UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA - PPQB

MILENA OLIVEIRA ANDRADE SIMPLÍCIO

SÍNTESE, ESTUDO IN SILICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DIRETA E DA POTENCIALIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS POR UM DERIVADO DE HIDRALAZINA EM BACTÉRIAS PORTADORAS DE BOMBAS DE EFLUXO

CRATO-CE

2026

UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA

MILENA OLIVEIRA ANDRADE SIMPLÍCIO

SÍNTESE, ESTUDO IN SILICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DIRETA E DA POTENCIALIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS POR UM DERIVADO DE HIDRALAZINA EM BACTÉRIAS PORTADORAS DE BOMBAS DE EFLUXO

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito para obtenção do Título de Mestra em Química Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Hélcio Santos Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Janaína Esmeraldo Rocha

CRATO-CE

2026

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

(anexar no verso na folha II, na versão final em capa dura - E-mail biblioteca@urca.br,)

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

Simplicio, Milena Oliveira Andrade

TÍTULO: SÍNTESE, ESTUDO IN SILICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DIRETA E DA POTENCIALIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS POR UM DERIVADO DE HIDRALAZINA EM BACTÉRIAS PORTADORAS DE BOMBAS DE EFLUXO

74 páginas

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

Orientador(a): Prof. Dr. Hélcio Santos Silva
Coorientador(a): Prof. Dr. Janaína Esmeraldo Rocha

1. Staphylococcus aureus, 2. Hidrazona, 3. Antimicrobiano, 4. bomba de efluxo, 5. Resistência bacteriana

Universidade Regional do Cariri – Centro de Ciências Biológica e da Saúde – Departamento de Química Biológica.

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações Eletrônicas

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação abaixo identificada, autorizo à Universidade Regional do Cariri – URCA, a disponibilizar por tempo indeterminado ao alcance do público a obra abaixo citada, através do site http://bdtd.ibict.br/bdtd/, bem como da rede mundial de computadores – Internet, sem pagamento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, conforme permissões assinaladas, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data, atendendo à Portaria Nº 13 de 15/02/2006 da CAPES.

Identificação do Material Bibliográfico:	(X) Dissertação	( ) Tese
Autor: MILENA OLIVEIRA ANDRADE SIMPLICIO		
CPF: 07654355351	RG: 07654355351	
Nacionalidade: BRASILEIRA	Estado Civil: CASADA	
Endereço Completo: RUA ETELVINA MARIA GOMES, 35		
CEP: 63105000	Cidade: CRATO	Estado: CEARA
Fone/Celular: (88) 988256761	E-mail: milena.moreira@urca.br	
Título: SÍNTESE, ESTUDO IN SILICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DIRETA E DA POTENCIALIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS POR UM DERIVADO DE HIDRALAZINA EM BACTÉRIAS PORTADORAS DE BOMBAS DE EFLUXO		
Orientador: Prof. Dr. Hélcio Santos Silva		
Coorientador: Profa. Dr. Janaína Esmeraldo Rocha		
Membros da Banca: Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira		
Prof. Dra. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro		
Data da Defesa: 02/02/2026	Curso: Mestrado em Química Biológica	
Área do Conhecimento: Química Biológica		
Palavras-Chave: 1. Staphylococcus aureus, 2. Hidrazona, 3. Antimicrobiano, 4. bomba de efluxo, 5. Resistência bacteriana		
3. Agência de Fomento: CNPq		
Informações de Acesso ao Documento: para publicação	(X) Acesso Total	( ) Acesso Parcial
Em caso de publicação parcial, especifique o(s) arquivo(s) e/ou capítulo(s) restrito(s):		

Crato, 31 de Março de 2026

Havendo concordância com a publicação eletrônica enviamos o(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação gerada a partir da versão final corrigida e aprovada pelo Orientador. A restrição (parcial ou total) poderá ser mantida por até dois anos a partir da data de autorização da publicação sob responsabilidade do Programa. A extensão deste prazo demandará justificativa formal apresentada será comunicada à CAPES

Assinatura do Autor:

gov.br Documento assinado digitalmente
MILENA OLIVEIRA ANDRADE SIMPLICIO
Data: 30/03/2026 11:03:18-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Assinatura do Orientador:

Hélcio Silva dos Santos

MILENA OLIVEIRA ANDRADE SIMPLÍCIO

SÍNTESE, ESTUDO IN SILICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DIRETA E DA POTENCIALIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS POR UM DERIVADO DE HIDRALAZINA EM BACTÉRIAS PORTADORAS DE BOMBAS DE EFLUXO

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito para obtenção do Título de Mestra em Química Biológica.

Relatório de Dissertação defendida e aprovada em: 02 / 02 / 2026

BANCA EXAMINADORA

Hélcio Silva dos Santos

Prof. Dr. Hélcio Santos Silva
Orientador-Presidente - (UECE).

Janaína Esmeraldo Rocha

Profa. Dra. Janaína Esmeraldo Rocha
Coorientadora (URCA)

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

Membro Titular Interno UECE

Documento assinado digitalmente
gov.br
MARIA KAROLLYNA DO NASCIMENTO SILVA LEA
Data: 30/03/2026 11:13:21-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dra. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Membro Titular Interno URCA

Dedico este trabalho para o desenvolvimento da ciência do bem aqui na terra.

Em primeiro lugar sou grata a Deus, que é onipresente, onipotente e onisciente. Está nos mistérios da vida, na natureza que rege e domina tudo. Me fazendo acreditar que ainda vale sonhar e querer continuar no caminho que condiz com as razões de chegar na minha estrada de Sol. Mesmo com as dificuldades, o Mestre vem ensinando que elas existem e que é preciso vencê-las.

Grata aos meus pais, Francisca Aparecida e Marcos Cesar, pelo auxílio no que foi preciso e incentivo no processo de minha formação.

Grata ao meu orientador Professor Dr. Hélcio pela oportunidade e aprendizados. E grata principalmente a minha coorientadora, professora Dra. Janaína, pessoa especial, com jeito único, que esteve mais de perto, em todo o processo de construção dessa pesquisa me orientando, uma grande coorientadora, deixo aqui registrada minha gratidão pela paciência, dedicação e eu sei o bem que recebi.

Grata a todos que juntos contribuíram com a pesquisa, principalmente os que estiveram presentes nos testes e análises feitas no laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - LMBM. E em especial a doutoranda Ana Joyce que esteve disponível para tirar dúvidas e auxiliar no que estivesse podendo.

Agradeço também à CAPES pelo fundamental apoio financeiro.

Grata ao meu companheiro Vinicius Simplicio por me encorajar e incentivar e não me deixar desistir em meio a tantas dificuldades. Grata aos meus irmãos e meus amigos que auxiliaram na forma que podiam.

E por fim quero agradecer aos membros da banca examinadora pelo interesse e disponibilidade em avaliar este trabalho.

“Pai Nosso, que estais no Céu,

Santificado é o Teu nome,

Venha a nós o Teu Reino,

Seja feita a Tua vontade,

Assim na Terra, como no Céu,

O pão nosso de cada dia nos daí hoje,

Perdoai-nos as nossas dívidas,

Assim como nós perdoamos os nossos devedores,

Não nos deixeis cair em tentação,

Livrai-nos de todo Mal.

Amém” – Mestre Jesus.

Mateus 6:9-13

Título **Página**

Figura 1: Estrutura química da hidralazina, conforme dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2025). 12

Artigo: Atividade adjuvante e capacidade de modificação da resistência de uma nova hidrazona heterocíclica derivada do fármaco hidralazina em bombas de efluxo NorA e MepA de *Staphylococcus aureus* 14

Figura 2: Síntese da hidrazona..... 18

Figura 3: Estrutura da hidrazona HDZH1,4BENZ..... 18

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima da Hidrazona e das substâncias padrão em cepas de *Staphylococcus aureus*. 23

Figura 4: Atividade adjuvante da HDZH1, 4BENZ, sobre a cepa 1199B, quando associada ao Brometo de Etídio. 25

Figura 5: Atividade adjuvante da HDZH1, 4BENZ, sobre a cepa 1199B, quando associada a Norfloxacina. 26

Figura 6: Atividade adjuvante da HDZH1, 4BENZ, sobre a cepa K2068, quando associada ao Brometo de Etídio. 27

Figura 7: Atividade adjuvante da HDZH1, 4BENZ, sobre a cepa K2068, quando associada a Ciprofloxacina. 28

Tabela 2. Dados sobre as interações ligante-receptor (L-R) no processo de redocking do agonista CPZ, dos substratos clássicos CCCP e EtBr, e simulações de docking molecular da hidrazona, via receptor da bomba de efluxo MepA..... 29

Figura 8 (A) Visualização tridimensional da ancoragem do ligante na bomba de efluxo MepA, cepa S. aureus K2068, e visualização tridimensional das interações ligante-receptor entre resíduos de aminoácidos (cor azul) da bomba de efluxo MepA para os ligantes (cor nude) **(B)** CCCP, **(C)** CPZ, **(D)** EtBr e **(E)** hidrazona (laranja)..... 31

Tabela 3. Dados sobre as interações ligante-receptor (L-R) no processo de redocking do agonista CPZ, dos substratos clássicos CCCP e EtBr, e simulações de docking molecular da hidrazona, via receptor da bomba de efluxo NorA..... 33

Figura 9. (A) Visualização tridimensional da ancoragem do ligante na bomba de efluxo NorA, cepa S. aureus 1199B, e visualização tridimensional das interações ligante-receptor entre resíduos de aminoácidos (cor azul) da bomba de efluxo NorA para os ligantes (cor nude) **(B)** CCCP, **(C)** CPZ, **(D)** EtBr e **(E)** hidrazona..... 34

Tabela 4. Propriedades físico-químicas e perfil de semelhança a fármacos da hidrazona..... 36
Figura 10. (A) Mapa de superfície do potencial de lipofilicidade molecular (MLP) da base conjugada à hidrazona (logD7,4), **(B)** radar de otimização multiparamétrica (MPO) que expressa o grau de desejabilidade ADME. O espectro MPO foi especificamente analisado alinhando **(C)** TPSA e logP para estimar o perfil de permeabilidade no SNC. **(D)** MW e logD em pH 7,4 para estimar o perfil de absorção oral e a estabilidade metabólica e por alinhamento..... 37
Tabela 5. Farmacocinética pelos modelos ADME dos servidores web SwissADME e preADMET..... 38
Tabela 6. Parâmetros de toxicidade e dose letal oral (DL50) pela previsão consensual das ferramentas online PreADMET e ProTox-II..... 40

Sigla	Significado
1199B	Cepa de *Staphylococcus aureus*
ABC	Adenosine Triphosphate Binding Cassette
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
ANOVA	Analysis of Variance
ATB	Antibiótico(s)
BHI	Brain Heart Infusion
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCCP	Cyanide m-Chlorophenyl Hydrazone
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
CPZ	Clorpromazina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EB	Brometo de Etídio
TPSA	Área de Superfície Polar Topológica
CNS	Sistema Nervoso Central
BHE	Barreira Hematoencefálica
HTS	Triagem Virtual de Alto Rendimento
RMSD	Desvio Quadrático Médio
L-R	Ligante-receptor
TPSA	Área de Superfície Polar Topológica
MLP	Mapa de Superfície do Potencial de Lipofilicidade Molecular
MPO	Radar de Otimização Multiparamétrica
PPB	Proteínas Plasmáticas
MDCK	Células Madin-Darby Canine Kidney
CYP450	Isoformas do Citocromo P450
CENAUREMN	Centro Nordeste de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear
EtBr	Brometo de Etídio
HDZH1,4BENZ	Hidrazona derivada da hidralazina

IBE	Inibidor de Bomba de Efluxo
IPBE	Inibidor Padrão de Bomba de Efluxo
ISSO	International Organization for Standardization
K2068	Cepa de *Staphylococcus aureus*
MATE	Multidrug and Toxic Efflux
MDR	Bactérias Multirresistentes
MepA	Multidrug and Toxic Efflux Protein A
MFS	Major Facilitator Family
MRSA	Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NorA	Bomba de efluxo da família MFS
RND	Resistance Nodulation Division
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
DMSO	Dimetilsulfóxido
HIA	Ágar Infusão de Coração
BHI	Ágar Infusão Cérebro-Coração
SMR	Small Multidrug Resistance
UECE	Universidade Estadual do Ceará
FUNCAP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Ceará
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
URCA	Universidade Regional do Cariri

SUMÁRIO

Item	Assunto	Página
1	**INTRODUÇÃO GERAL.....**	1
1.1	OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS.....	2
1.2	ESTRATÉGIAS DE PESQUISA.....	3
1.3	ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	4
2	**OBJETIVOS.....**	5
2.1	Objetivo geral.....	5
2.2	Objetivos específicos.....	5
3	**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....**	6
3.1	Resistência bacteriana.....	6
3.2	Bombas de efluxo.....	7
3.3	*Staphylococcus aureus*.....	10
3.4	Uso de substâncias sintéticas com potencial antimicrobiano.....	11
3.5	Hidrazonas e Derivados da Hidralazina.....	11
4	**PRODUÇÃO CIENTÍFICA: Atividade adjuvante e capacidade de modificação da resistência de uma nova hidrazona heterocíclica derivada do fármaco hidralazina em bombas de efluxo NorA e MepA de *Staphylococcus aureus*.....**	14
5	**CONSIDERAÇÕES FINAIS.....**	48
5.1	CONCLUSÕES GERAIS.....	48
5.2	PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS.....	50
6	**REFERÊNCIAS.....**	52

Síntese, estudo in silico e avaliação da atividade antibacteriana direta e da potencialização de antibióticos por um derivado de hidralazina em bactérias portadoras de bombas de efluxo

RESUMO

Introdução: A atividade antimicrobiana é essencial no combate a microrganismos patogênicos e amplamente utilizada na prática clínica. Entretanto, o uso indiscriminado de antibióticos tem favorecido o aumento da resistência bacteriana, problema intensificado durante a pandemia de COVID-19, reduzindo a eficácia dos tratamentos convencionais. Nesse cenário, a busca por novas alternativas terapêuticas tem se intensificado. Derivados da hidralazina, especialmente as hidrazonas, destacam-se como candidatos promissores por apresentarem atividade antimicrobiana contra diferentes cepas bacterianas, além de potencial para modular mecanismos de resistência, como a inibição de bombas de efluxo e a potencialização da ação de antibióticos. **Objetivo:** Avaliar a atividade antibacteriana de derivados de hidralazina, assim como, a capacidade de combate ao mecanismo de bomba de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus*. **Metodologia:** Derivados da hidralazina foram sintetizados e testados; os ensaios utilizaram cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* (1199B e K2068). A atividade antibacteriana foi avaliada por determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e ensaios de modulação de efluxo em cepas bacterianas padronizadas. As análises foram realizadas em triplicata e submetidas a tratamento estatístico. Adicionalmente, estudos in silico incluíram acoplamento molecular, predição de propriedades farmacocinéticas (ADME) e avaliação toxicológica do composto. **Resultados e discussão:** A hidrazona HDZH1,4BENZ não apresentou atividade direta, mas mostrou potencial como inibidor adjuvante das bombas de efluxo NorA e MepA em cepas de *Staphylococcus aureus*, reduzindo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de brometo de etídio e antibióticos. Os resultados indicam que a hidrazona atua principalmente contra o mecanismo de efluxo. Esses achados ressaltam o potencial da HDZH1,4BENZ como adjuvante no combate à resistência bacteriana mediada por bombas de efluxo. **Conclusões:** A hidrazona não apresentou atividade antibacteriana direta, mas atuou como moduladora de resistência, potencializando antibióticos por inibição das bombas de efluxo NorA e MepA. Os dados in silico confirmaram alta afinidade do composto por esses alvos e indicaram propriedades farmacocinéticas favoráveis, destacando seu potencial como adjuvante terapêutico. Essa pesquisa é pioneira, não tendo outros estudos feitos com este mesmo derivado e trouxe bons resultados.

Palavras-Chave: *Staphylococcus aureus,* hidrazona, antimicrobiano, bomba de efluxo.
Agradecimentos: CAPES e CNPq.

Synthesis, in silico study and evaluation of the direct antibacterial activity and potentiation of antibiotics by a hydralazine derivative in efflux pump-bearing bacteria.

ABSTRACT

Introduction: Antimicrobial activity is essential in combating pathogenic microorganisms and is widely used in clinical practice. However, the indiscriminate use of antibiotics has favored the increase in bacterial resistance, a problem intensified during the COVID-19 pandemic, reducing the effectiveness of conventional treatments. In this scenario, the search for new therapeutic alternatives has intensified. Hydralazine derivatives, especially hydrazones, stand out as promising candidates because they exhibit antimicrobial activity against different bacterial strains, as well as the potential to modulate resistance mechanisms, such as the inhibition of efflux pumps and the potentiation of antibiotic action. **Objective:** To evaluate the antibacterial activity of hydralazine derivatives, as well as their ability to combat the efflux pump mechanism in Staphylococcus aureus strains. **Methodology:** Hydralazine derivatives were synthesized and tested; the assays used resistant strains of Staphylococcus aureus (1199B and K2068). Antibacterial activity was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and efflux modulation assays in standardized bacterial strains. Analyses were performed in triplicate and subjected to statistical treatment. Additionally, in silico studies included molecular docking, pharmacokinetic property prediction (ADME), and toxicological evaluation of the compound. **Results and discussion:** The hydrazone HDZH1,4BENZ did not show direct activity, but demonstrated potential as an adjuvant inhibitor of the NorA and MepA efflux pumps in Staphylococcus aureus strains, reducing the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of ethidium bromide and antibiotics. The results indicate that the hydrazone acts primarily against the efflux mechanism. These findings highlight the potential of HDZH1,4BENZ as an adjuvant in combating bacterial resistance mediated by efflux pumps. **Conclusions:** The hydrazone did not exhibit direct antibacterial activity, but acted as a resistance modulator, potentiating antibiotics by inhibiting the NorA and MepA efflux pumps. In silico data confirmed the compound's high affinity for these targets and indicated favorable pharmacokinetic properties, highlighting its potential as a therapeutic adjuvant. This research is pioneering, with no other studies conducted with this same derivative, and yielded good results.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, hydrazone, antimicrobial, efflux pump.

Acknowledgments: CAPES and CNPq.

IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE

O combate às infecções representa um dos maiores pilares da saúde pública, tendo os antimicrobianos como ferramentas essenciais nesse processo. Contudo, o uso indiscriminado desses medicamentos tem favorecido o avanço da resistência bacteriana, considerada atualmente uma ameaça global, pois torna as bactérias mais resistentes, reduz a eficácia dos tratamentos e dificulta a cura de doenças. Esse cenário crítico impulsiona a busca por novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, a hidralazina, fármaco tradicionalmente utilizado no tratamento da hipertensão arterial, vem despertando interesse por apresentar potenciais efeitos antimicrobianos. Os derivados da hidralazina têm se destacado como candidatos promissores contra bactérias resistentes, em especial *Staphylococcus aureus*. Este estudo busca compreender tanto a ação antibacteriana direta desses compostos quanto seu efeito adjuvante, por meio da potencialização da atividade de antibióticos e da inibição de mecanismos de defesa bacterianos, como as bombas de efluxo. O composto estudado ajudou os antibióticos a funcionarem melhor. Isso acontece porque ele bloqueia um mecanismo de defesa das bactérias, chamado bomba de efluxo, que normalmente expulsa o antibiótico para fora da célula. Ao impedir esse mecanismo, o medicamento consegue agir com mais eficiência, mesmo em bactérias resistentes. Embora o composto não seja um antibiótico por si só, ele pode ser usado como um “reforço” para aumentar o efeito de antibióticos já existentes. Como ainda não existem estudos com esse composto específico, essa pesquisa é inovadora e traz resultados promissores no combate à resistência bacteriana. Esses resultados podem abrir caminhos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, oferecendo perspectivas inovadoras no enfrentamento das infecções resistentes e contribuindo para a preservação da eficácia dos antimicrobianos disponíveis.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O potencial antimicrobiano refere-se à capacidade de substâncias ou agentes de inibir o crescimento ou destruir microrganismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e protozoários, por mecanismos que afetam a síntese proteica, a estrutura celular ou o material genético desses organismos (Nascimento, 2018).

A utilização de antimicrobianos no âmbito do tratamento e/ou prevenção de doenças e infecções causadas por microrganismos como bactérias e outros, é uma prática em saúde necessária e pertinente, sobretudo quando aplicada no cenário terapêutico. No entanto, alterações genéticas dos microrganismos e a utilização indiscriminada de substâncias antimicrobianas, tem acelerado, nos últimos anos, um processo de resistência a agentes como os antibióticos, o que gera preocupação aos principais órgãos mundiais de saúde (Garcia; Comarella, 2021).

