4010.
NASCIMENTO, F. B. *et al*. Synergistic effect of hydralazine associated with triazoles on *Candida* spp. in planktonic cells. Future Microbiol, v. 18, p. 661-672. 2023.
NASCIMENTO, S. A. *et al.* Antimicrobial activity of hydralazine against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiol**, v. 19, p. 91-106. 2024.
NERY, K. *et al*. Ação antimicrobiana e moduladora da resistência de derivados da hidrazida em cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*: uma revisão integrativa. **Peer Review**, v. 5, n. 17, p. 499–514. 2023.
Nicolaou, K., Rigol, S. Uma breve história dos antibióticos e avanços selecionados em sua síntese. *J Antibiot* **71** , 153–184 (2018).
OLIVEIRA - TINTINO, C. D.M. Avaliação da atividade antibacteriana e inibidora de bombas de efluxo em cepas de *Staphylococcus* aureus por 1,8-Naftiridinas sulfonamídicas: abordagem *in Vitro e in Silico*. 2021. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.
OLIVEIRA-TINTINO, C.D.M. *et al*. NorA, Tet(K), MepA, and MsrA Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*, their Inhibitors and 1,8-Naphthyridine Sulfonamides. **Curr Pharm Des**, v. 29, n. 5, p. 323-355. 2023.

PEREIRA, G. J. V. *et al.* Aumento da resistência bacteriana aos antibióticos durante a pandemia de COVID-19: uma revisão narrativa. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 13, n. 6, pág. e7313646040, 2024.
RASHEED, Narin A.; HUSSEIN, Nawfal R. Staphylococcus aureus: an overview of discovery, characteristics, epidemiology, virulence factors and antimicrobial sensitivity. European Journal of Molecular & Clinical Medicine, v. 8, n. 3, p. 1160-1183, 2021.
Popiołek Ł. Updated Information on Antimicrobial Activity of Hydrazide-Hydrazones. Int J Mol Sci. 2021 Aug 30;22(17):9389. doi: 10.3390/ijms22179389. PMID: 34502297; PMCID: PMC8430688.
Popiołek Ł. Hidrazida-hidrazonas como potenciais agentes antimicrobianos: Visão geral da literatura desde 2010. Med. Chem. Res. 2017;26:287–301. doi: 10.1007/s00044-016-1756-y.
Popiołek Ł., Biernasiuk A., Malm A. Design, síntese e atividade antimicrobiana in vitro de novos híbridos de furano/tiofeno-1,3-benzotiazin-4-ona. J. Heterocycl. Chem. 2016;53:479–486. doi: 10.1002/jhet.2429.
Popiołek Ł., Piątkowska-Chmiel I., Gawrońska-Grzywacz M., Biernasiuk A., Izdebska M., Herbet M., Sysa M., Malm A., Dudka J., Wujec M. Novas hidrazidas-hidrazonas e 1,3-tiazolidin-4-onas com Porção 3-hidroxi-2-naftóica: Síntese, estudos in vitro e in vivo. Biomédica. Farmacoter. 2018;103:1337–1347. doi: 10.1016/j.biopha.2018.04.163.
Rollas S., Küçükgüzel Ş.G. Atividades biológicas de derivados de hidrazona. Molecules. 2007;12:1910–1939.
Sarah S. Tang, Anucha Apisarnthanarak, Li Yang Hsu, Mechanisms of β-lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria, Advanced Drug Delivery Reviews, Volume 78, 2014, Pages 3-13, ISSN 0169-409X.
SCHINDLER, B.D. *et al.* Mutagênese e modelagem para prever características estruturais e funcionais da bomba de efluxo multidrogas **Staphylococcus aureus** MepA. **J Bacteriol**, v. 195, 2013.
SEO, Y.; KIM, M.; JIM, T. J. Eficácia aprimorada de ciprofloxacina e tobramicina contra *Staphylococcus aureus* quando combinadas com tubérculo de Corydalis e berberina por meio da inibição da bomba de efluxo. Antibióticos*,* v.13 , n. 5, 2024.
SHARMA, A.; GUPTA, V.K.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **Indian J Med Res**. v. 149, n. 2, p. 129-145. 2019.
Spengler G, Kincses A, Gajdács M, Amaral L. New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. Molecules. 2017 Mar 15;22(3):468.
S.R. Tintino, C.D. OliveiraTintino, F.F. Campina, P.W. Limaverde, P.S. Pereira, J.P. Siqueira -Junior, H.D. Coutinho, L.J. Quintans-Júnior, T.G. da Silva, T.C. Leal-Balbino Vitamin K enhances the effect of antibiotics inhibiting the efflux pumps of Staphylococcus aureus strains Med. Chem. Res., 27 (2018), pp. 261-267.
Lafi Z, Alshaer W, Gharaibeh L, Alqudah DA, AlQuaissi B, Bashaireh B, Ibrahim AA. Synergistic combination of doxorubicin with hydralazine, and disulfiram against MCF-7 breast cancer cell line. PLoS One. 2023 Sep 28;18(9):e0291981.
LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012–. Hydralazine. 2018 Mar 24.
Tanvir Mahtab Uddin, Arka Jyoti Chakraborty, Ameer Khusro, BM Redwan Matin Zidan, Saikat Mitra, Talha Bin Emran, Kuldeep Dhama, Md. Kamal Hossain Ripon, Mário Gajdács, Muhammad Umar Khayam Sahibzada, Md. Jamal Hossain, Niranjan Koirala, Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects,

Journal of Infection and Public Health, Volume 14, Issue 12, 2021, Pages 1750-1766, ISSN 1876-0341.
Thiago S. Freitas, Jayze C. Xavier, Raimundo L.S. Pereira, Janaína E. Rocha, Fábia F. Campina, José B. de Araújo Neto, Maria M.C. Silva, Cristina R.S. Barbosa, Emmanuel S. Marinho, Carlos E.S. Nogueira, Hélcio S. dos Santos, Henrique D.M. Coutinho, Alexandre M.R. Teixeira, In vitro and in silico studies of chalcones derived from natural acetophenone inhibitors of NorA and MepA multidrug efflux pumps in Staphylococcus aureus, Microbial Pathogenesis, Volume 161, Part B, 2021, 105286, ISSN 0882-4010,
THOTA, S. *et al*. N-Acylhydrazones as drugs. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 28, n. 17, p. 2797-2806, 2018.
Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev. 2015 Jul;28(3):603-61.
VAROTO, C.; EVANGELISTA, E.A.; SANTOS, JS. Perfil bacteriológico em secreções traqueais de pacientes internados em unidade de terapia intensiva: uma revisão narrativa. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 12, pág. e108121244038, 2023.
VERMA, G. Uma revisão explorando atividades biológicas de hidrazonas. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences** v. 6, n. 2, p 69-80, 2014.
Yılmaz,ES; Özkan Aslantaş. **Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in Staphylococcus aureus isolates.** Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. Volume 10, Issue 11, 2017, Pages 1059-1064, ISSN 1995-7645.
YUAN, Yang et al. Repurposing dimetridazole and ribavirin to disarm Pseudomonas aeruginosa virulence by targeting the quorum sensing system. Frontiers in Microbiology, v. 13, p. 978502, 2022.
Yadav S., Narasimhan B., Lim SM, Ramasamy K., Vasudevan M., Shah SAA, Mathur A. Síntese e avaliação das atividades antimicrobiana, antituberculosa e anticancerígena de derivados de benzimidazol. Egypt. J. Basic Appl. Sci. 2018;5:100–109. doi: 10.1016/j.ejbas.2017.11.001.
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017.