A resistência bacteriana tem se intensificado mundialmente, configurando-se como um dos maiores desafios atuais para os sistemas de saúde, conforme apontam Yuan et al. (2022) e Kumar et al. (2019). Esse avanço está diretamente associado ao uso excessivo e inadequado de antibióticos, que favorece a seleção e disseminação de microrganismos resistentes e como consequência, observa-se o comprometimento progressivo da eficácia dos tratamentos disponíveis, o que eleva significativamente os riscos à saúde pública.

Diante desse cenário em expansão contínua, diversos estudos apontam para a necessidade urgente de investir em pesquisas que desenvolvam novos agentes antimicrobianos capazes de enfrentar a crescente circulação de cepas resistentes. A preocupação com a resistência bacteriana tem aumentado substancialmente nas últimas décadas, à medida que novas cepas resistentes surgem e se disseminam em todo o mundo, comprometendo a eficácia dos tratamentos e aumentando os custos de saúde (Souza; Costa, 2023).

A resistência aos antimicrobianos pode manifestar-se de diversas formas: 1) como uma característica intrínseca de certas espécies bacterianas, que conseguem resistir à ação de um determinado antibiótico devido a uma característica estrutural ou funcional inerente da espécie; 2) pode ser adquirida por meio de mutações que ocorrem durante a replicação celular ou ser induzida por agentes mutagênicos como radiações ionizantes e não ionizantes, agentes alquilantes ou espécies reativas de oxigênio (ROS); 3) adquirida pela incorporação de material genético exógeno previamente presente em outros micro-organismos, contendo genes de resistência que são propagados por meio de mecanismos de transferência gênica horizontal (Blair *et al*., 2015).

Em dezembro de 2019, após um surto de pneumonia desconhecida em Wuhan, na China, uma infecção causada pelo novo coronavírus, SARS-CoV-2, um RNA-vírus zoonótico de fita simples,

disseminou-se desde sua origem por vários países ao redor do mundo, resultando em altas taxas de morbimortalidade em escala global. Diante da grande repercussão dessa pandemia, observou-se um aumento dos casos de resistência bacteriana, associado tanto a utilização indiscriminada e incorreta, como pelo aumento do uso de antibióticos no tratamento e internações (Silva, 2021).

É válido destacar que, estudos e investigações têm buscado conhecer a ação e a possibilidade de uso para novos medicamentos e substâncias, como no caso dos derivados da hidralazina. As novas opções surgem como alternativa antibacteriana, o que repercute no aumento do potencial antimicrobiano frente aos casos de resistência bacteriana (Nascimento, 2018).

Chang e Chen (2022) relatam que a hidralazina, um fármaco antigo com ação vasodilatadora, continua sendo eficaz na redução da pressão arterial e é frequentemente utilizada como coadjuvante no tratamento da hipertensão e da insuficiência cardíaca crônica. Pesquisas mais recentes também apontam seu possível reaproveitamento terapêutico em doenças vasculares associadas à aterosclerose, além de apresentar aplicações promissoras em distúrbios renais.

Estudos têm explorado a capacidade dos derivados da hidralazina de inibir o crescimento de uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como fungos. Acredita-se que esses compostos possam atuar interferindo em diferentes vias metabólicas dos microrganismos, levando à inibição de seu crescimento e proliferação (Nery *et al*., 2023).

Frente ao exposto, considera-se a importância de refletir sobre a utilização dos derivados da hidralazina em outros contextos, tendo como exemplo o reconhecimento acerca do seu potencial antibacteriano. Portanto, o presente estudo busca avaliar a atividade antibacteriana direta do derivado de hidralazina HDZH1,4BENZ, assim como, a capacidade de combate do mecanismo de bomba de efluxo em bactérias de *Staphylococcus aureus*. Esse derivado foi sintetizado, sendo essa pesquisa pioneira, não tendo outros estudos feitos com este mesmo derivado e trouxe bons resultados.

1.1 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS

A resistência aos antimicrobianos constitui um desafio global que me motivou a realizar esta pesquisa. A mortalidade crescente devido à resistência bacteriana e a projeção de um crescimento ainda mais alarmante no futuro me preocupam. A escassez de novos medicamentos e o fato de a descoberta de fármacos não acompanhar o ritmo de crescimento da resistência como evidenciado pelo aumento de infecções bacterianas durante a pandemia de COVID-19, segundo (Silva, 2021) me levaram a buscar uma solução inovadora. Por isso, me concentrei no reposicionamento de fármacos. Essa estratégia, que utiliza medicamentos existentes para novas finalidades, pode ser uma forma de buscar novas maneiras de enfrentar a resistência.

Busco entender se essas substâncias atuam diretamente contra bactérias ou, de forma mais promissora, se potencializam a ação de antibióticos já existentes, especialmente contra

microrganismos que desenvolveram mecanismos de resistência como as bombas de efluxo. Meu trabalho visa demonstrar a eficácia dessas substâncias, contribuindo para a prática clínica e oferecendo uma nova perspectiva no combate à resistência.

1.2 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA

Este estudo empregou uma metodologia multifacetada, com o objetivo principal de investigar o potencial de derivados da hidralazina tanto na atividade antibacteriana direta quanto na potencialização de antibióticos contra bactérias que desenvolveram resistência por meio de bombas de efluxo. A estratégia fundamental que norteou toda a pesquisa foi o reposicionamento de fármacos. Essa abordagem é considerada crucial e inovadora, pois visa acelerar a descoberta de novas opções terapêuticas diante da crescente e alarmante ameaça da resistência antimicrobiana global.

Para a consecução dos objetivos, iniciou-se com a síntese de novas moléculas, especificamente hidrazonas e N-acilidrazonas. Estas foram obtidas pelo professor Hélcio a partir de medicamentos comerciais já estabelecidos e com perfis de segurança conhecidos, como a Apresolina® (hidralazina) e a Isoniazida.

A síntese do composto foi realizada em balão de fundo redondo, utilizando quantidades equimolares de 2,3-diidrobenzofuran-6-carbaldeído e hidralazina em meio aquoso acidificado com ácido fosfórico. A mistura foi submetida à agitação magnética e aquecimento a 100 °C por 45 minutos. Posteriormente, adicionou-se etanol absoluto, seguido de filtração para remoção de impurezas sólidas. Ao filtrado, foi incorporada uma solução aquosa fria de bicarbonato de sódio a 5%, promovendo a formação de um precipitado. O produto obtido foi então filtrado a vácuo, lavado com etanol frio, seco à temperatura ambiente e, por fim, coletado e pesado.

A seleção das cepas bacterianas para os ensaios microbiológicos foi cautelosa e seguiu os preceitos metodológicos necessários. Foram utilizadas linhagens de *Staphylococcus aureus*, em particular as cepas 1199B e K2068, que são reconhecidas por sua resistência a fluoroquinolonas hidrofílicas mediada pelas bombas de efluxo NorA e MepA, respectivamente. Essa escolha é essencial, pois o foco da pesquisa reside justamente na capacidade dos derivados da hidralazina em combater esses complexos mecanismos de resistência.

Para garantir a validade dos resultados e estabelecer comparações significativas, diversos controles foram incorporados aos ensaios. Foram incluídos inibidores de bomba de efluxo conhecidos, como Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl-hydrazone, Phenylalanine Arginyl β-Naphthylamide e Clorpromazina. Além disso, antibióticos específicos, como Norfloxacina (para a bomba NorA) e Ciprofloxacina (para a bomba MepA), foram empregados para avaliar de forma precisa a potencialização da atividade antibiótica pelos derivados da hidralazina. O Brometo de Etídio também foi uma ferramenta crucial para a avaliação da inibição das bombas de efluxo.

Os ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) constituíram o cerne da avaliação *in vitro*. Estes foram conduzidos em placas de 96 poços, seguindo adaptações da metodologia padrão do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019). A distribuição nas placas foi padronizada com 100 µL de inóculo bacteriano (10^5 UFC) em 900 µL de meio de cultura líquido BHI, seguido de microdiluições seriadas (1:1) das substâncias em estudo. As concentrações dos derivados variaram de 512 µg/mL a 8 µg/mL.

Um ponto chave da metodologia foi a avaliação da redução do CIM do brometo de etídio ou de antibióticos específicos em cepas portadoras de bombas de efluxo. Essa redução é um forte indicativo da capacidade dos derivados da hidralazina em inibir as bombas, um dos principais mecanismos de resistência bacteriana. Todos os ensaios foram cuidadosamente realizados em triplicatas para garantir a confiabilidade dos dados obtidos.

Complementarmente aos estudos experimentais, a pesquisa integrou ferramentas de química computacional para investigar as propriedades eletrônicas e estruturais da hidralazina e seus tautômeros. Essa abordagem computacional fornece insights valiosos sobre as características moleculares que podem estar relacionadas à atividade biológica.

A docagem molecular foi empregada para aprofundar a compreensão do mecanismo de ação dos derivados da hidralazina contra *Staphylococcus aureus*. Utilizando modelos estruturais das bombas de efluxo MepA e NorA, foram realizadas simulações com o software *AutodockVina*. Essas simulações, que envolveram 50 repetições com 20 poses por simulação, visaram identificar possíveis interações e os sítios de ligação das substâncias nas bombas de efluxo (Leal et al.,2021 e Uniprot Consortium, 2019).

A comparação com a docagem de antibióticos como Ciprofloxacino e Norfloxacino sob os mesmos parâmetros adicionou robustez à análise. Finalmente, a toxicidade dos derivados foi avaliada por meio de testes computacionais de ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade), uma etapa crucial para prever o perfil de segurança e a viabilidade terapêutica dos compostos investigados.

A análise estatística dos resultados dos testes de CIM, feita por meio de Graphpad Prism 6.01 e aplicando two-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni posttests, com $p < 0.01$, garantindo a validade e a significâncias dos dados obtidos, permitindo conclusões sobre o potencial dos derivados da hidralazina.

1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

O trabalho de dissertação foi estruturado em diferentes seções, abrangendo a Introdução, a definição dos Objetivos, a Fundamentação Teórica, a Produção Científica (que inclui um artigo resultante da pesquisa) e, por fim, as Considerações Finais.

- **Objetivos:** Gerais e Específicos
- **Fundamentação teórica:** Resistência bacteriana, Bombas de efluxo, *Staphylococcus aureus* e Uso de substâncias sintéticas com potencial antimicrobiano.
- **Produção Cientifica:** Capítulo 1:Manuscrito em processo de finalização a ser submetido na revista.
- **Considerações Finais:** Conclusões Gerais e Perspectivas de investigações futuras.

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana direta de derivados de hidralazina e seu potencial adjuvante, assim como, a capacidade de combate ao mecanismo de bomba de efluxo em bactérias de *Staphylococcus aureus*.

2.2 Objetivos Específicos

• Sintetizar os derivados de hidralazina;
• Avaliar a atividade direta da substância em cepas padrões e multirresistentes de *Staphylococcus aureus*.
• Avaliar a reversão do mecanismo de bomba de efluxo em bactérias de *Staphylococcus aureus* 1199B portadora da bomba NorA e K2068 portadora da bomba MepA;
• Realizar a docagem molecular;
• Verificar a toxicidade através dos testes computacionais de ADMET.

3.1 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana é um fenômeno global crescente e preocupante, que se refere à capacidade de bactérias de resistir aos efeitos de agentes antimicrobianos, como os antibióticos. Tal ação pode ocorrer em detrimento da evolução natural dos microrganismos ao longo do tempo, assim como pelas práticas de uso indiscriminado e inadequado de antibióticos pela população (Garcia; Comarella, 2021).

O aumento no número de bactérias resistentes aos antibióticos está colocando em risco os avanços da medicina, pois a falta de antibióticos eficazes para tratar patologias torna procedimentos hospitalares rotineiros, como cirurgias e transplantes, mais perigosos, aumentando o risco de infecções (Brito; Trevisan, 2021). O uso inadequado de antibióticos causa pressão seletiva nas bactérias, de modo que sua composição microbiana pode ser alterada e favorecer seu crescimento e multiplicação e, por sua vez, existe a possibilidade de transmissão às pessoas e ao meio ambiente de forma acelerada e descontrolada (Abou Heida *et al*., 2019).

Durante a pandemia da COVID-19, o uso indiscriminado de antimicrobianos tornou-se uma preocupação devido à prescrição do chamado 'KIT COVID', que incluía medicamentos como azitromicina, ivermectina e cloroquina. Apesar da falta de comprovação científica de sua eficácia, esses medicamentos foram usados como tentativa de tratamento (Furlan e Caramelli, 2021; Marinho e Paz, 2021). Embora os antibióticos não tratem nem previnam a Covid-19, pesquisas realizadas em nove países europeus indicaram um aumento no uso dessa classe de medicamentos durante a pandemia (Who, 2020).

Um dos principais mecanismos de resistência bacteriana é a produção de beta-lactamases, enzimas capazes de hidrolisar o anel beta-lactâmico presente nas penicilinas e em outros antibióticos beta-lactâmicos, inativando-os (Miranda; Vieira; Souza, 2022). Essas enzimas podem ser produzidas por uma variedade de bactérias e conferem resistência não somente às penicilinas, mas também a outros antibióticos relacionados, como as cefalosporinas.

A diversidade de beta-lactamases produzidas pelas bactérias é uma preocupação significativa por dificultar o desenvolvimento de antibióticos capazes de resistir a essas enzimas (Soares; Garcia, 2020). Assim, os mecanismos de resistência bacteriana abrangem uma ampla gama de adaptações que as bactérias podem adotar para neutralizar ou evitar os efeitos dos antibióticos, reduzindo assim sua eficácia no tratamento de infecções (Ferreira; Oliveira, 2021).

Segundo Tortora *et al*., (2017), os mecanismos de resistência podem manifestar-se de forma intrínseca, quando as bactérias já possuem, em sua constituição, as informações que conferem

resistência ao antimicrobiano, ou de maneira adquirida, quando o microrganismo recebe informações de outra célula, seja da mesma espécie ou não, que promovem essa resistência. Essas informações podem incluir fragmentos de material genético que, posteriormente, serão expressos como enzimas capazes de degradar a molécula do fármaco utilizado contra a bactéria específica.

De acordo com Loureiro *et al*., (2016), os principais mecanismos de resistência bacteriana incluem: 1) destruição ou modificação do fármaco através da via enzimática; 2) controle da acumulação no interior da célula, seja diminuindo a permeabilidade celular ao fármaco ou mediante sistemas de efluxo, onde conseguem evitar a acumulação intracelular do fármaco; 3) modificações das moléculas alvo dos antibióticos; e 4) produção de moléculas alvo alternativas que não são afetadas pelo fármaco, ao mesmo tempo em que continuam a produzir as moléculas alvo originais do fármaco, o que compromete a ação do antibiótico.

Eichenberger e Thaden (2019), Zhang e Cheng (2022), Ogawara (2019) e Sultan *et al*., (2018) falam que a degradação enzimática, a redução da permeabilidade da membrana e a ação de bombas de efluxo. Em bactérias Gram-negativas, especificamente, estratégias como a secreção de enzimas hidrolíticas e alterações na permeabilidade são comuns.

O reaproveitamento de medicamentos já existentes e o desenvolvimento de terapias antimicrobianas direcionadas, que protegem a microflora benéfica, são estratégias promissoras para a descoberta de novos tratamentos. Isso é relevante porque a falta de recursos financeiros ainda limita o avanço na criação de novos antibióticos (Brüssow, 2024; Farha, Brown, 2019).

O elevado custo econômico é o principal obstáculo no desenvolvimento de novos fármacos. Esse cenário desestimula a indústria farmacêutica, pois o desenvolvimento de um antibiótico exige um investimento considerável de tempo e dinheiro para um tratamento de curta duração. Além disso, é sujeito a acontecer o surgimento de resistência bacteriana, fazendo com que o retorno financeiro seja incerto, tornando o investimento menos atraente (Zheng, Sun, Wei, 2018).

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia eficaz ao acelerar o tempo de desenvolvimento e aumentar as chances de sucesso na aprovação regulatória. Isso ocorre porque já se conhece o perfil de toxicidade dos medicamentos existentes, o que facilita a entrada nas fases de avaliação pré-clínica e clínica, reduzindo custos e riscos. O ponto mais desafiador é determinar novos usos terapêuticos para os medicamentos já conhecidos. (Xu *et al*., 2020; Schcolnik-Cabrera, Juárez-López, Dueñas-González, 2020).

3.2 Bombas de efluxo

Entre os diversos mecanismos de resistência bacteriana, as proteínas que funcionam como bombas de efluxo transmembrana são frequentemente implicadas na resistência a vários antibióticos e outros agentes quimioterápicos. As bombas de efluxo são proteínas essenciais na fisiologia

bacteriana por atuarem na eliminação de metabólitos tóxicos, na manutenção do equilíbrio celular e na proteção contra diversas substâncias, como antimicrobianos, metais pesados e detergentes. Localizadas na membrana celular, essas proteínas são um dos principais mecanismos de defesa que as bactérias utilizam para expelir antibióticos e outros agentes quimioterápicos, o que contribui significativamente para sua sobrevivência e resistência aos tratamentos (Munita; Arias, 2016; Varela *et al*., 2021; Chetri, 2023).

Acerca dos mecanismos importantes na perspectiva da resistência bacteriana, vale ressaltar o uso de bombas de efluxo, sistemas de transporte ativo que podem extrair os antibióticos das células bacterianas antes que eles tenham a chance de exercer seus efeitos. Essas bombas de efluxo podem ser induzidas em resposta à exposição aos antibióticos e podem conferir resistência a uma ampla gama de compostos químicos, incluindo as penicilinas. A presença dessas bombas de efluxo pode dificultar significativamente o tratamento de infecções bacterianas, reduzindo a concentração eficaz dos antibióticos nas células bacterianas (Vale, 2022).

Conforme Nishino *et al*., (2021) e Thakur, Uniyal, Tiwari (2021), as bombas de efluxo estão presentes em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, onde desempenham um papel crucial na resistência a antibióticos. Enquanto algumas dessas bombas são seletivas para antimicrobianos específicos, outras são mais versáteis e conseguem expelir diversas classes de antibióticos. Essa ampla capacidade de extrusão contribui diretamente para o surgimento de bactérias multirresistentes (MDR). Por essa razão, o desenvolvimento de inibidores de bombas de efluxo é visto como uma estratégia vital para o combate a infecções causadas por esses microrganismos.

Esse mecanismo afeta todas as classes de antibióticos, no entanto, é mais eficaz na presença de macrolídeos, tetraciclinas e fluoroquinolonas, pois esses inibem a biossíntese de proteínas e DNA (Souza; Dias; Oliveira, 2022). O papel das bombas de efluxo vai além da simples expulsão de substâncias. Pesquisas evidenciam que elas também estão envolvidas na formação de células persistentes e no aumento das taxas de mutação, fatores que promovem a sobrevivência bacteriana. A crescente evidência de sua participação na virulência demonstra a necessidade de se aprofundar no entendimento desses mecanismos por sua relevância clínica (Ebbensgaard, Løbner-Olesen, Frimodt-Møller, 2020; Nishino *et al*., 2021).

Existem várias classes de bombas de efluxo, as quais são categorizadas de acordo com seu mecanismo de ação em transportadores que operam mediante transporte ativo primário, como a hidrólise de ATP no caso do transportador adenosine triphosphate binding cassette (ABC) – ligação de adenosina trifosfato, e aqueles que funcionam por transporte ativo secundário, utilizando o gradiente iônico intracelular, como os transportadores major facilitator family (MFS) – família de facilitadores principais, multidrug and toxic efflux (MATE) – multidrogras e efluxo tóxico, resistance nodulation division (RND) – família resistência-nodulação-divisão e small multidrug resistance

(SMR) – pequena resistência multidrogas. A MFS, MATE, RND e SMR operam por troca de prótons, enquanto a ABC funciona através da hidrólise de ATP (Costa; Silva Júnior, 2017).

A bomba de efluxo MepA é uma proteína codificada pelo gene homônimo mepA encontrada em bactérias como *Staphylococcus aureus*, pertence à família MATE, conhecida por suas bombas de extrusão que transportam diversos fármacos e toxinas para fora da célula bacteriana, essa proteína utiliza prótons como fonte de energia por meio de uma antiporta de íons sódio. Fármacos substratos para essa bomba são expulsos da célula bacteriana, comprometendo assim a eficácia dos tratamentos antibióticos (Guilhelmelli *et al*., 2013). E tem também a bomba de efluxo NorA que pertence à superfamília das grandes facilitadoras (MFS), uma categoria comum encontrada em bactérias como *Staphylococcus aureus*, sendo uma transportadora que faz a expulsão de agentes antimicrobianos (Lekshmi *et al*., 2018).

A perda de eficácia dos medicamentos antibacterianos está diretamente ligada à extrusão desses compostos pelas bombas de efluxo bacterianas, que minimizam a concentração do agente terapêutico na célula. Esse mecanismo de resistência faz com que terapias combinadas, que incluem um inibidor de bomba de efluxo (IBE), se tornem uma estratégia promissora. Essa abordagem busca restaurar a atividade dos antibióticos e, dessa forma, pode ajudar a compensar o ritmo lento da descoberta de novas moléculas antibacterianas, oferecendo uma solução para o crescente desafio da resistência (Avci *et al*., 2019).

As cepas de *Staphylococcus aureus* são notáveis por possuírem diversas bombas de efluxo multidrogas, como NorA e MepA, que fazem parte das famílias MATE e MFS. Essas bombas conseguem expelir uma ampla variedade de antibióticos. A superexpressão de genes como norA, norB, norC, mepA, mdeA e qacA/B está diretamente associada à alta resistência antimicrobiana, sendo que a presença de genes plasmídicos muitas vezes resulta da pressão seletiva de tratamentos (Baiomy; Shaker; Abbas, 2020).

As bombas de efluxo NorA e MepA, encontradas em *S. aureus*, são transportadoras de múltiplos fármacos. A NorA é capaz de expelir antibióticos como a norfloxacina e diversos corantes. Já a MepA transporta outras fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, e o corante brometo de etídio. A ação dessas bombas é crucial para a resistência do microrganismo a múltiplos medicamentos e substâncias tóxicas, intensificando a multirresistência bacteriana. (Oliveira, 2021; Martin, 2023).

O funcionamento dessas bombas se baseia no cotransporte, utilizando o gradiente de prótons transmembrana como fonte de energia, operando por meio do antiporte de íons sódio ou hidrônio. A bomba NorA, em particular, também pode usar a energia da hidrólise de ATP para expelir substâncias, evidenciando sua complexidade funcional (Martin, 2023).

3.3 *Staphylococcus aureus*

Diante dos mecanismos da bomba de efluxo, destaca-se *Staphylococcus aureus*, o qual é uma bactéria Gram-positiva, de formato esférico (coco), que frequentemente se agrupa em cachos semelhantes a uvas quando observado ao microscópio. É um microrganismo comumente encontrado na pele e nas mucosas de seres humanos e animais, sendo parte da flora natural em aproximadamente 30% da população humana. Contudo, sob certas condições, pode se tornar um patógeno oportunista, causando uma variedade de infecções que variam desde leves até potencialmente fatais (Lima, *et al*., 2015).

Cheung, Bae, Otto (2021); Howden *et al*., (2023); Rasheed e Hussein (2021) descrevem *Staphylococcus aureus,* um microrganismo que coloniza humanos e possui dupla natureza, podendo coexistir de forma inofensiva, mas pode se tornar patogênico e causar doenças responsáveis por causar enfermidade e letalidade. A bactéria tem formato circular, organiza-se em cachos, e suas colônias são de cor amarelo-dourada, se reproduz por fissão binária e pode obter energia por respiração anaeróbica ou fermentação.

Com isso, as infecções nas quais está relacionada podem envolver pele e tecidos moles, causar furúnculos, impetigo, celulite e abscessos. Em casos mais graves, pode resultar em infecções invasivas como pneumonia, endocardite, osteomielite, sepse e síndrome do choque tóxico, de modo que a sua patogenicidade é atribuída a uma série de fatores de virulência (Pinheiro *et al*., 2021).

De acordo com Rocha *et al*., (2021), o *S. aureus* produz diversas enzimas (como coagulase, hialuronidase e lipases) e toxinas (como toxina alfa, toxina esfoliativa e enterotoxinas) que facilitam a invasão e destruição dos tecidos do hospedeiro. Um dos principais desafios no tratamento das infecções por *Staphylococcus aureus* é a resistência antimicrobiana.

O desenvolvimento de resistência aos antibióticos foi identificado logo após a introdução da penicilina. Hoje em dia, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) representa uma preocupação significativa tanto em ambientes hospitalares quanto comunitários. Os MRSA são resistentes à maioria dos antibióticos beta-lactâmicos, o que restringe as opções terapêuticas disponíveis e aumenta a morbidade e mortalidade associadas às infecções causadas por essas bactérias (Gelatti *et al*., 2009).

As cápsulas de polissacarídeos, embora não sejam totalmente compreendidas em seu papel na patogênese, são consideradas um fator de virulência crucial. Essa estrutura polimérica confere proteção ao microrganismo contra a fagocitose, um dos principais mecanismos da resposta imune do hospedeiro. A cápsula também contribui para a biossíntese de biofilmes, que são comunidades celulares que possuem uma resistência intrínseca a antimicrobianos. A proteção contra células fagocíticas e a formação de biofilmes são, portanto, mecanismos biológicos que dificultam o

tratamento de infecções e reforçam a importância desses fatores para a sobrevivência bacteriana (Rasheed; Hussein, 2021).

3.4 Uso de substâncias sintéticas com potencial antimicrobiano

A utilização de substâncias sintéticas com potencial antimicrobiano é discutida de forma ampla e frequente nos espaços científicos, especialmente diante do aumento da resistência bacteriana e da necessidade de novas abordagens terapêuticas, a fim de ampliar o escopo de tratamento e mitigar os efeitos negativos causados pela resistência antimicrobiana (Luna, 2017).

As substâncias sintéticas antimicrobianas são compostos químicos projetados para combater microrganismos, incluindo bactérias, vírus, fungos e protozoários. Sua atuação se dá por diversos mecanismos, onde pode ser observada através da destruição da membrana celular bacteriana, causando lise celular e/ou pela interferência nos processos metabólicos vitais para a sobrevivência bacteriana, como a síntese de proteínas ou ácidos nucleicos (Luna, 2017).

Os antibióticos sintéticos são substâncias sintetizadas em laboratórios ou derivadas de plantas, caracterizados por sua baixa toxicidade para as células normais do hospedeiro e alta toxicidade para os agentes patogênicos. Os antibióticos sintéticos têm uma capacidade de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos. O uso desses medicamentos impede a proliferação de doenças bacterianas, porém, o uso descontrolado pode levar à resistência bacteriana. A resistência bacteriana diminui a imunidade e reduz a eficácia de outros medicamentos no tratamento de determinadas doenças e infecções. Quando ocorre resistência bacteriana, torna-se necessário testar novos antibióticos para combater as infecções, e é imprescindível realizar exames para identificar o fármaco mais potente, sempre seguindo a orientação de um profissional de saúde (Guimarães; Momesso; Pupo, 2010).

O estudo e o desenvolvimento de substâncias sintéticas antimicrobianas devem considerar a possibilidade de projetá-las para estruturas ou processos bacterianos que desenvolveram resistência a outros antibióticos, além de ampliar o leque para uso na prática clínica. Ademais, o monitoramento da utilização e funcionalidade dessas substâncias deve também acompanhar o processo de mitigação do potencial de desenvolvimento de resistência bacteriana aos novos compostos (Cachiba *et al*., 2012). Diante disso, é válido destacar acerca do uso da hidralazina e seus derivados como substâncias de potencial antimicrobiano, frente ao processo constante de resistência bacteriana da atualidade.

3.5 Hidrazonas e Derivados da Hidralazina

A hidralazina, um vasodilatador utilizado para tratar a hipertensão, tem estado disponível no mercado desde os anos 1950. Recentemente, tem sido objeto de estudo devido ao seu potencial antitumoral. Um estudo conduzido por Ruiz-Maganã *et al*. (2016) demonstrou que a hidralazina é

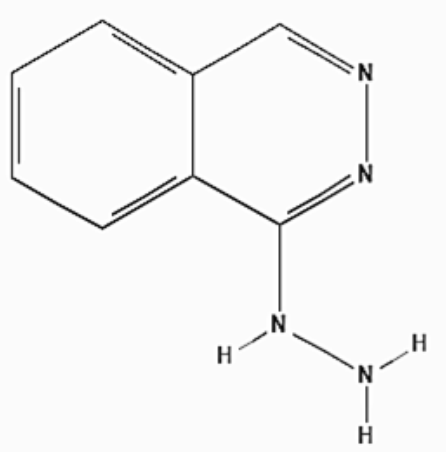
capaz de induzir apoptose dependente de caspases em células T leucêmicas com mutação no gene p53, ativando assim a via apoptótica mitocondrial e causando danos ao DNA.

As hidrazonas e os derivados da hidralazina são compostos químicos que têm atraído crescente interesse na pesquisa devido ao seu potencial antimicrobiano. Essas substâncias possuem estruturas químicas que permitem uma variedade de modificações, tornando-as versáteis na síntese de novos agentes antimicrobianos. São formadas pela reação entre uma hidrazina e um composto carbonílico, como um aldeído ou cetona. A estrutura básica das hidrazonas inclui um grupo funcional –C=N-NH2. Essa classe de compostos tem mostrado atividade contra uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias e fungos (Guimarães *et al*., 2017).

A hidralazina, de fórmula molecular $C_8H_8N_4$, é um composto químico azaareno que deriva da ftalazina, que tem em sua estrutura um anel benzeno condensado com um anel de seis membros com dois átomos de nitrogênio ligados diretamente um ao outro na molécula, que o prefixo (aza) indica presença de um átomo de nitrogênio substituindo o carbono e o (areno) refere-se a hidrocarbonetos aromáticos na forma de anéis de benzeno ou estruturas semelhantes (National Center for Biotechnology Information, 2025).

Podendo ser chamado de heteroareno orto-fundido porque tem um anel extra fundido no anel principal, de modo que os átomos que conectam ambos os anéis estão na posição orto, um em relação ao outro. O grupo funcional hidrazina (-NH-NH_2) está ligado à posição 1 do anel, o que determina suas propriedades químicas e biológicas. A fórmula estrutural da hidralazina é 1-hidrazinofitalazina, e sua nomenclatura IUPAC é 1-hidrazinopiralazina (NCBI, 2025).

Figura 1: Estrutura química da hidralazina, conforme dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2025),



O mecanismo de ação das hidrazonas pode variar, mas envolve geralmente a inibição de enzimas essenciais ao metabolismo microbiano ou a interação com o DNA microbiano, interrompendo a replicação celular. A versatilidade estrutural das hidrazonas permite desenvolver compostos com alvos específicos e modos de ação variados. Diversas hidrazonas têm demonstrado atividade significativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Estudos demonstram que esses compostos podem ser eficazes contra cepas resistentes a múltiplas drogas (Passos, 2012).

As hidrazonas e os derivados da hidralazina têm sido objeto de crescente interesse científico por seu promissor potencial antimicrobiano. Tais compostos químicos possuem estruturas versáteis, que permitem diversas modificações, facilitando a criação de novos agentes com essa finalidade. Essas substâncias são sintetizadas a partir da reação de uma hidrazina com um composto carbonílico, como um aldeído ou cetona. A estrutura central das hidrazonas é caracterizada pelo grupo funcional −C=N−NH2, e elas têm demonstrado eficácia contra uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias e fungos (Guimarães *et al*., 2017).

Os derivados da hidralazina atuam de várias maneiras, incluindo a inibição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas, além da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem danificar componentes celulares vitais dos microrganismos. Estudos indicam que derivados da hidralazina têm atividade significativa contra uma ampla gama de bactérias, incluindo aquelas resistentes a antibióticos tradicionais (Santos, 2021).

O potencial antimicrobiano das hidrazonas e dos derivados da hidralazina reside em sua capacidade de serem modificados quimicamente para otimizar a atividade contra microrganismos específicos. A síntese de novos derivados pode levar ao desenvolvimento de tratamentos mais eficazes contra infecções bacterianas e fúngicas, especialmente aquelas causadas por cepas resistentes a múltiplos medicamentos (Santos, 2021).

European Journal of Pharmacology

Adjuvant Activity and Resistance-Modifying Capacity of a Novel Heterocyclic Hydrazone Derived from the Drug Hydralazine in NorA and MepA efflux pumps of Staphylococcus aureus

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Translational pharmacology
Keywords:	Bacterial resistance; Efflux pumps; NorA; MepA; Hydrazone
Corresponding Author:	Helcio Silva Santos, Ph.D State University of Acaraú Valley EUsébio, BRAZIL
First Author:	Milena Oliveira Andrade Moreira
Order of Authors:	Milena Oliveira Andrade Moreira
	Karla Susanna Tavares Grangeiro Belém
	Janaina Esmeraldo Rocha
	Davi Ramalho Furtado
	Gildenia Alves de Araújo
	Ana Joyce Morais Bento
	Jaiza Maria Lima Dias
	Jessica Bezerra Maciel
	Henrique Douglas Melo Coutinho
	Francisco das Chagas Lima Pinto
	Emmanuel Silva Marinho
	Marcia Machado Marinho
	Alexandre Magno Rodrigues Teixeira
	Helcio Silva Santos, Ph.D
Abstract:	Hydrazones are organic compounds with the general structure R2C=NNHR1, distinguished by their versatility and modifiability, and are widely used in various applications due to their physicochemical and biological properties. They exhibit anticancer, anti-inflammatory, antibiofilm, and antibacterial activities. Antibiotic-resistant bacteria represent a serious threat to public health, employing mechanisms such as enzymatic inactivation and efflux pumps. This study investigated the hydrazone HDZH1,4BENZ, a hydralazine-derived compound, evaluating its antibacterial activity and its adjuvant potential in combination with antibiotics against Staphylococcus aureus strains expressing the NorA and MepA efflux pumps. Bacteriological assays were performed using the broth microdilution method in BHI medium. For efflux pump assays, controls were prepared using a standard efflux pump inhibitor. The Staphylococcus aureus strains 1199B (NorA efflux pump–expressing) and K2068 (MepA efflux pump–expressing) were used. Although HDZH1,4BENZ did not show significant direct antibacterial activity, the results indicate that this hydrazone exerts a significant inhibitory effect on the NorA and MepA efflux pumps in Staphylococcus aureus, thereby potentiating the efficacy of antibacterial agents. The hydrazone exhibited activity comparable to chlorpromazine, suggesting that it may represent a promising alternative in the fight against antibiotic-resistant bacterial infections.

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Atividade adjuvante e capacidade de modificação da resistência de uma nova hidrazona heterocíclica derivada do fármaco hidralazina em bombas de efluxo NorA e MepA de *Staphylococcus aureus*

Milena Oliveira Andrade Simplício[a], Karla Susanna Tavares Grangeiro Belém[a], Janaina Esmeraldo Rocha[a] , Davi Ramalho Furtado[a] , Gildenia Alves de Araújo1[a], Ana Joyce de Morais Bento[a] , Jaiza Maria Lima Dias[c], Jessica Bezerra Maciel[b], Henrique Douglas Melo Coutinho[a], Francisco das Chagas Lima Pinto[d], Emmanuel Silva Marinho[b], Marcia Machado Marinho[b], Alexandre Magno Rodrigues Teixeira[b], Hélcio S. dos Santos[1,2,3*]

[a]Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Departamento de Química Biológica,Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil

[b]Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Fortaleza, CE, Brasil

[c]Curso de Química, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, Ceará, Brasil

[d]Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, SE, Brasil*

***Autor correspondente**: Universidade Estadual do Vale do Acaraú, Curso de Química, Sobral, CE, Brasil. Endereços de e-mail: helcio_santos@uvanet.br

† Hélcio S. dos Santos, http://orcid.org/0000-0001-5527-164X

Artigo Publicado na Revista: European Journal of Pharmacology

Fator de Impacto: 4,7

Qualis: A2

ABSTRACT

As hidrazonas são compostos orgânicos com a estrutura geral $R_2C=NNHR_1$, que se distinguem pela sua versatilidade e modificabilidade, sendo amplamente utilizadas em diversas aplicações devido às suas propriedades físico-químicas e biológicas. Apresentam atividades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antibiofilme e antibacterianas. As bactérias resistentes a antibióticos representam uma séria ameaça à saúde pública, empregando mecanismos como a inativação enzimática e bombas de efluxo. Este estudo investigou a hidrazona HDZH1,4BENZ, um composto derivado da hidralazina, avaliando sua atividade antibacteriana e seu potencial adjuvante em combinação com antibióticos contra cepas de *Staphylococcus aureus* que expressam as bombas de efluxo NorA e MepA. Os ensaios

bacteriológicos foram realizados utilizando o método de microdiluição em caldo BHI. Para os ensaios com bombas de efluxo, foram preparados controles utilizando um inibidor padrão de bombas de efluxo. Foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* 1199B (expressando a bomba de efluxo NorA) e K2068 (expressando a bomba de efluxo MepA). Embora o HDZH1,4BENZ não tenha apresentado atividade antibacteriana direta significativa, os resultados indicam que essa hidrazona exerce um efeito inibitório significativo sobre as bombas de efluxo NorA e MepA em *Staphylococcus aureus*, potencializando, assim, a eficácia de agentes antibacterianos. A hidrazona exibiu atividade comparável à da clorpromazina, sugerindo que pode representar uma alternativa promissora no combate a infecções bacterianas resistentes a antibióticos.

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

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos convencionais impulsionou a busca por novas estratégias terapêuticas. Estas incluem o desenvolvimento de compostos sintéticos capazes de combater microrganismos, produzidos em laboratório por meio de processos químicos complexos que envolvem a manipulação de reações e o uso de tecnologias avançadas (Coley et al., 2019).

Do ponto de vista da saúde pública, as bactérias resistentes a antibióticos são uma preocupação global, pois empregam múltiplos mecanismos de resistência, como a inativação enzimática contra penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos; a modificação e proteção de alvos moleculares contra vancomicina, penicilinas e fluoroquinolonas; a expressão de fatores de virulência, incluindo a formação de biofilme; e mecanismos de extrusão de fármacos contra fluoroquinolonas, macrolídeos e tetraciclinas. Essas bactérias disseminam tais mecanismos entre diferentes cepas, levando a um aumento nas populações multirresistentes (Abd et al., 2021).

Neste contexto, as bombas de efluxo merecem atenção especial como uma importante estratégia de resistência, uma vez que atuam em uma ampla gama de substratos prejudiciais às células bacterianas e também participam da expressão de fatores de virulência (Mohanty; Pachpute; Yadav, 2021). Entre as principais famílias de efluxo, destaca-se a superfamília dos facilitadores principais (MFS), exemplificada pela bomba de efluxo NorA, que medeia a resistência às fluoroquinolonas em cepas de *Staphylococcus aureus* (Huang et al., 2022). Outro grupo relevante é a família de extrusão de múltiplos fármacos e compostos tóxicos (MATE), como a bomba de efluxo MepA, que está associada a cepas de S. aureus resistentes à vancomicina (Gaurav et al., 2023).

Em relação às estratégias para combater a resistência bacteriana, as abordagens notáveis incluem a descoberta de novas moléculas com atividade antibiótica, a reutilização de medicamentos clinicamente utilizados, originalmente desenvolvidos para outras condições de saúde, mas com potenciais efeitos antibacterianos, e a investigação dos mecanismos de resistência a nível molecular para orientar a prospecção e a síntese de novos agentes (Varela et al., 2021). A utilização de

substâncias adjuvantes capazes de interagir com os mecanismos de resistência bacteriana e, assim, aumentar a eficácia dos antibióticos, também é uma estratégia amplamente adotada em contextos clínicos reais (Dhanda; Acharya; Haldar, 2023).

Dentro deste contexto, as hidrazonas podem ser consideradas compostos promissores. As hidrazonas são compostos orgânicos com a estrutura geral $R_2C{=}NNHR_1$, sintetizados através da reação entre uma hidrazina e uma cetona ou aldeído (Rollas; Güniz, 2007). A estrutura da hidrazona destaca-se pela sua versatilidade e capacidade de modificação através da substituição de ligantes, servindo como bloco de construção para diversas moléculas (Betancourth et al., 2022) com distintas propriedades físico-químicas e uma ampla gama de atividades biológicas (Gebretsadik et al., 2021).

Entre as suas atividades biológicas relevantes para as ciências da saúde, as hidrazonas exibem atividade anticancerígena (Zebbiche et al., 2021), potencial antinociceptivo e anti-inflamatório (Medeiros et al., 2021), efeitos antibiofilme (Aydin et al., 2023) e atividade antibacteriana (Shah et al., 2022; Aly; Fathalla, 2020).

Além disso, as hidrazonas são utilizadas como agentes espectrofotométricos para a detecção de metais e compostos orgânicos em diversas amostras, incluindo fluidos biológicos. Eles atuam como coletores orgânicos em processos de flotação de metais e como corantes em células solares sensibilizadas por corantes (DSSCs) devido às suas amplas bandas de absorção. Outras aplicações incluem quimiossensores, indicadores de pH, reagentes para tingimento têxtil, detectores microbianos e inibidores de corrosão para metais. Essa afinidade por metais surge da presença de múltiplos sítios de ligação covalente em vários derivados de hidrazona (Jabeen, 2022).

Com base nas considerações acima, este estudo teve como objetivo investigar o potencial antibacteriano da hidrazona HDZH1,4BENZ, derivada de uma reação sintética entre benzaldeído e hidralazina. Seu efeito antibacteriano direto foi avaliado, assim como seu potencial adjuvante na inibição de sistemas de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus* que expressam as bombas de efluxo NorA e MepA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Procedimentos Gerais

Síntese e caracterização da hidrazona

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, 0,50 mmol de 2,3-diidrobenzofuran-6-carbaldeído foram misturados 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 agitada magneticamente e aquecida a 100 °C por 45 minutos. Em seguida, 15 mL de etanol absoluto foram adicionados à mistura reacional, que foi posteriormente filtrada, e o filtrado coletado em um béquer. O resíduo retido no papel de filtro foi descartado e 20 mL de uma solução

aquosa fria de $NaHCO_3$ a 5,0% (m/v) foram adicionados ao filtrado. O sólido resultante 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.

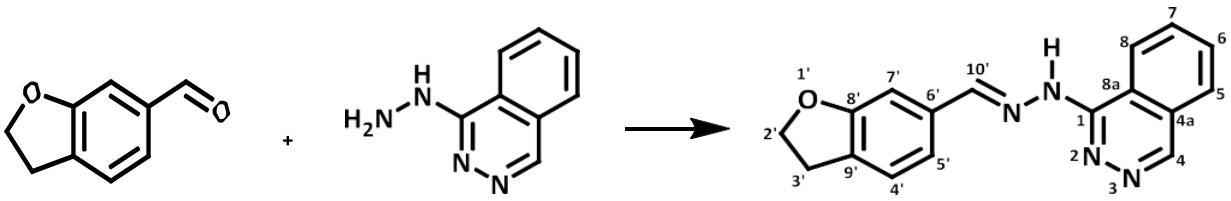
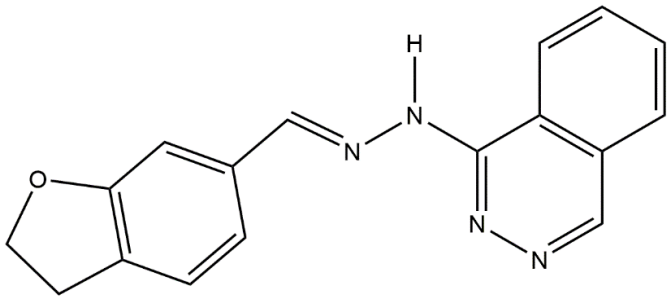


Figura 2: Síntese da hidrazona

1H NMR (500 MHz, DMSO); δH δ 13.98 (s, NH-1), 8.93 (s, H-10'), 8.90 (2H, m, H-8/H-7'), 8.13 (s, H-4), 8.05 (3H, m, H-5/H-6/H-7), 7.75 (d, J = 7.7 Hz, H-5'), 6.87 (d, J = 7.7 Hz, H-4'), 4.63 (2H, t, J = 9.1 Hz, 2H-2'), 3.28 (2H, t, J = 9.1 Hz, 2H-3'). 13C NMR (125 MHz, DMSO); δC 162.5 (C-8'), 153.0 (C-10'), 147.6 (C-1), 135.0 (C-4/C-6'), 133.2 (C-6/C-4'), 130.3 (C-7), 128.5 (C-9'), 127.7 (C-4a), 127.6 (C-5), 124.9 (C-8a/C-5'), 124.7 (C-8), 109.1 (C-7'), 71.7 (C-2'), 28.5 (C-3').

A síntese da hidrazona HDZH1,4BENZ foi feita pelo orientador desta pesquisa, o professor doutor Hélcio Silva Santos da Universidade Estadual do Ceara (UECE), segue abaixo a estrutura da Hidrazona:



(*E*)-1-(2-((2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)methylene)hydrazinyl)phthalazine

Figura 3: Estrutura da hidrazona HDZH1,4BENZ

Substâncias

Os inibidores de bombas de efluxo utilizados como controles foram o carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) e a clorpromazina (CPZ). Os antibióticos específicos para cada bomba de efluxo foram a norfloxacina para a bomba NorA na cepa 1199B e a ciprofloxacina para a bomba MepA. Dimetilsulfóxido (DMSO) e brometo de etídio também foram utilizados. Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Os meios de cultura empregados incluíram ágar infusão de coração (HIA), ágar infusão cérebro-coração (BHI), ágar sangue e glicerol, todos adquiridos da Difco Laboratories Ltd.

Microrganismos Utilizados nos Ensaios de Inibição

As cepas de *Staphylococcus aureus* utilizadas foram 1199B e K2068, que são resistentes a fluoroquinolonas hidrofílicas por meio das proteínas de efluxo NorA e MepA, respectivamente.

Preparação e Padronização de Inóculos

Para os ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM), os inóculos foram preparados a partir de estoques congelados. Esses estoques foram subcultivados em tubos de ágar infusão de coração e incubados a 37 °C. Os inóculos foram preparados em solução salina estéril e padronizados de acordo com a escala de McFarland 0,5, correspondendo a aproximadamente 10^8 UFC (unidades formadoras de colônias). Este inóculo padronizado foi utilizado tanto para os ensaios de CIM quanto para os experimentos de inibição da bomba de efluxo.

Ensaios de Concentração Inibitória Mínima

A partir de culturas sólidas de HIA, as bactérias foram subcultivadas em placas de HIA e incubadas a 37 °C por 24 h. Posteriormente, os meios de distribuição foram preparados em microtubos utilizando 100 µL de inóculo e 900 µL de meio BHI líquido. O conteúdo foi transferido para placas de microdiluição de 96 poços, com 100 µL adicionados a cada poço. Microdiluições seriadas das substâncias de teste foram então realizadas adicionando 100 µL ao penúltimo poço (diluição 1:1), com o último poço servindo como controle de crescimento. As concentrações variaram de 512 µg/mL a 8 µg/mL, seguindo a metodologia padrão para determinação da CIM (Kadeřábková et al., 2024). Após 24 horas de incubação, as placas foram lidas com base na mudança de cor após a adição de 20 µL de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido). A redução da resazurina por células metabolicamente ativas resulta em uma mudança de cor de azul para rosa/vermelho, indicando crescimento bacteriano, enquanto a persistência da cor azul indica inibição do crescimento (Herman et al., 2024). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Ensaio de Redução do Efluxo por Diminuição da CIM

Para avaliar a redução da CIM do brometo de etídio, os inóculos foram obtidos de culturas incubadas a 37 °C por 24 horas. Os inóculos foram preparados em solução salina e padronizados para o padrão 0,5 de McFarland (≈10^8 UFC). Os meios de distribuição para o grupo teste e o grupo controle foram preparados em microtubos. Para o grupo teste, foram adicionados 150 µL de inóculo e o composto teste em uma concentração subinibitória (MIC/8), e o volume final foi ajustado para 1,5 mL. O grupo controle continha o mesmo volume de inóculo, ajustado para o mesmo volume final. O conteúdo foi transferido para placas de microdiluição de 96 poços em distribuição vertical, com 100 µL adicionados a cada poço. Foram realizadas microdiluições seriadas de brometo de etídio (1:1),

com concentrações variando de 512 µg/mL a 0,5 µg/mL. Após 24 h de incubação, as placas foram lidas utilizando resazurina, conforme descrito anteriormente. Uma redução na CIM (Concentração Inibitória Mínima) do brometo de etídio ou de antibióticos específicos em cepas portadoras de bombas de efluxo foi considerada indicativa de inibição do sistema de efluxo, de acordo com Tintino et al. (2020). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a mesma metodologia foi aplicada aos antibióticos testados.

Análise Estatística

Os valores centrais e os desvios padrão foram obtidos seguindo a metodologia descrita por Freitas et al. (2021) para análise microbiológica em placas de microdiluição. A análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste post hoc de Bonferroni, foi aplicada utilizando o GraphPad Prism 6.01. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Detalhes Computacionais

As simulações foram realizadas em um sistema operacional de 64 bits. Os softwares e extensões utilizados incluíram AutoDockTools (El-Hachem et al., 2017), AutoDock Vina (Morris et al., 2009), MarvinSketch (http://www.chemaxon.com), Discovery Studio Visualizer (https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download), UCSF Chimera (https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/) e Avogadro (http://avogadro.cc/). Além disso, todos os códigos aplicados são de acesso livre e destinados ao uso acadêmico.

Preparação e otimização do ligante

A estrutura da chalcona (HDZH2OH) foi inicialmente construída utilizando a interface gráfica do MarvinSketch (ChemAxon, https://chemaxon.com/products/marvin) e posteriormente submetida à otimização conformacional utilizando o campo de força clássico MMFF94 (Merck Molecular Force Field 94). As etapas de minimização de energia foram realizadas com o programa Avogadro® (Snyder & Kucukkal, 2017), configurado para empregar o formalismo MMFF94 e o algoritmo de Descida Mais Íngreme, com um total de 500 iterações e um critério de convergência definido em 1×10^{-7} (Donchev et al., 2005).

Obtenção e preparação de estruturas proteicas

As sequências de aminoácidos de MepA de *Staphylococcus aureus* K2068 e NorA de S. aureus 1199B foram adaptadas de acordo com De Araújo et al. (2025), Freitas et al. (2024, 2022). MepA foi obtida do banco de dados Universal Protein Resource (UniProt, http://www.uniprot.org), depositada sob o código NCTC8325 (Pundir et al., 2016; Warraich et al., 2021). Assim, a construção do modelo proteico foi realizada utilizando o servidor SWISS-

MODEL (https://swissmodel.expasy.org/), que identifica modelos estruturais por meio do alinhamento de sequências utilizando o algoritmo de busca iterativa de sequências ultrarrápidas baseado em HMM-HMM (HHblits) (Remmert et al., 2012). Com base no alinhamento, a estrutura com maior similaridade foi selecionada para a construção do modelo; Assim, o transportador de extrusão de múltiplos fármacos e compostos tóxicos (MATE) de Bacillus halodurans (PDB: 5C6N) foi escolhido para este estudo (Costa et al., 2025; Radchenko et al., 2015). Para NorA, a estrutura foi obtida do RCSB Protein Data Bank (https://www.rcsb.org) sob o código PDB 7LO7 (NorA em complexo com Fab25), com uma resolução de 3,74 Å, determinada por microscopia eletrônica, e classificada como uma proteína transportadora de *Staphylococcus aureus*/Homo sapiens, como recentemente caracterizada por Brawley et al. (2022).

Procedimentos gerais de acoplamento

Simulações de acoplamento molecular foram realizadas usando o AutoDock Vina® (Trott & Olson, 2010), empregando caixas de grade configuradas para abranger completamente as estruturas alvo. Para a proteína MepA, a caixa de grade foi centrada nas coordenadas 9,189 (x), −19,589 (y) e −19,523 (z), com dimensões de 84 (x), 98 (y) e 118 (z) Å. Para NorA, a caixa de grade foi centrada em 139,133 (x), 138,065 (y) e 155,834 (z) Å, com dimensões de 108 (x), 126 (y) e 126 (z) Å. As estruturas tridimensionais das proteínas e dos ligantes foram previamente preparadas adicionando cargas parciais de Gasteiger e Kollman, e os hidrogênios apolares foram fundidos com os átomos pesados correspondentes, seguindo os protocolos padrão do AutoDock Vina®. Todos os outros parâmetros foram mantidos em seus valores padrão (Wiley et al., 2006). Cinquenta execuções de acoplamento independentes foram realizadas por ligante, cada uma gerando 20 conformações de ligação (poses), usando um parâmetro de exaustividade de 64 para garantir uma amostragem robusta do espaço conformacional. A pose representativa foi selecionada com base na energia livre de ligação mais favorável (menores valores de afinidade previstos) e foi considerada a conformação mais estável para análises estruturais e energéticas subsequentes do complexo ligante-proteína (Agarwal & Smith, 2023).

Para validar estatística e metodologicamente os protocolos de acoplamento, simulações de reacoplamento foram conduzidas, nas quais as conformações do ligante co-cristalizadas foram reacopladas em suas respectivas proteínas-alvo. A precisão do redocking foi avaliada pelo cálculo do desvio quadrático médio (RMSD) entre a pose prevista e a estrutura experimental. Valores de RMSD ≤ 2,0 Å foram adotados como critério para validação satisfatória, de acordo com as recomendações da literatura (Yusuf et al., 2008). A estabilidade dos complexos proteína-ligante foi inferida com base na energia livre de ligação estimada a partir das simulações.

Complexos com valores de afinidade inferiores a −6,0 kcal/mol foram considerados energeticamente favoráveis e potencialmente estáveis (Shityakov & Förster, 2014). Todas as simulações foram conduzidas sob condições de parametrização idênticas, garantindo consistência metodológica e permitindo análises comparativas robustas. O desempenho dos ligantes de interesse foi comparado com os antibióticos de referência CCCP (carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona), CPZ (clorpromazina) e EtBr (brometo de etídio), utilizados como controles positivos nos respectivos sistemas.

Propriedades de semelhança a fármacos e ADME

Com base no protocolo descrito por Rocha et al. (2021), as propriedades físico-químicas do composto HDZH2O foram determinadas utilizando o software MarvinSketch (ChemAxon, licença acadêmica). Os parâmetros calculados foram avaliados de acordo com os critérios de semelhança a fármacos, seguindo a regra clássica dos cinco de Lipinski (Lipinski, 2004; Lipinski et al., 2012; Pfizer) e a regra de Veber (Veber, 2002; GSK), que consideram limites críticos para propriedades como logP, massa molecular, número de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, área de superfície polar topológica (TPSA) e número de ligações rotativas. Adicionalmente, o algoritmo de otimização multiparamétrica para penetração no sistema nervoso central (CNS MPO) (Pires et al., 2018), implementado no software, foi aplicado para prever o potencial do composto em atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), um critério relevante para fármacos de ação central. Os parâmetros farmacocinéticos relacionados à absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) foram estimados usando uma abordagem de consenso, combinando dados preditivos do servidor PreADMET, com base em modelos in vitro (https://preadmet.bmdrc.kr/adme-prediction/), com resultados das ferramentas de triagem in silico do servidor SwissADME (http://www.swissadme.ch/), aumentando assim a robustez das inferências sobre a viabilidade biofarmacêutica do composto.

Farmacóforos tóxicos e efeitos toxicológicos

A identificação de grupos farmacofóricos foi realizada por meio de triagem virtual de alto rendimento (HTS) usando a plataforma eMolTox (https://xundrug.cn/moltox). Esse procedimento permitiu a detecção automatizada de subestruturas moleculares associadas à toxicidade, reatividade química ou instabilidade metabólica, com base em algoritmos preditivos validados. As subestruturas identificadas como alertas toxicológicos foram posteriormente analisadas quanto à sua correlação com potenciais efeitos adversos, usando o composto HDZH2O como modelo de similaridade estrutural. Esta análise foi complementada com dados dos bancos de dados preditivos do servidor PreADMET (https://preadmet.bmdrc.kr/toxicity/) e

do ProTox-3.0 (https://tox.charite.de/protox3/index.php?site=home), permitindo a associação entre as subestruturas identificadas e os potenciais riscos toxicológicos, como hepatotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade aguda.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeitos antibacterianos diretos e adjuvantes em cepas portadoras de bomba de efluxo

O efeito antibacteriano da hidrazona foi avaliado contra as cepas 1199B e K2068, portadoras de bomba de efluxo; entretanto, não apresentou uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) relevante, com valores ≥ 1024 µg/mL. A Tabela 1 abaixo apresenta os valores de CIM da hidrazona, bem como os dos antibióticos utilizados no ensaio de reversão da resistência bacteriana e do brometo de etídio, testados contra as cepas empregadas.

Tabela 1: 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
HDZH1,4BENZ	≥ 1024 µg/mL	≥ 1024 µg/mL	≥ 1024 µg/Ml
Norfloxacina	128 µg/mL	-	8 µg/Ml
Ciprofloxacina	-	17,96 µg/mL	8 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.

A cepa S.a. ATCC 25923 foi utilizada como controle da expressão fenotípica das cepas portadoras de bomba de efluxo, uma vez que ela não apresenta mecanismos de efluxo associados à fluoroquinolonas, servindo como padrão em testes de resistência a antibióticos (Nguyen *et al*., 2021). A cepa S.a 1199B possui uma mutação no gene que codifica a enzima topoisomerase (Kaatz; Seo, 1997), bem como uma mutação do gene NorA, que codifica uma proteína de efluxo (Kaatz; Seo, 1995). Por sua vez, a cepa S.a. K2068 não possui modificações na topoisomerase, sendo sua mudança fenotípica baseada em uma alteração no gene MepA, que codifica uma proteína de efluxo (Kaatz; Moudgal; Seo, 2002).

Os resultados das CIMs confirmam essa modificação fenotípica. Para o antibiótico Norfloxacina (usado como controle na cepa 1199B), houve um aumento de 16 vezes na concentração de antibiótico necessário para inibir o crescimento da cepa 1199B quando comparado com a cepa

padrão. O mesmo acontece quando comparado a concentração de ciprofloxacina necessária para inibir o crescimento da cepa K2068 em relação a cepa 25923.

O Brometo de Etídio é uma substância que serve de substrato para inúmeras bombas de efluxo em cepas de *Staphylococcus aureus*, incluindo NorA e MepA (Patel *et al*., 2010). Esse fato torna o Brometo um agente importante para a detecção de bombas de efluxo em cepas bacterinas (Sepehr; Fereshteh; Shahrokhi, 2022; Rampacci *et al*., 2021), bem como a busca por novas substância capazes de inibir essa forma de resistência (Fujiwara *et al*., 2022; Martin *et al*., 2023).

Desta forma, os resultados com o Brometo de Etídio confirmam, além da mudança fenotípica das cepas em questão, a presença das proteínas de efluxo. Para ambas as cepas, 1199B e K2068, houve um aumento considerável da concentração de Brometo de Etídio necessário para inibir o crescimento bacteriano (14 vezes para S.a 1199B e 16 vezes para S.a K2068).

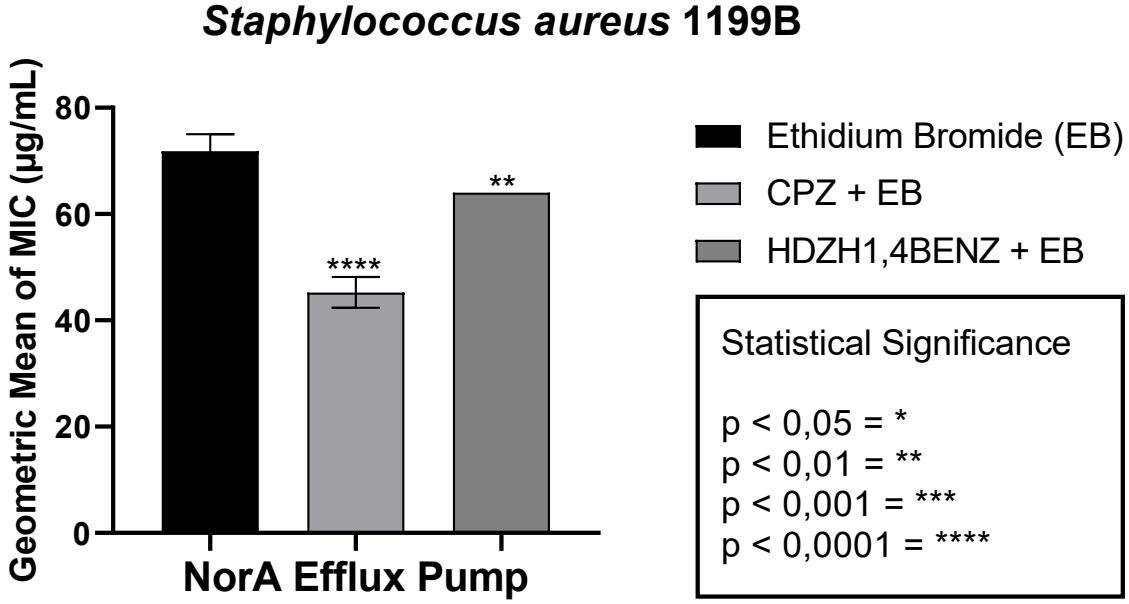
Um estudo envolvendo uma série de 19 hidrazonas mostrou resultados que apenas 3 substâncias apresentaram atividade antibacteriana direta sobre a cepa de *Staphylococcus aureus* 1199B, porém, no teste de efeito adjuvante, 10 substâncias foram capazes de reduzir a CIM da norfloxacina e do Brometo de Etídio, mostrando atividade promissora de inibição de sistema de efluxo nesta cepa. Além do mais, uma das hidrazonas do estudo que tiveram atividade adjuvante sobre a SA 1199B possuía uma cadeia heterocíclica com heteroátomos de oxigênio (Dantas *et al*., 2018), assim como a HDZH1,4BENZ.

Estudo com composto hidrazônico derivado da hidralazina, possuindo ligantes de hidroxila, também não mostrou atividade antibacteriana direta, mas conseguiu inibir a bomba de efluxo na cepa de *S. aureus* 1199B (Campos Lima *et al*., 2024), mesma cepa utilizada neste artigo. Esses achados sugerem que compostos hidrazônicos têm potencial adjuvante em tratamentos sobre cepas portadoras de bombas de efluxo, em detrimento a uma atividade antibacteriana direta. Esse foi o comportamento demonstrado pela HDZH1,4BENZ, uma vez que potencializou o brometo de etídio e os antibióticos para ambas as cepas portadoras de bomba testadas, como pode ser verificado nas figuras que seguem.

Na Figura 4 abaixo, os valores da redução da CIM do Brometo de etídio na presença da clorpromazina (CPZ) evidencia a presença da bomba de efluxo, uma vez que a clorpromazina é um inibidor padrão de proteínas de fluxo (Grimsey *et al*., 2020), provocando o acúmulo de Brometo no interior da bactéria (Amaral *et al*., 2010), reduzindo a concetração do composto necessária para inibir o crescimento bacteriano.

Da mesma forma, a hidrazona HDZH1,4BENZ conseguiu agir sobre o mecanismo de efluxo da cepa testada. Isso pode ser observado pelo decréscimo da Concentração Inibitória Mínima de Brometo de Etídio necessário para inibir o crescimento bacteriano, quando comparamos a associação Hidrazona+Brometo com o controle de Brometo.

Figura 4: Atividade adjuvante da HDZH1,4BENZ, sobre a cepa 1199B, quando associada ao Brometo de Etídio,

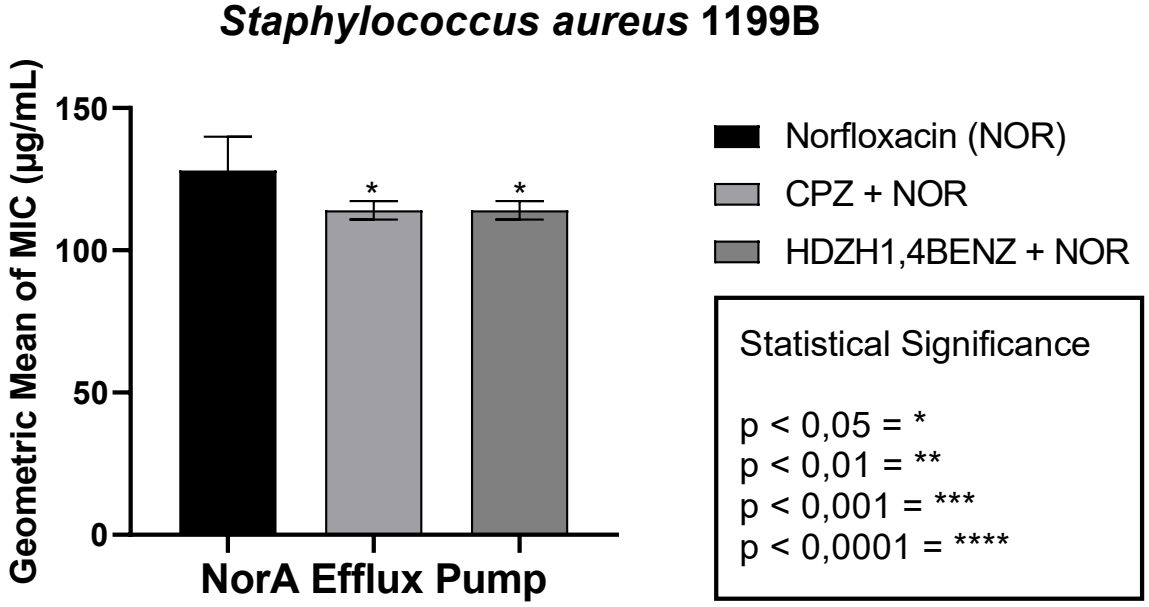


Um dos inibidores padrões de bombas de efluxo mais utilizados em ensaios clínicos é a Cyanide M-Chlorophenyl Hydrazone (CCCP), pertencente ao grupo das hydrazonas e que apresenta efeito reconhecido sobre bombas que promovem resistência à fluoroquinolonas (Jahromy; Ranjbar; Pishkar, 2020) e, desta forma corrobora com a atividade inibitória da HDZH1,4BENZ.

A Hidrazona (E)-4-((2-(phthalazin-1-yl)hydrazineylidene)methyl)benzene-1,3-diol, composto sintetizado a partir da hidralazina, apresentou atividade inibidora da bomba de efluxo NorA, com efeitos sobre a CIM do Brometo de Etídio equiparáveis ao inibidor padrão CCCP, porém menos eficiente do que a Clorpromazina (Campos Lima *et al*., 2024), dando suporte aos achados deste artigo.

Na Figura 5 observamos que o mecanismo de efluxo também está presente na cepa 1199B, desta vez contra o antibiótico norfloxacina. Isso é verificado pelo decréscimo da CIM, quando o antibiótico é associado a CPZ. A CIM da Norfloxacina também é reduzida em comparação ao controle quando associada a Hidrazona HDZH1,4BENZ. Devido as razões explicitadas acima nos estudos de Kaatz *et al*., não podemos concluir que a hidrazona esteja agindo apenas no mecanismo de efluxo, mas há fortes evidências que este seja um dos mecanismos afetados pela concentração subinibitória da hidrazona.

Figura 5: Atividade adjuvante da HDZH1,4BENZ, sobre a cepa 1199B, quando associada a Norfloxacina.



Análogos de hidrazonas contendo fragmentos de E-chalconas apresentaram atividade antibacteriana em investigações *In vitro* e *In silico*, relacionada a interações com a enzima DNA-Girase (Dammene Debbih *et al*., 2024). A DNA girase é uma enzima do tipo Topoisomerase II, mesmo tipo de enzima da Topoisomerase IV, ambas associadas à duplicação do DNA, diferindo entre si pela sequência genética, embora que os genes responsáveis pelas suas codificações sejam homólogos (Levine; Hiasa; Marians, 1998).

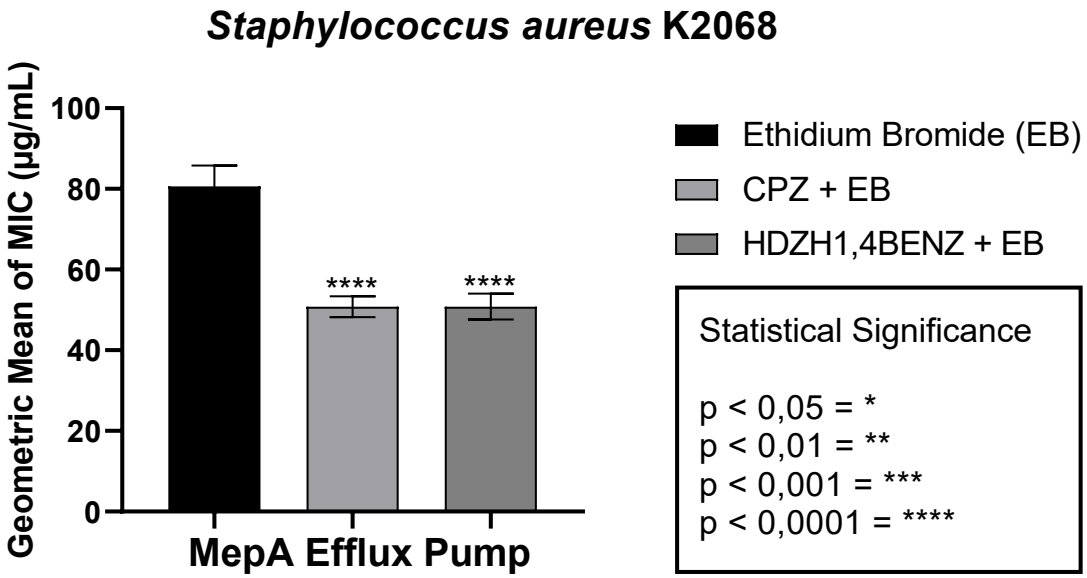
As fluoroquinolonas podem interagir tanto com a topoisomerase IV quanto com a girase, seja no sítio ativo de clivagem do DNA, seja em um sítio alostérico, fora do sítio ativo, impedindo a duplicação do DNA bacteriano. Novos inibidores da topoisomerase contendo nitrogênio básico podem não se ligar no mesmo sítio das fluoroquinolonas, embora resultados preliminares apontem no sentido que os sítios não possam ser ocupados ao mesmo tempo (Collins; Osheroff, 2024).

Seguindo a premissa de que a hidrazona poderia interagir através do nitrogênio com um sítio diferente da Norfloxacina, mas esta não iria conseguir se ligar ao sítio de inibição da girase/topoisomerase, o efeito apresentado pela HDZH1,4BENZ provavelmente se dá pela interação com as bombas de efluxo, inibindo seu funcionamento e permitindo que o antibiótico permaneça no citoplasma bacteriano a fim de interagir com os alvos intracelulares.

Essa falta de interação com o segundo mecanismo de resistência explicaria a menor potencialização do efeito da Norfloxacina pela hidrazona quando comparado ao efeito potencializador promovido pela mesma ao interagir com o Brometo, já que aqui teríamos dois mecanismos de

resistência conhecido ao antibiótico (agindo em apenas um), em contraposição de um mecanismo conhecido contra o Brometo de Etídio. Quanto à cepa K2068, os dados apresentados na Figura 6 também confirmam a presença de bomba de efluxo, uma vez que a associação do Brometo de Etídio com a clorpromazina reduziu a CIM do Brometo quando comparado com o controle.

Figura 6: Atividade adjuvante da HDZH1,4BENZ, sobre a cepa K2068, quando associada ao Brometo de Etídio,



A HDZH1,4BENZ também potencializou o Brometo de Etídio, reduzindo sua CIM em relação ao controle (Figura 6). A Ação da hidrazona, nesta cepa, equiparou-se a ação do Inibidor Padrão de Bomba de Exfluxo (IPBE) clorpromazin, reduzindo a CIM do Brometo de 80,63 µg/mL para 50,8 µg/mL. Em estudo de Campos *et al*., (2024), uma hidrazona derivada da hidralazina, apesar de ter conseguido inibir a bomba de efluxo da cepa NorA (estudo já reportado anteriormente), não conseguiu inibir a bomba de efluxo MepA, presente na cepa K2068.

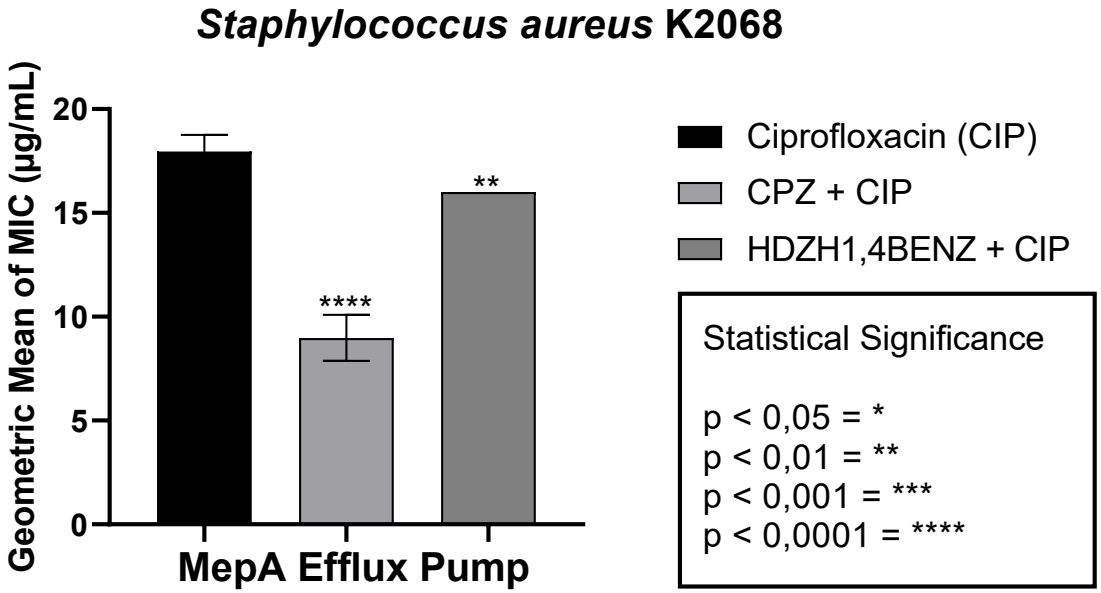
Analisando as estruturas das duas hidrazonas, é notado uma similaridade na estrutura dos dois compostos, com o ligante associado ao grupo NH-R igual ao composto deste artigo, mas diferindo no ligante do grupo N=C-R. Enquanto a hidrazona do estudo de Campos Lima *et al*., (2024) apresenta uma cadeia cíclica de carbono associada a hidroxilas nas posições 1 e 3, a HDZH1,4BENZ apresenta uma cadeia cíclica de carbono associada a uma cadeia heterocíclica com átomos de carbono. Esta diferença na estrutura pode ser responsável pela diferença de atividades das duas hidrazonas.

Estudos com derivado de 2-fenilquinolina demonstrou que o composto com cadeia lateral heterocíclica com heteroátomo de Oxigênio foi capaz de inibir o efluxo de Brometo de Etídio em

cerca de 86% quando comparado com o controle de reserpina, em cepas que expressam proteínas de efluxo (Sabatini *et al*., 2013).

Em estudos com chalconas, a presença de átomos de oxigênio em cadeias heterocíclicas permitiu modular sinergicamente o Brometo de etídio e a ciprofloxacina em cepas de *Staphylococcus aureus* K2068 (Xavier *et al*., 2021), com efeitos semelhantes ao inibidor padrão quando associadas ao brometo e com uma relativa diminuição do efeito potencializador quando associadas aos antibióticos (Silva *et al*., 2021). Esses resultados corroboram com os achados neste artigo. Como demonstrado na figura 7 abaixo, a HDZH1,4BENZ potencializou o antibiótico Ciprofloxacina, mas em uma proporção menor do que quando associada ao Brometo de Etídio.

Figura 7: Atividade adjuvante da HDZH1,4BENZ, sobre a cepa K2068, quando associada a Ciprofloxacina,



Efeito similar foi encontrado em estudo com a hidralazina, composto utilizado na síntese da hidrazona HDZH1,4BENZ. No referido estudo, a Hidralazina foi capaz de potencializar o antibiótico ciprofloxacina contra a cepa K2068. Além disso, a Hidralazina agiu no mecanismo de bomba de efluxo da K2068, na associação com o Brometo de Etídio, apresentando efeito equiparado à clorpromazina (Bento *et al*., 2024). A similaridade dos resultados aponta para uma provável interação da porção hidralazina da hidrazona HDZH1,4BENZ com as proteínas de efluxo NorA e MepA.

Em outro estudo com a hidralazina, esta mostrou-se capaz de interagir com a enzima DNA-Girase e com alvos moleculares diversos, além de causar danos à membrana e fragmentação do DNA (Nascimento *et al*., 2024). Apesar da interação da hidralazina com a DNA girasse, o menor efeito da

hidrazona quando associada aos antibióticos pode ser explicada pelas interações alostéricas já explicitadas anteriormente.

Acoplamento molecular contra MepA

O estudo comparativo envolvendo os compostos clássicos CCCP (carbonil-m-clorofenil-hidrazona) e EtBr (brometo de etídio), o medicamento comercial CPZ (clorpromazina) e o composto investigado hidrazona permitiu a avaliação de sua capacidade de interação molecular com o transportador de efluxo MepA, um mediador chave da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus aureus*. As energias de afinidade de ligação derivadas do acoplamento molecular mostraram que a hidrazona exibiu afinidade superior (−8,1 kcal/mol) em comparação com os outros ligantes, superando EtBr (−7,9 kcal/mol), CCCP (−6,0 kcal/mol) e CPZ (−5,8 kcal/mol) (Tabela 2).

A validação do protocolo de simulação independente foi avaliada por meio dos valores de desvio quadrático médio (RMSD) obtidos para os ligantes testados, todos abaixo de 2,0 Å, o que comprova a confiabilidade do método na reprodução das conformações experimentais dos ligantes no sítio ativo. Esses valores (CCCP: 1,870 Å; CPZ: 1,880 Å; EtBr: 1,652 Å; hidrazona: 1,704 Å) indicam precisão adequada no procedimento de (re)docking e confirmam ainda mais a robustez dos parâmetros de simulação adotados. Além disso, a hidrazona ocupa uma posição análoga ao domínio de interação dos substratos CCCP e EtBr, bem como do controle clorpromazina (CPZ) (Fig. 8(A)), sugerindo uma sobreposição espacial relevante para a modulação da atividade da proteína. Consequentemente, a capacidade da hidrazona de se posicionar no mesmo sítio de ligação que os ligantes clássicos e o fármaco comercial sugere que este composto pode atuar como um inibidor competitivo da MepA, bloqueando o canal de extrusão de múltiplos fármacos e impedindo o efluxo ativo de antimicrobianos intracelulares.

Tabela 2. Dados sobre as interações ligante-receptor (L-R) no processo de redocking do agonista CPZ, dos substratos clássicos CCCP e EtBr, e simulações de docking molecular da hidrazona, via receptor da bomba de efluxo MepA.

Composto	EA (kcal/mol)	RMSD (Å)	Tipo de interação	Resíduos/distâncias (Å)
CCCP	-6.0	1.870	Hidrofóbico	Met33 (2.38), Tyr36 (3.82), Tyr36 (4.25), Phe154 (4.50), Pro176 (3.52), Pro176 (4.12),Ala177(4.39),Asn180 (4.62), Thr202 (3.62)

			Ligação de hidrogênio	Tyr139 (3.73)
CPZ	-5.8	1.880	Hidrofóbico	Met33 (1.44), Phe60 (4.05), Met63 (4.09), Tyr139 (4.68), Pro176 (5.00), Thr202 (4.57), Gln206 (4.01)
			Empilhamento π	Phe154 (5.10)
EtBr	-7.9	1.652	Hidrofóbico	Met 33 (3.61), Met 33 (0.77), Tyr 36 (3.96), Asn37 (4.59), Phe60 (3.65), Phe154 (3.83), Pro176 (3.94), Pro176 (3.36), Thr202 (4.77), Gln206 (4.41)
			Ligação de hidrogênio	Met33 (3.09)
Hidrazona	-8.1	1.704	Hidrofóbico	Met33 (0.69), Tyr 36 (4.17), Phel54 (3.86), Phe154 (4.98), Phe154 (3.73), Asn157 (3.98), Ans158 (4.37), Pro176 (3.92), Pro176 (4.93), Thr202 (3.66),
			Ligação de hidrogênio	Asn37 (4.43)

Observações: CCCP: cianeto de carbonil-m-clorofenil-hidrazona. CPZ:Clorpromazina. EtBr: brometo de etídio.

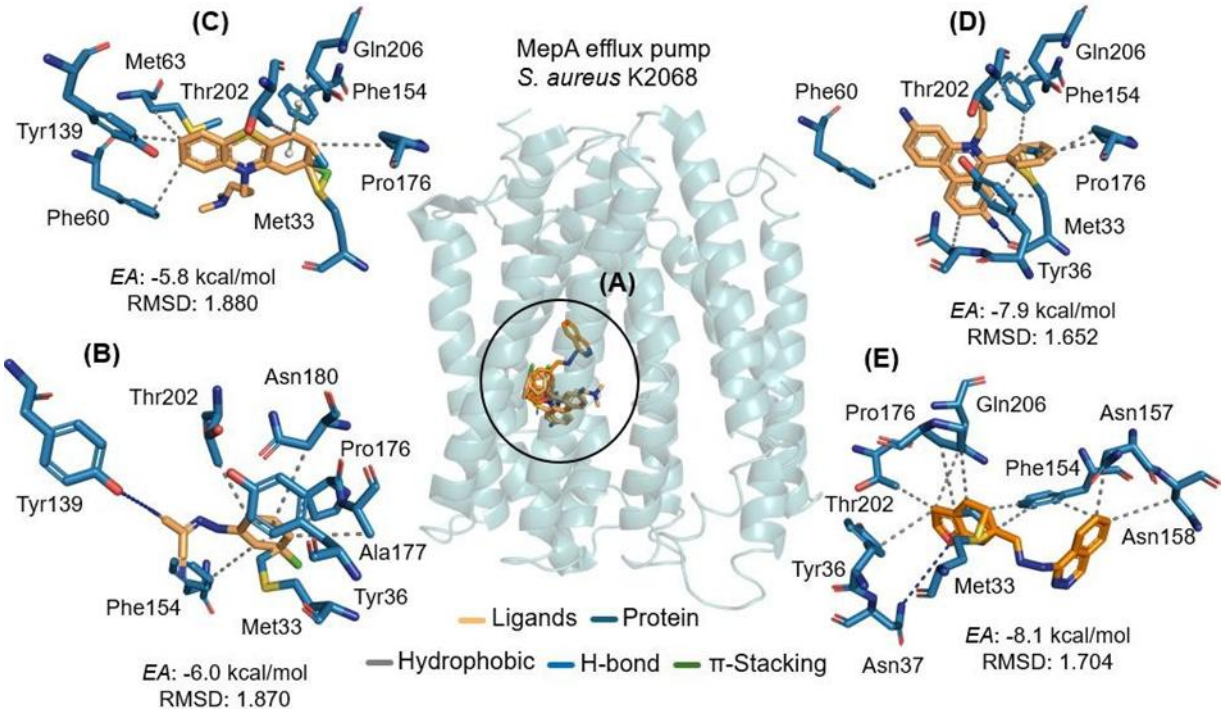


Figura 8 (A) Visualização tridimensional da ancoragem do ligante na bomba de efluxo MepA, cepa S. aureus K2068, e visualização tridimensional das interações ligante-receptor entre resíduos de aminoácidos (cor azul) da bomba de efluxo MepA para os ligantes (cor nude) **(B)** CCCP, **(C)** CPZ, **(D)** EtBr e **(E)** hidrazona (laranja).

Caracterização das Interações Moleculares com MepA

A caracterização das interações moleculares entre os ligantes avaliados (CCCP, CPZ, EtBr e hidrazona) e os resíduos que constituem o sítio de ligação da proteína MepA revelou um padrão conservado de contatos hidrofóbicos, interações de ligação de hidrogênio e, no caso do CPZ, interações de empilhamento π, todos os quais contribuem para a estabilidade do complexo e para o perfil de afinidade observado.

Para o substrato clássico CCCP, as interações predominantes foram hidrofóbicas, envolvendo os resíduos Met33 (2,38 Å), Tyr36 (3,82 Å e 4,25 Å), Phe154 (4,50 Å), Pro176 (3,52 Å e 4,12 Å), Ala177 (4,39 Å), Asn180 (4,62 Å) e Thr202 (3,62 Å), que proporcionam um ambiente apolar favorável para a acomodação do ligante. Além disso, a presença de uma ligação de hidrogênio com o resíduo Tyr139 (3,73 Å) contribui para a especificidade e estabilização do ligante dentro do sítio ativo (Fig. 8(B) e Tabela 2).

O medicamento comercial CPZ estabelece uma rede de interações hidrofóbicas com Met33 (1,44 Å), Phe60 (4,05 Å), Met63 (4,09 Å), Tyr139 (4,68 Å), Pro176 (5,00 Å), Thr202 (4,57 Å) e Gln206 (4,01 Å). Além disso, uma interação de empilhamento π com Phe154 (5,10 Å), característica de anéis aromáticos, reforça a estabilidade do complexo por meio do empilhamento de anéis

aromáticos entre o ligante e o resíduo da proteína, desempenhando um papel crucial na afinidade do CPZ por MepA (Fig. 8(C) e Tabela 2).

O composto EtBr exibiu múltiplas interações hidrofóbicas, notavelmente com Met33 (3,61 Å e 0,77 Å), Tyr36 (3,96 Å), Asn37 (4,59 Å), Phe60 (3,65 Å), Phe154 (3,83 Å), Pro176 (3,94 Å e 3,36 Å), Thr202 (4,77 Å) e Gln206 (4,41 Å). Além disso, EtBr formou uma ligação de hidrogênio com Met33 (3,09 Å), o que pode contribuir para a estabilização do ligante dentro do sítio de ligação (Fig. 8(D) e Tabela 2).

A molécula de hidrazona investigada exibiu um perfil de interação predominantemente hidrofóbico envolvendo Met33 (0,69 Å), Tyr36 (4,17 Å), múltiplas interações com Phe154 (3,86 Å, 4,98 Å e 3,73 Å), Asn157 (3,98 Å), Asn158 (4,37 Å), Pro176 (3,92 Å e 4,93 Å), Thr202 (3,66 Å) e Gln206 (4,96 Å). Notavelmente, a hidrazona também formou uma ligação de hidrogênio com Asn37 (4,43 Å), conferindo maior especificidade e estabilidade à interação. O contato hidrofóbico extremamente próximo a 0,69 Å com Met33 indica um encaixe altamente favorável, provavelmente refletindo uma complementaridade estérica e química aprimorada entre o ligante e o sítio ativo (Fig. 8(E) e Tabela 2).

O envolvimento recorrente de resíduos como Met33, Phe154, Pro176, Thr202 e Gln206 em interações com todos os ligantes analisados sugere que esses aminoácidos constituem parte do núcleo funcional do bolso de ligação. Met33, em particular, aparece em todos os perfis de interação, indicando seu papel fundamental no reconhecimento inicial do ligante. Phe154 contribui por meio de interações hidrofóbicas e de empilhamento π, que são especialmente importantes para compostos aromáticos como CPZ e hidrazona. Em geral, a análise do padrão de interação sugere que a afinidade superior da hidrazona observada nos cálculos energéticos está associada à sua capacidade de estabelecer múltiplas interações hidrofóbicas em combinação com ligações de hidrogênio estratégicas, que aumentam a estabilidade do complexo e inibem efetivamente a função do transportador de efluxo MepA.

Docking molecular contra NorA

Simulações de docking molecular com NorA (S. aureus 1199B) revelaram um desempenho notável da molécula de hidrazona investigada, que apresentou uma energia de ligação de −7,4 kcal/mol. Esse valor foi mais favorável do que os obtidos para o fármaco comercial CPZ (−5,2 kcal/mol) e CCCP (−6,8 kcal/mol), ambos usados como controles positivos, destacando o potencial superior da hidrazona como moduladora da atividade do transportador. Apenas o corante EtBr apresentou uma energia de ligação mais negativa (−7,8 kcal/mol), embora com características de ligação distintas (Tabela 3).

A eficácia do protocolo de simulação independente foi comprovada pelos valores de RMSD obtidos nas simulações de acoplamento, todos os quais permaneceram abaixo do limite crítico de 2,0 Å (hidrazona: 1,304 Å; CCCP: 1,313 Å; CPZ: 1,929 Å; EtBr: 1,944 Å). Esses resultados confirmam tanto a precisão quanto a consistência do modelo computacional na previsão das conformações de ligação do ligante (Tabela 3).

Do ponto de vista estrutural, observou-se que o composto hidrazona compartilha o mesmo sítio de ligação que CCCP e CPZ, sugerindo um mecanismo de inibição competitiva que pode ser mais eficaz devido à sua afinidade significativa (Fig. 9(A)). Em contraste, o EtBr foi posicionado em um sítio adjacente, o que pode refletir uma preferência estérica e eletrônica distinta, consistente com seu perfil altamente polarizável e planaridade química (Fig. 9(A)).

Tabela 3. Dados sobre as interações ligante-receptor (L-R) no processo de redocking do agonista CPZ, dos substratos clássicos CCCP e EtBr, e simulações de docking molecular da hidrazona, via receptor da bomba de efluxo NorA

Composto	EA (kcal/mol)	RMSD (Å)	Tipo de interação	Resíduos/distâncias (Å)
CCCP	-6.8	1.313	Hidrofóbico	Val44 (3.65), Phe47 (3.49), Ala48(3.96), Asn340 (3.94), Phe341 (4.51), Phe341 (3.56)
			Ligação de hidrogênio	Gln51 (2.32), Arg 310 (3.94), Thr 336 (2.19), Asn340 (2.39)
CPZ	-5.2	1.929	Hidrofóbico	Phe16 (4.43), Phe16 (4.96), Val44 (3.66), Phe47 (4.61), Phe47 (3.90), Ala48 (4.67), Asn340 (4.73)
			Hidrofóbico	Phe140 (4.90), Phe340 (3.61), Ile141 (4.30), Prol44 (3.80), Glu222 (3.92), Tyr225 (3.75), Tyr225 (4.04), Ile240 (4.12), Ile244 (3.55), Ile244 (3.66), Phe303 (4.63), Phe303 (4.80)

EtBr	-7.8	1.944	Ligação de hidrogênio	Ser226 (3.30), Asp307 (3.24)
			Empilhamento π	Phe303 (4.83)
Hidrazona	-7.4	1.304	Hidrofóbico	Phe16 (3.55), Phe16 (3.96), Ile19 (3.64), Val44 (3.79), Val44 (3.63), Phe47 (3.93), Thr336 (4.63), Asn340 (3.61)
			Ligação de hidrogênio	Arg98 (2.50), Arg98 (4.42), Thr336 (2.54), Asn340 (2.48), Asn340 (4.23)

Notas: CCCP: cianeto de carbonil-m-clorofenil-hidrazona. CPZ: clorpromazina. EtBr: brometo de etídio.

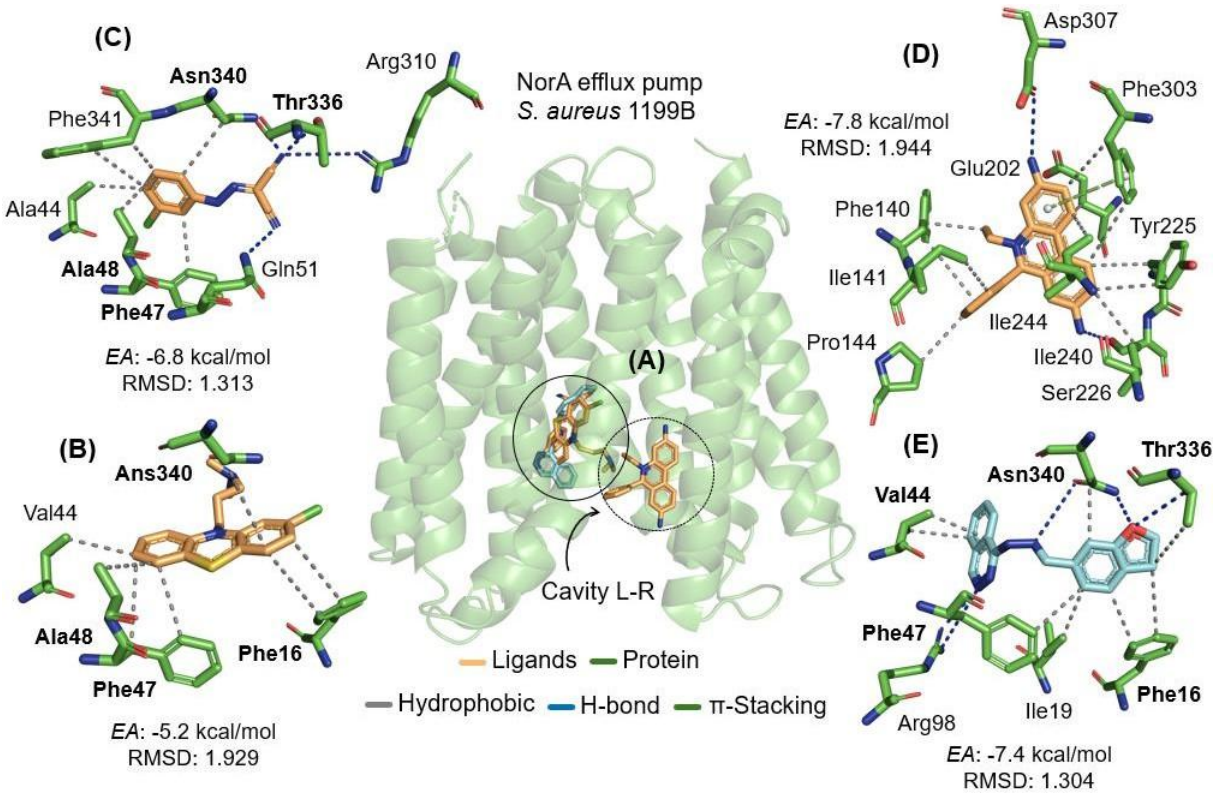


Figura 9. (A) Visualização tridimensional da ancoragem do ligante na bomba de efluxo NorA, cepa S. aureus 1199B, e visualização tridimensional das interações ligante-receptor entre resíduos de aminoácidos (cor azul) da bomba de efluxo NorA para os ligantes (cor nude) **(B)** CCCP, **(C)** CPZ, **(D)** EtBr e **(E)** hidrazona.

Análise de sítio de ligação alternativo e interação com NorA

Essa localização alternativa pode estar associada a um sítio de ligação secundário ou a regiões mais acessíveis da proteína que não estão necessariamente envolvidas no bloqueio direto da função de efluxo. Nesse contexto, a ocupação do sítio funcional principal pela hidrazona, combinada com sua energia de ligação mais favorável em comparação com CPZ e CCCP, destaca seu potencial como um inibidor seletivo e eficaz de NorA.

A análise das interações entre os ligantes CCCP, CPZ, EtBr e hidrazona com a proteína NorA (S. aureus 1199B) revelou perfis de interação distintos, refletindo as características estruturais e funcionais de cada composto. O CCCP, um substrato clássico para transportadores como NorA, exibiu fortes interações com resíduos hidrofóbicos e polares. Interagiu predominantemente com Val44, Phe47 e Phe341, que são resíduos hidrofóbicos, sugerindo uma inserção eficiente no interior do sítio de ligação, onde a estabilização é fornecida pela natureza apolar dessas interações (Tabela 3 e Fig. 9(C)).

Além disso, o CCCP formou ligações de hidrogênio com Gln51, Arg310, Thr336 e Asn340, indicando que, embora sua interação seja principalmente hidrofóbica, o ligante também se beneficia de interações polares que contribuem para a estabilização adicional do complexo. Esse padrão de interação destaca a importância de Asn340 e Thr336 como potenciais pontos críticos na formação do complexo, uma vez que esses resíduos são frequentemente observados entre diferentes ligantes (Tabela 3 e Fig. 9(C)).

Em contraste, o CPZ (clorpromazina) interagiu com resíduos hidrofóbicos como Phe16, Val44 e Phe47 de maneira semelhante ao CCCP, mas sua interação geral com a proteína foi menos robusta. O CPZ foi caracterizado por um menor número de ligações de hidrogênio, particularmente com Gln51 e Thr336, sugerindo que, embora o ligante compartilhe algumas interações importantes com o CCCP, sua afinidade pelo sítio ativo de NorA parece mais superficial (Tabela 3 e Fig. 9(B)). A estabilidade potencialmente reduzida dessa interação pode ser explicada pela ausência de interações adicionais com resíduos polares, como Arg310 e Asn340, que são observadas para o CCCP, mas não para o CPZ. Esse perfil sugere que a estrutura do CPZ pode ser menos otimizada para interação com NorA do que o CCCP, embora ainda seja capaz de se ligar significativamente ao sítio (Tabela 3 e Fig. 9(B)).

O brometo de etídio (EtBr) apresentou um comportamento de ligação adjacente devido ao seu posicionamento em relação ao sítio de ligação observado para os outros ligantes. O EtBr interagiu fortemente com resíduos como Phe140, Phe340 e Ile141, que estão localizados perto do sítio de ligação principal, mas fora de seu núcleo central. Essa disposição adjacente sugere um modo de interação distinto (Tabela 3 e Fig. 9(D)). Além das interações hidrofóbicas, o EtBr formou ligações de hidrogênio com Ser226 e Asp307 e participou de interações de empilhamento π com Phe303,

caracterizando um perfil de interação mais específico e diferenciado. Esse comportamento pode refletir seu papel como substrato que, além dos contatos hidrofóbicos, depende de interações aromáticas para estabilização dentro da região de ligação (Tabela 3 e Fig. 9(D)).

Além disso, a hidrazona exibiu características de interação semelhantes às do CCCP e do CPZ, mas com afinidade superior, conforme observado nos resultados de acoplamento molecular. A hidrazona interagiu com Phe16, Val44, Phe47 e Thr336, resíduos hidrofóbicos essenciais para a estabilização da interação, enquanto se diferenciou por formar ligações de hidrogênio com Arg98, Thr336 e Asn340, que são cruciais para a estabilização da proteína e a formação do sítio de ligação (Tabela 3 e Fig. 9(E)). Essas interações adicionais sugerem que a hidrazona não apenas se encaixa bem no sítio de ligação, mas também estabelece interações mais estáveis, comparáveis ou até mesmo superiores às de compostos comerciais como CCCP e CPZ (Tabela 3 e Fig. 9(E)). Ademais, a presença recorrente de Asn340 nas interações com todos os ligantes, incluindo hidrazona, CCCP e CPZ, reforça seu papel no mecanismo de ação e indica sua potencial importância como resíduo alvo para inibidores eficazes de NorA.

Avaliação das Propriedades Físico-Químicas e do Perfil de Biodisponibilidade

Os parâmetros físico-químicos e o perfil de biodisponibilidade da hidrazona estão resumidos na Tabela 4 e ilustrados no radar de biodisponibilidade mostrado na Figura 10(B). O peso molecular (PM) de 290,32 g/mol e a área de superfície polar topológica (TSPA) de 59,32 Å² indicam que o composto apresenta polaridade adequada, favorecendo a permeabilidade celular. A lipofilicidade estimada, determinada por algoritmos de partição, apresentou valores de logP de 3,53 (ChemAxon) e 2,82 (método de Crippen), que estão de acordo com a regra dos cinco de Lipinski e os critérios de Veber, corroborando uma biodisponibilidade oral favorável.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas e perfil de semelhança a fármacos da hidrazona.

Propriedade físico-química	Valor	Fonte
Peso molecular	290,32	CheAxon
LogP	3,07	CheAxon
WlogP	2,82	Método de Wildman
Aceitadores de ligações de hidrogênio	4,0	CheAxon
Doadores de ligações de hidrogênio	1,0	CheAxon
Ligações rotativas	3,0	CheAxon

Área de superfície polar topológica	59,32		CheAxon
pKa (centro mais básico)		5,83	CheAxon
logD em pH 6,4		3,07	CheAxon
logD em pH 7,4		3,07	CheAxon
LogS	-5,14		CheAxon
Regra dos cinco	Aceito		Método de Lipinski
Regra GSK	Aceito		Método de Veber
Pontuação MPO do SNC (Pfizer)	5,21		CheAxon

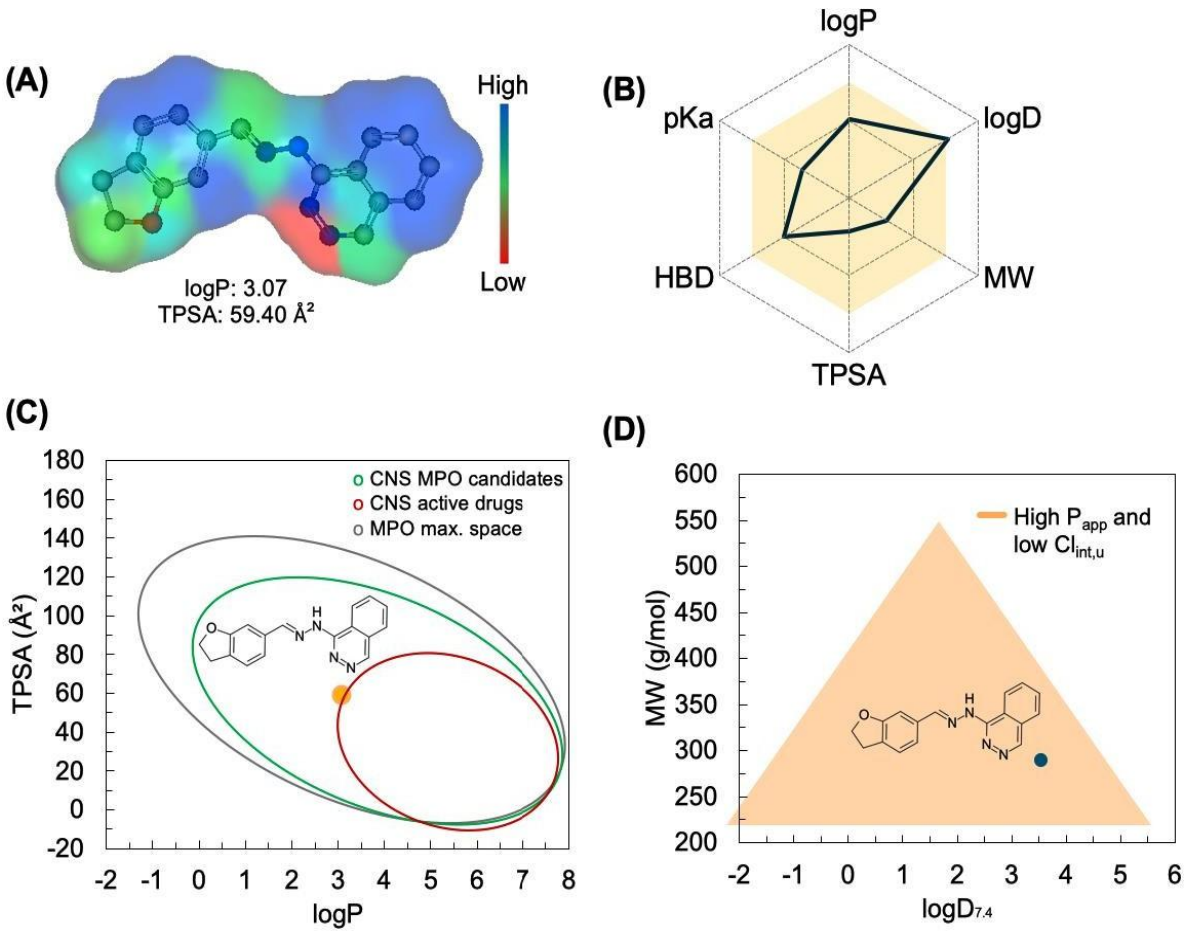


Figura 10. (A) Mapa de superfície do potencial de lipofilicidade molecular (MLP) da base conjugada à hidrazona (logD7,4), **(B)** radar de otimização multiparamétrica (MPO) que expressa o grau de desejabilidade ADME. O espectro MPO foi especificamente analisado alinhando **(C)** TPSA e logP para estimar o perfil de permeabilidade no SNC. **(D)** MW e logD em pH 7,4 para estimar o perfil de absorção oral e a estabilidade metabólica e por alinhamento.

A semelhança entre os valores de logD e logP, ambos próximos de 3,53, indica que a forma predominante do composto é em grande parte neutra, exibindo um perfil lipofílico-hidrofílico bem equilibrado. Essa característica é favorável à permeabilidade da membrana e à absorção intestinal. Assim, o valor de pKa de 5,83, associado a um grupo amina presente em um dos anéis aromáticos e na cadeia alifática, indica a presença de um centro básico capaz de aumentar a lipofilicidade em condições fisiológicas, conforme ilustrado no gráfico da Figura 10(A) e nos dados apresentados na Tabela 4.

Nesse contexto, a aplicação do índice de Otimização Multiparamétrica do Sistema Nervoso Central (CNS MPO), mostrado na Figura 10(C), resultou em uma pontuação de 5,21, indicando que o composto atende aos critérios de semelhança a fármacos e pode apresentar atributos desejáveis, como alta permeabilidade passiva (Papp), baixo efluxo mediado pela glicoproteína P (P-gp) e depuração metabólica reduzida (Yee, 1997). Além disso, como ilustrado na Figura 10(D), a hidrazona, com base em seus critérios de semelhança a fármacos, é classificada no quadrante de compostos com ação central no conjunto de dados de referência da Pfizer.

Propriedades Farmacocinéticas Previstas

Considerando sua neutralidade em condições fisiológicas e conformidade com os limites estabelecidos pela regra dos cinco de Lipinski (PM ≤ 500, logP ≤ 5, HBA ≤ 10, HBD ≤ 5), a hidrazona apresenta baixa probabilidade de ser transportada pela glicoproteína P (P-gp), resultando em alta absorção intestinal humana prevista (HIA = 95,84%) (Daina, Michielin & Zoete, 2017) (Tabela 5). Portanto, com base em suas propriedades físico-químicas e biodisponibilidade prevista, o composto apresenta uma probabilidade estimada de 55% de atingir pelo menos 10% de absorção oral em modelos de ratos, que são comumente utilizados como preditores do comportamento farmacocinético humano.

Tabela 5. Farmacocinética pelos modelos ADME dos servidores web SwissADME e preADMET

Perfil ADME	PreADMET	SwissADME
F>10% (Biodisponibilidade)	Não relatado	0,55
Inibidor de P-gp	Não	Não relatado
Substrato de P-gp	Não relatado	Não
HIA (Absorção intestinal humana)	95,84%	Alta
PPB (Ligação a proteínas plasmáticas)	92,78%	Não relatado

BBB (Barreira hematoencefálica)	8,27x10-2 cm/s (Papp)*	+++
Substrato de CYP3A4	Sim	Não relatado
Substrato de CYP2D6	Não	Não relatado
Inibidor de CYP3A4	Não	Não
Inibidor de CYP2D6	Não	Não
Inibidor de CYP2C9	Sim	Sim
Inibidor de CYP2C19	Sim	Não

Nota: A penetração do servidor PreADMET na barreira hematoencefálica (BHE) foi estimada pelo modelo de permeabilidade passiva in vitro (Papp) da linhagem celular Madin-Darby Canine Kidney (MDCK).

A ligação estimada às proteínas plasmáticas (PPB = 92,78%) indica que o composto provavelmente se distribuirá amplamente entre o plasma e vários tecidos, aumentando assim a probabilidade de atingir o sistema nervoso central. De forma consistente, o índice de permeabilidade aparente calculado (Papp = 8,27 × 10^{-2} cm/s) no modelo in vitro de células renais caninas de Madin-Darby (MDCK), obtido usando o PreADMET, sugere permeabilidade moderada através da barreira hematoencefálica (BHE), conforme corroborado pelo modelo BOILED-Egg do SwissADME (Tabela 6).

A análise do metabolismo do HDZHBEZTIOF pelas isoformas do citocromo P450 (CYP450) indica uma baixa propensão ao metabolismo pelo CYP2D6, sugerindo uma taxa de depuração reduzida e uma meia-vida plasmática prolongada. No entanto, o composto apresentou probabilidade de metabolismo via CYP3A4, o que pode estar associado a diferenças na permeabilidade aparente, uma vez que o metabolismo por essa isoforma pode limitar a permeabilidade efetiva. Em paralelo, o HDZHBEZTIOF demonstra um forte potencial para inibir as isoformas CYP2C19 e CYP2C9, o que pode resultar em aumento das concentrações plasmáticas de medicamentos coadministrados que dependem dessas enzimas para biotransformação (Tabela 6).

Efeitos Toxicológicos

A avaliação toxicológica da hidrazona utilizando as plataformas PreADMET, ProTox-3.0 e GUSAR Online sugere que o composto apresenta baixa hepatotoxicidade; no entanto, a presença de um fragmento de anilina indica um potencial risco mutagênico. Além disso, as previsões de dose letal obtidas a partir do ProTox-3.0 (DL_{50} = 350 mg/kg) e do GUSAR Online (DL_{50} = 752,5 mg/kg) indicam que efeitos adversos significativos podem ocorrer em doses subletais, apontando para um risco tóxico moderado em condições de exposição fisiológica (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros de toxicidade e dose letal oral (DL50) pela previsão consensual das ferramentas online PreADMET e ProTox-II.

Propriedades tóxicas	PreADMET	PreADMET	GusarOnline
DILI	Não relatado	- (0,53%)	Não relatado
AMES Mutagênico	Mutagênico	+ (0,60)	Não relatado
Inibidor de hERG	Risco médio	Não relatado	Não relatado
LD50	Negativo	1557 mg/kg (classe 4)	752,500 mg/kg (classe 4)

CONCLUSÃO

A hidrazona não exibiu atividade antibacteriana intrínseca contra cepas de *Staphylococcus aureus* que expressam as bombas de efluxo NorA e MepA. No entanto, interagiu com as bombas de efluxo NorA e MepA das cepas S. aureus 1199B e S. aureus K2068, potencializando o efeito do brometo de etídio. Além disso, o HDZH1,4BENZ aumentou a atividade dos antibióticos norfloxacina e ciprofloxacina contra as cepas testadas. Uma provável interação com a DNA girase na cepa 1199B, bem como mecanismos secundários na cepa K2068, não favoreceram a potencialização dos antibióticos, sendo a inibição da bomba de efluxo o mecanismo primário mais provável envolvido. Heteroátomos de oxigênio podem estar envolvidos na inibição das proteínas de efluxo na cepa S. aureus 1199B. Estudos *in silico*, incluindo docking molecular e predições farmacocinéticas, corroboraram os achados experimentais ao demonstrar alta seletividade do composto pelas proteínas NorA e MepA, com valores de ligação energeticamente e estatisticamente relevantes quando comparado com substratos clássicos e clorpromazina. Concordando com esses achados, a investigação das propriedades farmacocinéticas demonstrou alto grau de similaridade com medicamentos ativos por via oral, com volume de distribuição satisfatório e risco moderado de toxicidade por ingestão.

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 pelas bolsas de estudo. Os autores agradecem também ao Centro Nordeste 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 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 Pós-Graduação Desenvolvimento – Apoio ao Desenvolvimento do

Semiárido Brasileiro, Universidade Regional do Cariri. Emmanuel Silva Marinho agradece o apoio financeiro da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP (Grant#: FPD-0213-00369.01.00/23) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ-PQ [Grant#: 309349/2025-7].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd Algaffar, S. O., et al. (2021). Development and validation of an in vitro resazurin- based susceptibility assay against Madurella mycetomatis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 65(3), e01338-20. https://doi.org/10.1128/AAC.01338-20

Abd El-Aleam, R. H., et al. (2021). Bacterial virulence factors: A target for heterocyclic compounds to combat bacterial resistance. RSC Advances, 11(58), 36459–36482. https://doi.org/10.1039/D1RA06124K

Aly, S. A., & Fathalla, S. K. (2020). Preparation and characterization of some transition metal complexes of hydrazone derivatives and their antibacterial and antioxidant activities. Arabian Journal of Chemistry, 13(2), 3735–3750. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.11.004

Amaral, L., et al. (2010). Phenothiazines, bacterial efflux pumps and targeting the macrophage for enhanced killing of intracellular XDR-TB. In Vivo, 24(4), 409–424.

Aydin, M., et al. (2023). In vitro antifungal and antibiofilm activities of novel sulfonyl hydrazone derivatives against Candida spp. Journal of Medical Mycology, 33(1), 101327. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2023.101327

Bento, A. J. M., et al. (2024). Quantum-chemical calculation, antibiotic potentiating activity, evaluation of efflux pump inhibition against S. aureus multi-resistant strains and molecular docking of isoniazid and hydralazine. Journal of Molecular Structure, 138474. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.138474

Brawley, D. N., et al. (2022). Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from *Staphylococcus aureus*. Nature Chemical Biology, 18(7), 706–712. https://doi.org/10.1038/s41589-022-00994-9

Betancourth, J. G., et al. (2022). Versatility of the amino group in hydrazone-based molecular and supramolecular systems. European Journal of Organic Chemistry, 2022(28), e202200228. https://doi.org/10.1002/ejoc.202200228

Campos Lima, I. K., et al. (2024). Structural characterization, DFT calculations, ADMET studies, antibiotic potentiating activity, and efflux pump inhibition of a hydrazone derivative of hydralazine. SSRN. https://doi.org/10.2139/ssrn.4775685

Coley, C. W., et al. (2019). A robotic platform for flow synthesis of organic compounds informed by AI planning. Science, 365(6453), eaax1566. https://doi.org/10.1126/science.aax1566

Collins, J. A., & Osheroff, N. (2024). Gyrase and topoisomerase IV: Recycling old targets for new antibacterials. ACS Infectious Diseases, 10(4), 1097–1115. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00562

Coutinho, H. D. M., et al. (2008). In vitro anti-staphylococcal activity of Hyptis martiusii

against MRSA strains. Revista Brasileira de Farmacognosia, 18, 670–675.

Dammene Debbih, O., et al. (2024). Hydrazone analogs as DNA gyrase inhibitors and antioxidant agents: Structure–activity relationship and pharmacophore modeling. Journal of Chemical Sciences, 136(2), 1–19.

Dantas, N., et al. (2018). Aminoguanidine hydrazones as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. Chemico-Biological Interactions, 280, 8–14. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.006

Dha Nda, G., Acharya, Y., & Haldar, J. (2023). Antibiotic adjuvants: A versatile approach to combat antibiotic resistance. ACS Omega, 8(12), 10757–10783. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07342

Da Fonseca, A. M., Caluaco, B. J., Madureira, J. M. C., Cabongo, S. Q., Gaieta, E. M., Djata, F., ... & Marinho, E. S. (2024). Screening of potential inhibitors targeting the main protease structure of SARS-CoV-2 via molecular docking, and approach with molecular dynamics, RMSD, RMSF, H-bond, SASA and MMGBSA. Molecular Biotechnology, 66(8), 1919-1933. https://doi.org/10.1007/s12033-023-00831-x

Da Rocha, M. N., Marinho, E. S., Marinho, M. M., & Dos Santos, H. S. (2022). Virtual screening in pharmacokinetics, bioactivity, and toxicity of the amburana cearensis secondary metabolites. Biointerface Res Appl Chem, 12(6), 8471-8491. https://doi.org/10.33263/BRIAC126.84718491

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. https://doi.org/10.1038/srep42717

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. https://doi.org/10.1016/j.genrep.2025.102162

Dos Santos Barbosa, C. R., 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. https://doi.org/10.1016/j.abb.2023.109782

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. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6952-4_20

Freitas, T. S., et al. (2021). UPLC-QTOF-MS/MS analysis and antibacterial activity of Manilkara zapota (L.) P. Royen against Escherichia coli and other MDR bacteria. Cellular and Molecular Biology, 67(1), 116–124.

Fujiwara, M., et al. (2022). Evaluation of efflux pump inhibitors of MexAB- or MexXY- OprM in Pseudomonas aeruginosa using nucleic acid dyes. Journal of Infection and Chemotherapy, 28(5), 595–601.

Gaurav, A., et al. (2023). Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. Microbiology, 169(5), 001333.

Gebretsadik, T., et al. (2021). Hydrazone-based spin crossover complexes: Behind the extra flexibility of the hydrazone moiety to switch the spin state. Coordination Chemistry Reviews, 431, 213666.

Grimsey, E. M., et al. (2020). Chlorpromazine and amitriptyline are substrates and inhibitors of the AcrB multidrug efflux pump. mBio, 11(3), e00465-20. https://doi.org/10.1128/mBio.00465-20

Huang, L., et al. (2022). Bacterial multidrug efflux pumps at the frontline of antimicrobial resistance: An overview. Antibiotics, 11(4), 520. https://doi.org/10.3390/antibiotics11040520

Freitas, P. R., de Araújo, A. C., Araújo, I. M., de Almeida, R. S., Borges, J. A., Paulo, C. L., & Coutinho, H. D. (2024). Thiazine-derived compounds in inhibiting efflux pump in Staphylococcus aureus K2068, mepA gene expression, and membrane permeability alteration. Biomedicine & Pharmacotherapy, 179, 117291.

https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117291

Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison,

G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. Journal of cheminformatics, 4(1), 17. https://doi.org/10.1186/1758- 2946-4-17

Lipinski, C. A. (2004). Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. Drug Discovery Today: Technologies, 1(4), 337-341. https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007

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. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019

Jabeen, M. (2022). A comprehensive review on analytical applications of hydrazone derivatives. Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry, 9(3), 663– 698.

Jahromy, S. H., Ranjbar, S., & Pishkar, L. (2020). Phenotypic activity of efflux pumps by carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) and mutations in gyrA and parC genes among ciprofloxacin-resistant Acinetobacter baumannii isolates. Jundishapur Journal of Microbiology, 13(4).

Javadpour, M. M., et al. (1996). De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. Journal of Medicinal Chemistry, 39(16), 3107–3113.

Kaatz, G. W., & Seo, S. M. (1995). Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39(12), 2650–2655.

Kaatz, G. W., & Seo, S. M. (1997). Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 41(12), 2733–2737.

Kaatz, G. W., Moudgal, V. V., & Seo, S. M. (2002). Identification and characterization of a novel efflux-related multidrug resistance phenotype in *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 50(6), 833–838.

Levine, C., Hiasa, H., & Marians, K. J. (1998). DNA gyrase and topoisomerase IV: Biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression, 1400(1–3), 29–43.

Martin, A. L. A. R., et al. (2023). In vitro and in silico evidences about the inhibition of MepA efflux pump by coumarin derivatives. Microbial Pathogenesis, 182, 106246.

Medeiros, M. A. M. B., et al. (2021). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydrazone derivatives and their possible mechanism of action in mice. PLOS ONE, 16(11), e0258094.

Mohanty, H., Pachpute, S., & Yadav, R. P. (2021). Mechanism of drug resistance in bacteria: Efflux pump modulation for designing of new antibiotic enhancers. Folia Microbiologica, 66(5), 727–739.

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. https://doi.org/10.1002/jcc.21256

Nascimento, F. B. S. A., et al. (2024). Antimicrobial activity of hydralazine against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. Future Microbiology, 19(2), 91–106.

Nguyen, T. K., et al. (2021). Activity of moxifloxacin against biofilms formed by clinical isolates of *Staphylococcus aureus* differing by their resistant or persister character to fluoroquinolones. Frontiers in Microbiology, 12, 785573.

Pires, D. E., Kaminskas, L. M., & Ascher, D. B. (2018). Prediction and optimization of pharmacokinetic and toxicity properties of the ligand. In Computational Drug Discovery and Design (pp. 271-284). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7756-7_14

Pundir, S., Martin, M. J., O'Donovan, C., & UniProt Consortium. (2016). UniProt tools.

Current Protocols in Bioinformatics, 53(1), 1-29. https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0129s53

Patel, D., et al. (2010). Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54(12), 5070–5073.

Rampacci, E., et al. (2021). Ethidium bromide exposure unmasks an antibiotic efflux system in Rhodococcus equi. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 76(8), 2040–2048.

Rollas, S., & Güniz Küçükgüzel, Ş. (2007). Biological activities of hydrazone derivatives. Molecules, 12(8), 1910–1939.

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

https://doi.org/10.1038/ncomms8995

Rayan, B., & Rayan, A. (2017). Avogadro program for chemistry education: To what extent can molecular visualization and three-dimensional simulations enhance meaningful chemistry learning. Journal of Chemical Education, 5(4), 136-141.

https://doi.org/10.12691/wjce-5-4-4

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. https://doi.org/10.1038/nmeth.1818

Rocha, J. E., de Freitas, T. S., da Cunha Xavier, J., Pereira, R. L. S., Junior, F. N. P., Nogueira, C. E. S., ... & Coutinho, H. D. M. (2021). Antibacterial and antibiotic modifying activity, ADMET study and molecular docking of synthetic chalcone (E)-1- (2-hydroxyphenyl)-3-(2, 4-dimethoxy-3-methylphenyl) prop-2-en-1-one in strains of *Staphylococcus aureus* carrying NorA and MepA efflux pumps. Biomedicine & Pharmacotherapy, 140, 111768. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111768

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. https://doi.org/10.2147/AABC.S63749

Sabatini, S., et al. (2013). Re-evolution of the 2-phenylquinolines: Ligand-based design, synthesis, and biological evaluation of a potent new class of *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors to combat antimicrobial resistance. Journal of Medicinal Chemistry, 56(12), 4975–4989.

Sepehr, A., Fereshteh, S., & Shahrokhi, N. (2022). Detection of efflux pump using ethidium bromide-agar cartwheel method in Acinetobacter baumannii clinical isolates. Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases, 10(1), 36–41.

Shah, M. A., et al. (2022). Synthesis and characterization of novel hydrazone derivatives of isonicotinic hydrazide and their evaluation for antibacterial and cytotoxic potential. Molecules, 27(19), 6770.

Silva, P. T., et al. (2021). Synthesis, spectroscopic characterization and antibacterial evaluation of chalcones derived from acetophenone isolated from Croton anisodontus Müll. Arg. Journal of Molecular Structure, 1226, 129403.

Varela, M. F., et al. (2021). Bacterial resistance to antimicrobial agents. Antibiotics, 10(5), 593.

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. https://doi.org/10.1021/jm020017n

Xavier, J. C., et al. (2021). Spectroscopic analysis by NMR, FT-Raman, ATR-FTIR, and UV–Vis, evaluation of antimicrobial activity, and in silico studies of chalcones derived from 2-hydroxyacetophenone. Journal of Molecular Structure, 1241, 130647.

Zebbiche, Z., et al. (2021). Synthesis and anticancer properties of novel hydrazone derivatives incorporating pyridine and isatin moieties. Archiv der Pharmazie, 354(5), 2000377.

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. https://doi.org/10.1002/jcc.21334

Wager, T. T., Hou, X., Verhoest, P. R., & Villalobos, A. (2016). Central nervous system multiparameter optimization desirability: application in drug discovery. ACS chemical Neuroscience, 7(6), 767-775. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00029

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. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250705

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. https://doi.org/10.1139/v06-012

Yee, S. (1997). In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. Pharmaceutical Research, 14(6), 763-766. https://doi.org/10.1023/A:1012102522787

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. https://doi.org/10.1021/ci800084x

5.1 CONCLUSÕES GERAIS

A crescente e alarmante resistência aos antimicrobianos representa uma ameaça à saúde pública, comprometendo a eficácia de tratamentos. Nesse contexto, a escassez de novos antibióticos tem impulsionado a busca por estratégias inovadoras, como o reposicionamento de fármacos e a identificação de inibidores de bombas de efluxo. Esta pesquisa se insere nesse panorama, investigando o potencial de um derivado da hidralazina, a hidrazona HDZH1,4BENZ, como um agente capaz de enfrentar a resistência em cepas de *Staphylococcus aureus* que expressam bombas de efluxo do tipo NorA e MepA.

Os resultados dos ensaios de atividade direta indicaram que a hidrazona HDZH1,4BENZ apresentou níveis de atividade antibacteriana que, embora mensuráveis, não foram tão altos, com isso, não apresentou atividade direta. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) foram superiores a 1024 µg/mL para todas as cepas de *Staphylococcus aureus* testadas, foram testadas as cepas portadoras de bombas 1199B e K2068. Esse achado corrobora com a literatura existente para compostos hidrazônicos semelhantes.

Os dados obtidos apresentados cepas 1199B, quando associada ao brometo de etídio (EB) reforçam a eficácia da hidrazona HDZH1,4BENZ como potencial inibidor de bombas de efluxo em *Staphylococcus aureus* 1199B. A redução significativa da concentração inibitória mínima (CIM) do Brometo de Etídio (EB) quando associado à clorpromazina (CPZ) valida a presença da bomba NorA, já que a CPZ é um inibidor conhecido desse sistema. Notavelmente, o efeito semelhante observado com a associação HDZH1,4BENZ + EB evidencia que a hidrazona foi capaz de modular o mecanismo de efluxo da cepa resistente. A comparação entre os grupos demonstra que a HDZH1,4BENZ reduziu a CIM de forma estatisticamente significativa.

Quando combinada a Norfloxacina as informações extraídas demonstraram claramente a capacidade da hidrazona HDZH1,4BENZ de atuar como potencial adjuvante na modulação da resistência antimicrobiana da cepa *Staphylococcus aureus* 1199B frente à norfloxacina. A redução significativa da concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico quando associado à clorpromazina (CPZ) confirma a presença da bomba de efluxo NorA, visto que a CPZ é reconhecida como um inibidor padrão desse sistema. De forma semelhante, a associação da norfloxacina com a HDZH1,4BENZ resultou em diminuição da CIM em relação ao controle, evidenciando a capacidade do composto de interferir nos mecanismos de resistência da cepa, ainda que de forma estatisticamente mais modesta.

Embora os dados reforcem a hipótese de que a hidrazona HDZH1,4BENZ atue sobre a bomba de efluxo NorA, não se pode descartar a possibilidade de atuação adicional em outros alvos celulares. Assim, os achados indicam que a HDZH1,4BENZ possui potencial adjuvante, promovendo a redução da resistência bacteriana à norfloxacina, o que pode representar uma estratégia promissora para o resgate da eficácia de antibióticos frente a cepas multirresistentes como a S. aureus 1199B.

Sobre a cepa K2068, quando empregada ao brometo de etídio, demonstram a eficácia da HDZH1,4BENZ na modulação da resistência bacteriana mediada pela bomba de efluxo MepA na cepa *Staphylococcus aureus* K2068. A redução altamente significativa da concentração inibitória mínima (CIM) do Brometo de Etídio (EB) quando associado tanto à clorpromazina (CPZ) quanto à HDZH1,4BENZ, podendo confirmar a presença ativa do mecanismo de efluxo nessa cepa. A CPZ, como inibidor padrão, reforça a confiabilidade do modelo experimental, enquanto o desempenho semelhante da hidrazona evidencia seu potencial como adjuvante na inibição da MepA, permitindo maior acúmulo intracelular do substrato e consequente redução da concentração necessária para inibir o crescimento bacteriano.

Esses achados são consistentes com a hipótese de que a HDZH1,4BENZ atua primariamente sobre as bombas de efluxo, permitindo o resgate da atividade antimicrobiana de substâncias como o Brometo de Etídio. A atuação da hidrazona sobre a cepa K2068, que não possui alterações na topoisomerase, mas apresenta modificação no gene mepA, sugere que seu mecanismo de ação se dá por bloqueio da expulsão do composto do interior da célula. Assim, a HDZH1,4BENZ se confirma como uma molécula promissora no desenvolvimento de adjuvantes terapêuticos destinados a combater cepas de S. aureus multirresistentes mediadas por proteínas de efluxo, ampliando a aplicabilidade desse composto em diferentes perfis de resistência bacteriana.

Os dados apresentados na cepa K2068 utilizando a Ciprofloxacina, confirmam o efeito adjuvante da hidrazona HDZH1,4BENZ na cepa *Staphylococcus aureus* K2068 frente ao antibiótico ciprofloxacina. A redução da concentração inibitória mínima (CIM) na associação da ciprofloxacina com a clorpromazina (CPZ), um inibidor padrão de bombas de efluxo, comprova a atuação da proteína MepA nesta cepa. De forma semelhante, a associação da ciprofloxacina com a HDZH1,4BENZ também resultou em diminuição significativa da CIM, ainda que em menor magnitude do que o observado na associação com CPZ. Este comportamento está alinhado com estudos anteriores que indicam que compostos contendo porções hidralazina e cadeias laterais heterocíclicas podem interagir seletivamente com proteínas de efluxo bacterianas, permitindo maior retenção do antibiótico no citoplasma (BENTO et al., 2024; XAVIER et al., 2021).

A menor redução da CIM da ciprofloxacina em relação ao efeito mais pronunciado observado com o Brometo de Etídio pode ser explicada pela presença de múltiplos mecanismos de resistência na cepa K2068, onde a HDZH1,4BENZ provavelmente atua principalmente sobre o sistema de

efluxo. A possível interação da porção hidralazina da molécula com a proteína MepA reforça o potencial deste composto como adjuvante terapêutico, como já sugerido por estudos com derivados de hidralazina e chalconas (SABATINI et al., 2013; CAMPOS LIMA et al., 2024).

O principal achado deste trabalho e a sua contribuição mais significativa reside na sua atividade adjuvante. Em concentrações subinibitórias, a HDZH1,4BENZ demonstrou um efeito potencializador robusto, reduzindo as CIMs do brometo de etídio, da norfloxacina e da ciprofloxacina nas cepas de S. aureus 1199B (NorA) e K2068 (MepA).

A validação do sistema experimental é crucial para a interpretação dos resultados. As CIMs elevadas de norfloxacina e ciprofloxacina nas cepas resistentes, quando comparadas à cepa controle ATCC 25923, confirmam a expressão fenotípica de resistência.

O presente estudo oferece uma contribuição original e de grande relevância para a química medicinal e microbiologia, especialmente ao demonstrar que a hidrazona HDZH1,4BENZ atua como um inibidor de duas bombas de efluxo cruciais em S. aureus: a NorA e a MepA. Este é um achado significativo, pois estudos prévios com um composto hidrazônico similar, derivado da hidralazina, mostraram inibição apenas da bomba NorA, mas não da MepA.

A diferença na atividade biológica de um composto de estrutura semelhante sugere uma valiosa relação entre a estrutura química e a atividade inibitória, indicando que a cadeia heterocíclica com átomos de oxigênio presente na HDZH1,4BENZ pode ser o fator determinante para seu espectro de inibição mais amplo. Essa correlação é apoiada por estudos com outros compostos que contêm átomos de oxigênio em anéis heterocíclicos (SABATINI et al., 2013; XAVIER et al., 2021).

Portanto, a HDZH1,4BENZ surge como um protótipo molecular de grande potencial, fornecendo um ponto de partida para o desenvolvimento de inibidores de efluxo de amplo espectro, que podem ser empregados em terapias combinadas para combater a multirresistência bacteriana, um problema que existe na saúde pública.

E nos estudos in silico, incluindo docking molecular e predições farmacocinéticas, os resultados reforçaram de forma confiavel os achados experimentais ao evidenciar elevada afinidade e seletividade do composto pelas bombas de efluxo NorA e MepA, com valores de ligação energeticamente e estatisticamente relevantes em comparação a substratos clássicos e à clorpromazina. Em consonância, a avaliação farmacocinética revelou forte similaridade com fármacos de administração oral, além de perfil favorável de distribuição e risco toxicológico moderado por ingestão.

5.2 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS

Apesar dos resultados promissores, mais estudos são necessários para elucidar completamente o mecanismo de ação da hidrazona HDZH1,4BENZ. Ensaios adicionais devem ser conduzidos para

verificar se a interação do composto com proteínas de efluxo é direta ou se envolve vias regulatórias secundárias. Além disso, análises estruturais e moleculares, como cristalografia de proteínas ou modelagem molecular, poderiam ajudar a identificar os sítios de ligação específicos da HDZH1,4BENZ nas bombas NorA e MepA. Esse conhecimento seria essencial para a otimização racional da molécula, visando maior especificidade e potência.

Outra vertente importante para investigações futuras será o teste da HDZH1,4BENZ em um painel mais amplo de patógenos clínicos multirresistentes, incluindo outras espécies Gram-positivas e Gram-negativas, para avaliar a possível atuação como um inibidor de efluxo de amplo espectro. Adicionalmente, a realização de estudos *in vivo*, será fundamental para verificar a segurança, biodisponibilidade e eficácia terapêutica do composto em condições clínicas simuladas. Tais abordagens poderiam confirmar se os efeitos observados *in vitro* se traduzem em benefício clínico.

Por fim, a HDZH1,4BENZ pode servir como base para o desenvolvimento de estruturas correlatas. Modificações na cadeia lateral heterocíclica ou na porção hidralazina poderiam ser exploradas para melhorar a afinidade com diferentes bombas de efluxo ou para minimizar possíveis efeitos colaterais. O avanço dessas investigações poderá contribuir significativamente para o enfrentamento da resistência bacteriana, oferecendo novas alternativas para a combinação de antibióticos e inibidores de efluxo em terapias antimicrobianas.

ABOU HEIDAR, N. F. *et al*. Management of urinary tract infection in women: A practical approach for everyday practice. **Urology annals**, v. 11, n. 4, p. 339-346, 2019.

BAIOMY, Amr A.; SHAKER, Ghada H.; ABBAS, Hisham A. Sensitizing multi drug resistant *Staphylococcus aureus* isolated from surgical site infections to antimicrobials by efflux pump inhibitors. **African Health Sciences**, v. 20, n. 4, p. 1632, 2020.

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.

BLAIR, J. M. A. *et al*. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BRITO, G. B. D.; TREVISAN, M. O uso indevido de antibióticos e o eminente risco de resistência bacteriana. **Revista Artigos. Com**, v. 30, n. 7902, p. 9, 2021.

BRÜSSOW, H. The antibiotic resistance crisis and the development of new antibiotics. Microbial Biotechnology, [s. l.], v. 17, n. 2, p. e14510, 2024. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11226406/.

CACHIBA, T. H. *et al*. Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados N-acilidrazônicos. **Química Nova**, v. 35, p. 1566-1569, 2012.

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**. Available at SSRN: https://ssrn.com/abstract=4775685 or http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4775685. 2024.

CHETRI, Shiela. The culmination of multidrug-resistant efflux pumps vs. meager antibiotic arsenal era: Urgent need for an improved new generation of EPIs**. Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1149418, 2023.

CHEUNG, Gordon YC; BAE, Justin S.; OTTO, Michael. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021.

CURRENT STATUS, Challenges, and Future Directions. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 107. https://doi.org/10.1002/cpt.1769.

CURRENT STATUS, Challenges, and Future Directions. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**,107. https://doi.org/10.1002/cpt.1769.

COSTA, A. L. P.; SILVA JÚNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017. DOI: 10.18468/estcien.2017v7n2.p45-57.

MORAIS OLIVEIRA-TINTINO, Cícera D. et al. NorA, Tet (K), MepA, and MsrA efflux pumps in *Staphylococcus aureus*, their inhibitors and 1, 8-naphthyridine sulfonamides. **Current Pharmaceutical Design**, v. 29, n. 5, p. 323-355, 2023.

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.

EICHENBERGER, Emily M.; THADEN, Joshua T. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant Gram-negative bacteria. Antibiotics, v. 8, n. 2, p. 37, 2019.

FARHA, Maya A.; FRENCH, Shawn; BROWN, Drug repurposing for antimicrobial discovery. Nature Microbiology, 4, 565 - 577. 2019

FERREIRA, B. L. S.; OLIVEIRA, T. C. **Resistência bacteriana e sua relação com o consumo incorreto de antibióticos.** Revista Multidisciplinar em Saúde, v. 2, n. 2, p. 48-48, 2021.

FURLAN, L.; CARAMELLI, B. The regrettable story of the "Covid KIT" and the "Early Treatment of Covid-19" in Brazil. **The Lancet Regional Health–Americas**, v. 4, 2021.

GARCIA, J. V. A. S.; COMARELLA, L. O uso indiscriminado de antibióticos e as resistências bacterianas. **Saúde e Desenvolvimento**, v. 10, n. 18, p. 78-87, 2021.

GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; D' AZEVEDO, P. A. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 501–506, set. 2009.

GOMES, T. A.T. *et al*. Diarrheagenic escherichia coli. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 3-30, 2016.

GUILHELMELLI, F.; VILELA, N.; ALBUQUERQUE, P.; DERENGOWSKI, L. DA S.; PEREIRA, I. S.; KYAW, C. M. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance**. Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 353, 2013.

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.

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.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010000300035.

HANDOKO, D. A.; SETYAWATI, T.; ASRINAWATI, A. N. Teste de eficácia antibacteriana do extrato de folha de cereja (Muntigia calabura L.) contra a bactéria Escherichia coli. **Med Tadulako J Ilm Kedokt**, v. 6, n. 1, 2019.

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

JANG, J. *et al*. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 3, p. 570-581, 2017.

LEKSHMI, M.; AMMINI, P.;ADJEI, J.; SANFORD, L. M.; SHRESTHA, U.; KUMAR, S.; VARELA, M. F. Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1–18, 2018.

LIMA, M. F. P. *et al*. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares–Revisão de Literatura. **Uningá Review**, v. 21, n. 1, 2015.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

LUNA, I. S. LUNA, Isadora Silva *et al*. **Síntese e avaliação do potencial antimicrobiano de novos derivados 2-amino-tiofênicos obtidos a partir de 1, 4-ditiano-2, 5-diol**. 141 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2017.

MARTIN, A. L. A. R. **Efeito in vitro e in silico de derivados cumarínicos na inibição da função da bomba de efluxo MepA e NorA em *Staphylococcus aureus***. 2023. 101 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 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.

MIRANDA, I. C. S.; VIEIRA, R. M. S.; SOUZA, T. F. M. P. **Consequências do uso inadequado de antibióticos: uma revisão de literatura.** Research, Society and Development, v. 11, n. 7, p. e58411730225-e58411730225, 2022.

MORALES, K. F. P. *et al*. Perfil de farmacorresistencia microbiana en adultos con infección del tracto urinario en una población de Pichincha-Ecuador. **Revista Médica-Científica CAMbios HECAM**, v. 20, n. 1, p. 10-14, 2021.

MORALES-ESPINOSA, R. *et al*. Patrones de susceptibilidad antimicrobiana “in vitro” de bacterias Gram negatives asilades de infección de vías urinarias en pacientes ambulatorios de una clínica del sur de la Ciudad de México. **Revista Clínica de Medicina de Familia**, v. 13, n. 2, p. 131-138, 2020.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p. 4.2.15, 2016.

NASCIMENTO, F. B. S. A. **Avaliação da atividade antifúngica da hidralazina, seu efeito sinérgico com itraconazol e mecanismo de ação sobre cepas de Candida spp. resistentes ao fluconazol**. 2018. 71 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2018.

NERY, K. L. F. B. *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.

NISHINO, Kunihiko *et al*. Function and inhibitory mechanisms of multidrug efflux pumps. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 737288, 2021.

OGAWARA, Hiroshi. Comparison of antibiotic resistance mechanisms in antibioticproducing and pathogenic bacteria. Molecules, v. 24, n. 19, p. 3430, 2019.

OLIVEIRA, R. C. **Análise estrutural e espectroscópica, avaliação da atividade antibacteriana e de bomba de efluxo da mistura triterpênica α,β-amirina isolada da resina Protium heptaphyllum (Aubl.) Marchand**. 2021. 169 p. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) - Universidade Regional do Cariri, Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Crato, 2021.

PASSOS, R. C. S. **Obtenção de novos derivados isoxazolínicos por hibridação molecular e avaliação do potencial antibacteriano e antifúngico**. 86 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

PINHEIRO, P. G. *et al*. Antibacterial activity and inhibition against *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by ferulic acid and its esterified derivatives. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 11, n. 9, p. 405-413, 2021.

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.

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.

ROCHA, J. E. *et al*. Antibacterial and antibiotic modifying activity, ADMET study and molecular docking of synthetic chalcone (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(2, 4-dimethoxy-3-methylphenyl) prop-2-en-1-one in strains of *Staphylococcus aureus* carrying NorA and MepA efflux pumps. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 140, p. 111768, 2021.

RUIZ-MAGANÃ, *et al*. The antihypertensive drug hydralazine actives the intrinsic pathaway of apoptosis and causes DNA damage in leukemic T cells. **Oncotarget**, v.7, n.16, p. 21875- 21886, 2016.

SABATINI, Stefano *et al*. Re-evolution of the 2-phenylquinolines: ligand-based design, synthesis, and biological evaluation of a potent new class of *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors to combat antimicrobial resistance. **Journal of medicinal chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4975-4989, 2013.

SANTOS, D. M. **Efeito da hidralazina na sobrevida, na resposta inflamatória e no estresse oxidativo em modelo animal de sepse**. 2021. 115 f. Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2021.

SCHCOLNIK-CABRERA, Alejandro; JUÁREZ-LÓPEZ, Daniel; DUENAS-GONZALEZ, Alfonso. Perspectives on drug repurposing. **Current medicinal chemistry**, v. 28, n. 11, p. 2085-2099, 2021. https://doi.org/10.2174/0929867327666200831141337.

SILVA, M. T. S. D. O impacto do uso indiscriminado de antibioticos na pandemia do COVID-19. **PANDEMIA: Caminhos para Aprendizagem. [S. l.]: Pedro & João Editores**, p. 165, 2021.

SOARES, I. C.; GARCIA, P. C. **Resistência Bacteriana: a relação entre o consumo indiscriminado de antibióticos e o surgimento de superbactérias.** Faculdade Atenas, v. 19, 2020.

SOUZA, J. C.; COSTA, B. A. **O Aumento da Resistência Bacteriana ao Antibiótico Penicilina.** Revista de Inovação e Tecnologia-RIT, v. 13, n. 2, p. 03-15, 2023. Disponível em: https://rit.openjournalsolutions.com.br/. Acesso em: 17 abr. 2024.

SOUZA, J.; DIAS, F. R.; OLIVEIRA ALVIM, H. G. Resistência bacteriana aos antibióticos. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 5, n. 10, p. 281-293, 2022.

SULTAN, Insha *et al*. Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. Frontiers in microbiology, v. 9, p. 2066, 2018.

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.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VALE, V. R. **Resistência aos antimicrobianos na Medicina Veterinária.** 2022. Disponível em: https://dspace.uniceplac.edu.br/. Acesso em: 17 abr. 2024.

VARELA, Manuel F. *et al*. Bacterial resistance to antimicrobial agents. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 593, 2021.

WHO. **Preventing the COVID-19 pandemic from causing an antibiotic resistance catastrophe. World Health Organization**. Disponível em: https://www.who.int/europe/news/item/18-11-2020-preventing-the-covid-19-pandemic-from-causing-an-antibiotic-resistance-catastrophe#:~:text=Preventing%20the%20COVID%2D19%20pandemic%20from%252. Acesso em: 26/06/2024.

XAVIER, Jayze C. *et al*. Spectroscopic analysis by NMR, FT-Raman, ATR-FTIR, and UVVis, evaluation of antimicrobial activity, and in silico studies of chalcones derived from 2-hydroxyacetophenone. **Journal of Molecular Structure**, v. 1241, p. 130647, 2021.

XU, Lin *et al*. Conversion of broad-spectrum antimicrobial peptides into species-specific antimicrobials capable of precisely targeting pathogenic bacteria. **Scientific Reports**, v. 10, n.1, p.944, 2020.

XU, Hua *et al*. Electronic health records for drug repurposing: current status, challenges, and future directions. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 107, n. 4, p. 712, 2020.

ZHANG, Fusheng; CHENG, Wei. The mechanism of bacterial resistance and potential bacteriostatic strategies. Antibiotics, v. 11, n. 9, p. 1215, 2022.

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